



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera Ciencias Biológicas

***“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES EXISTENTES
ENTRE DOS POTYVIRUS Y DE LA SINERGIA CON
UN CRINIVIRUS EN EL CULTIVO DE BATATA”***

TESINISTA: Flamarique, Sofía Solange

DIRECTORA: Dra. (Ing. Agr.) Di Feo, Liliana del Valle

**Instituto de Patología Vegetal
Centro de Investigaciones Agropecuarias
INTA – Córdoba
2018**

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales
Carrera Ciencias Biológicas

***“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES EXISTENTES
ENTRE DOS POTYVIRUS Y DE LA SINERGIA CON UN
CRINIVIRUS EN EL CULTIVO DE BATATA”***

TESINISTA: Flamarique, Sofía Solange

FIRMA:

DIRECTORA: Dra. (Ing. Agr.) Di Feo, Liliana del Valle

FIRMA:

**Instituto de Patología Vegetal
Centro de Investigaciones Agropecuarias
INTA – Córdoba
2018**

***“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES EXISTENTES
ENTRE DOS POTYVIRUS Y DE LA SINERGIA CON UN
CRINIVIRUS EN EL CULTIVO DE BATATA”***

Tribunal examinador:

Nombre y Apellido:.....Firma:

Nombre y Apellido:.....Firma:

Nombre y Apellido:.....Firma:

Calificación:.....

Fecha:.....

ÍNDICE

RESUMEN	6
PALABRAS CLAVES	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 BATATA: CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA... ..	8
1.1.1 Las virosis como limitantes en el cultivo de batata	9
1.2 ENFERMEDADES VIRALES DE BATATA	10
1.3 LOS VIRUS DE BATATA EN ARGENTINA.....	10
1.4 LOS POTYVIRUS	13
1.4.1 Efecto de infecciones simples con potyvirus y de sinergia con SPCSV	14
1.4.2 Antecedentes de antagonismo	15
2. HIPOTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 INTERACCIÓN ENTRE POTYVIRUS Y CRINIVIRUS	17
4.1.1 Fuente de inóculo.....	17
4.1.2 Ensayo de inoculación.....	17
4.1.3 Observación de síntomas.....	18
4.2 PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN VIRAL	18
4.2.1 Purificación de SPFMV y SPVG.....	18
4.2.2 Trazado curva patrón de concentración viral para SPVG Y SPFMV ...	19
4.2.3 Puesta a punto DAS-ELISA.....	19
4.2.4 Determinación concentración viral	20
4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: Preparados <i>Dips</i>	20
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
5. RESULTADOS	21
5.1 INTERACCIÓN ENTRE POTYVIRUS Y CRINIVIRUS	21
5.1.1 Ensayo de inoculación.....	21
5.1.2 Sintomatología observada	24
5.1.2.1 Injerto simple: SPFMV2	24
5.1.2.2 Injerto simple: SPVG	27
5.1.2.3 Injerto doble: SPFMV + SPCSV.....	30
5.1.2.4 Injerto doble: SPVG + SPCSV.....	33
5.1.2.5 Injerto doble: SPFMV + SPVG	37
5.1.2.6 Injerto triple: SPFMV + SPVG + SPCSV	40
5.2 PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN VIRAL	44
5.2.1 Purificación viral de SPFMV y SPVG.....	44
5.2.2 Trazado de curva patrón de concentración viral para SPFMV y SPVG	45
5.2.3 Puesta a punto DAS-ELISA y determinación de concentración viral .	46

5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: Preparados <i>Dips</i>	46
6. DISCUSIÓN	48
7. CONCLUSIÓN.....	51
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	53
9. ANEXO: PROTOCOLOS	60

RESUMEN

El cultivo de batata en Argentina ha experimentado una disminución en la superficie plantada y, por ende, en su producción. Actualmente, todas las regiones de cultivo se encuentran afectadas por una patología viral denominada “encrespamiento amarillo” (EA), la más grave que se haya presentado hasta la actualidad en el país. En el EA están involucrados siete virus, dentro de los cuales se encuentran los potyvirus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato virus C* (SPVC), el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* raza Oeste Africano (SPCSV-WA) y los geminivirus *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGV-Ar) y *Sweet potato symptomless virus 1* (SPSMV-1). SPCSV se destaca por su efecto sinérgico en infecciones mixtas, principalmente con los potyvirus. En el presente trabajo se estudió la interacción existente entre SPFMV y SPVG en infecciones dobles y en infecciones triples con SPCSV en los cultivares (cvs.) GEM y Arapey INIA de batata y en la indicadora *Ipomoea setosa*. Para ello, se construyó una curva patrón de concentración viral para SPFMV y SPVG con el fin de cuantificarlos en los tejidos vegetales mediante DAS-ELISA y se estableció la sintomatología y severidad de síntomas, a los 7, 15, 21, 30 y 35 días a partir de la inoculación.

Ambos potyvirus se purificaron desde *I. setosa* infectada por injerto donde se obtuvieron tres bandas, de las cuales la segunda fue la que poseía mayor pureza y concentración viral. A partir de las mismas, se hicieron diluciones seriadas a los fines de efectuar prueba de DAS-ELISA, tomando lecturas de absorbancia a $\lambda=405$ nm (A_{405}) de las distintas diluciones. Finalmente, para la construcción de la curva patrón se realizó un análisis de regresión no lineal modelo Gompertz para SPFMV en el cual $[SPFMV]=\alpha *(-\beta *(-\gamma *A_{405}))$; $\alpha=0,13$ ($p<0,0001$), $\beta=7,04$ ($p<0,0001$) y $\gamma=1,44$ ($p<0,0001$) y un análisis de regresión no lineal modelo logístico para SPVG donde $[SPVG]=\alpha / 1 + \beta *(-\gamma *A_{405})$; $\alpha =0,08$ ($p<0,0001$); $\beta=1309,07$ ($p 0,0687$); $\gamma=5,36$ ($p<0,0001$).

En los injertos triples de la indicadora *I. setosa* tanto SPFMV como SPVG incrementaron su título 100 veces respecto a infecciones simples, a los 15 días desde la infección. En el cv. GEM el aumento fue de 50 veces al día 35 y de dos veces al día 21, para SPFMV y SPVG, respectivamente, mientras que en Arapey INIA, este incremento no fue significativo. En los injertos dobles con ambos potyvirus, cuando se los comparó con las

concentraciones obtenidas en los injertos simples, no se observó variación en sus concentraciones. En cuanto a la sintomatología, en los injertos triples pudo visualizarse una mayor severidad de los mismos (moteado plumoso, mosaico, aclaramiento de nervadura, reducción y deformación de lámina foliar, punteado clorótico, engrosamiento de nervadura y cordón de zapato, tanto en hojas superiores como inferiores) sobre todo en *I. setosa*, seguida de GEM y Arapey INIA. En los injertos dobles con ambos potyvirus, los síntomas expresados fueron característicos de este grupo: punteado clorótico, moteado plumoso y aclaramiento de nervaduras, a partir del día 15 posterior a la infección y sin remisión de los mismos. En el caso de injertos simples, la indicadora exhibió síntomas más conspicuos, en tanto que en batata cv Arapey INIA para SPFMV, solo se observó moteado plumoso desde el día 30 y, para SPVG, bandeado clorótico y leve aclaramiento de nervaduras y puntos cloróticos a los 21 y 30 días. Por último, el cv. GEM mostró distorsión foliar, venas prominentes e hiponastia al día 35 para SPFMV y moteado plumoso, puntos cloróticos e hiponastia a partir del día 15 posterior a la infección con SPVG.

Por lo tanto, las mayores concentraciones de virus, en general, ocurrieron en *I. setosa*, luego en el cultivar GEM de batata y por último, en Arapey INIA. De igual modo, se demostró un efecto sinérgico de los tres virus en la indicadora principalmente. Este hecho fue bien demostrado en el cv. GEM. Además, no se evidenció antagonismo entre ambos potyvirus. Por último, la mayor severidad y variedad de síntomas se observaron en los injertos triples seguido de los injertos entre ambos potyvirus mientras que en injertos simples, los síntomas fueron leves o inexistentes.

PALABRAS CLAVES: *Ipomoea batatas*, *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato virus G*, *Sweet potato chlorotic stunt virus*, *Ipomoea setosa*, serología.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BATATA: CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA

La batata, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., pertenece al orden Solanales, familia botánica de las convolvuláceas; es una especie alohexaploide ($2n=6x=90$), alógama. Pese a ser una hierba perenne, en condiciones de clima templado se cultiva como anual (Loebenstein y Thottappilly, 2009). Su origen está en el noroeste de Sudamérica: Guatemala, Colombia, Ecuador y norte de Perú, sin embargo, en la actualidad, se encuentra difundida en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Austin, 1988; Martí *et al.*, 2013). Se ubica entre las diez especies vegetales más importantes destinadas a la alimentación, con una producción cercana a 104.453.966 t/año en 8.029.864 ha plantadas en el mundo (FAOSTAT, 2016). Las áreas más extensas de producción están en China (80% del total mundial cultivado) y alrededor de los Grandes Lagos del Este de África, pero el cultivo es importante también en otros países (Bourke y Vlassak, 2004). Pese a ser la quinta especie cultivada luego del arroz, trigo, maíz y mandioca, en países en desarrollo, por lo general los rendimientos son bajos. En América Latina se producen sólo 3,82 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016).

A causa de su gran diversidad genética (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) y la consiguiente variabilidad en sus características fenotípicas y morfológicas (Woolfe, 1992), la batata presenta amplia adaptabilidad y versatilidad de usos. Tanto sus raíces como el follaje se emplean en la alimentación humana y animal; la importancia como alimento radica en su valor energético, gracias a su contenido de **almidón**. También es una fuente importante de elementos nutritivos como vitamina A, niacina, riboflavina, vitamina C y **proteínas** de alto valor biológico, además de **elementos minerales** (potasio, fósforo, hierro y calcio) y de algunos **aminoácidos** como la metionina, un aminoácido esencial para la vida humana, ausente en la mayoría de los alimentos de origen agrícola. De este modo, se ubica como uno de los diez alimentos que el ser humano no debería dejar de consumir (Martí, 2007; Cusumano y Zamudio, 2013).

Así mismo, el procesamiento de batata es una utilización secundaria para alimentos típicos como el dulce de batata y batatas en almíbar. Recientemente, el desarrollo de variedades con pulpa totalmente morada, permitió el uso industrial para la obtención de

colorante en Japón. Además, la producción de almidón es uno de los principales usos en países como China y Japón (Arizio, 2011).

Por último, la batata como cultivo presenta una serie de ventajas ya que puede cultivarse con éxito económico en pequeña y mediana escala, adaptándose muy bien a condiciones marginales de suelo y clima, es un cultivo considerado “amistoso” para el medio ambiente, por su capacidad de cubrir el suelo rápidamente y prevenir la erosión (Martí, 2013; Valverde *et al.*, 2003).

No obstante, pese a las ventajas que presenta, y excepto en China y Nueva Zelanda, es un cultivo en retroceso, evidenciándose este fenómeno tanto a nivel global, nacional y provincial y las virosis son una de sus principales causas.

1.1.1 Las virosis como limitantes en el cultivo de batata

Según FAOSTAT (2016), actualmente la superficie con batata en Argentina, se redujo de 32.000 ha a 22.937 ha en 2014 respecto a 1986. La región pampeana (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe) y el NEA son las de mayor superficie plantada (43 y 40%, respectivamente), el NOA posee el 15% y Cuyo, el 2% restante (SAGPyA, 2008). Córdoba, históricamente ha sido la principal provincia productora de batata (7.000 ha en los '90), sin embargo, ha perdido esta posición, ya que cuenta con menos de 1.000 ha plantadas, de las cuales aproximadamente el 80% corresponde al Departamento Colón y el resto a Totoral y Cruz del Eje (Di Feo, 2012). Las virosis, las patologías más importantes de batata que acontecen en todas las regiones en las que se realiza su cultivo, son una de las principales causas de este fenómeno, a nivel global, nacional y provincial, constituyendo potencialmente la limitante de la producción de mayor relevancia (Karyeija *et al.* 1998; Omwueme y Charles, 1994). La propagación comercial vegetativa de la especie conduce a un incremento en la concentración de partículas virales y a su perpetuación en los tejidos vegetales, en perjuicio de los rendimientos (Loebenstein *et al.*, 2009). Esto es particularmente cierto cuando acontecen infecciones mixtas y, con frecuencia, sinérgicas, en las que ocurre incremento de la severidad de síntomas, de la acumulación y movimiento de partículas virales y marcada disminución de producción de raíces reservantes (Di Feo, 2015).

1.2 ENFERMEDADES VIRALES DE BATATA

En el mundo, se citan aproximadamente 30 especies virales de batata, las cuales se encuentran distribuidas en nueve familias: *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviride*, *Comoviridae*, *Flexiviridae*, *Geminiviridae*, *Luteoviridae* y *Potyviridae* (Clark *et al.*, 2012).

La dispersión de los virus en el cultivo de batata puede darse por dos mecanismos: mediante el empleo de propágulos obtenidos a partir de plantas infectadas, que conlleva a la diseminación de los patógenos de un ciclo de cultivo a otro (fuente primaria de infección) y, por otro lado, a través de insectos vectores (fuente secundaria de infección) (Salazar, 1996).

En su mayoría, estos vectores son insectos con aparato bucal picador-suctor, como los áfidos (pulgones) y los aleuródidos (moscas blancas). Los virus transmitidos por pulgones, lo son de manera *no persistente*. Esto significa que la adquisición del patógeno desde la planta enferma y su transmisión a la planta sana puede completarse en pocos minutos o segundos, sin período de latencia y luego de la ecdisis pierden su habilidad de transmitir. Algunos virus de batata, cuyos insectos vectores son las moscas blancas, son transmitidos de manera *persistente* y otros, *semi-persistentemente*. En el primer caso, existe un período de latencia entre la adquisición del patógeno y la transmisión que varía de uno a varios días y es factible que el insecto permanezca infectivo toda su vida; en el segundo, los períodos de adquisición y de inoculación son de 30 minutos y la infectividad del insecto vector no dura más de 12 horas (Salazar, 1996; Di Feo, 2015).

1.3 LOS VIRUS DE BATATA EN ARGENTINA

En Argentina, las virosis en el cultivo de batata han sido de aparición recurrente. En los '70, *Sweet potato vein mosaic virus* (SPVMV) causal de "batata cresa" (Fig. 1), generó severos daños en los rendimientos del cultivar (cv) Criolla Amarilla (Nome, 1973; Nome y Docampo, 1974). Un programa de producción y distribución de plantines libres de virus permitió la recuperación de los cultivos. Sin embargo, en la década del 80, el "enanismo clorótico" (Di Feo *et al.*, 2000) (Fig. 2), provocado por un complejo de tres virus (*Sweet potato chlorotic stunt virus*: SPCSV sinérgico con *Sweet potato feathery mottle virus*: SPFMV y con otro potyvirus: *Sweet potato mild speckling virus*: SPMSV) afectó gravemente al cv. Morada INTA (Biderbost *et al.*, 1990), de excelentes características

agronómicas, en algunas provincias argentinas, principalmente Córdoba y Santiago del Estero, donde se manifestaba sintomáticamente, por ser áreas que le resultaban propicias para dicha expresión. El problema fue solucionado por un tiempo a través del empleo en esas provincias de plantines provenientes de zonas en donde la enfermedad no se manifestaba fenotípicamente.



FIGURA 1. Síntomas típicos de la enfermedad “batata crespa” del cv. Criolla Amarilla. Se observan mosaico, ampollado, engrosamiento de nervaduras y deformación de hojas (Imagen tomada de Martinelli *et al.*, 2014).



FIGURA 2. Plantación de batata cv. Morada INTA afectada por la enfermedad “enanismo clorótico”, caracterizada por presencia de manchones cloróticos y achaparrados en el cultivo (Imagen tomada de Martinelli *et al.*, 2014).

Sin embargo, desde 2009, observaciones efectuadas en lotes de Colonia Caroya (Córdoba) permitieron establecer la presencia de una sintomatología viral a la que denominamos "Encrespamiento Amarillo de la batata" (manchones cloróticos, con plantas de tamaño más reducido que las normales, hojas ampolladas, con mosaico intenso y anillos cloróticos) en el cv. Arapey INIA (Luque *et al.*, 2010) (Fig. 3), de creciente expansión por su alta productividad y marcada precocidad. De acuerdo a investigaciones efectuadas en IPAWE, esta patología es ocasionada por infecciones mixtas en las que intervienen los potyvirus SPFMV, *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato virus C* (SPVC) (Bejerman *et al.*, 2016; Rodríguez Pardina *et al.*, 2012), el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* raza Oeste Africano (SPCSV- WA), y los geminivirus *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGV-Ar) y *Sweet potato symptomless virus 1* (SPSV-1) (Martino *et al.*, 2016; Martino *et al.*, 2017; Martino *et al.*, 2017; Pardina *et al.*, 2012). Esta enfermedad provoca significativas mermas no sólo en la producción (más del 90% en número y peso de raíces reservantes, en ensayos experimentales y en lotes comerciales), sino también en la calidad de dichas raíces, a

través de la disminución de los β -carotenos (López Colomba *et al.*, 2011; Tolocka *et al.*, 2012). En ensayos comparativos de rendimiento efectuados hasta el presente en IPAVE, sólo se consideró el efecto de la co-infección con cuatro virus (SPFMV, SPVG, SPCSV y SPLCV) en la producción y el contenido de β -carotenos y otros antioxidantes del cv Arapey INIA (Fig. 4); sin embargo, existen antecedentes de un posible antagonismo entre los dos potyvirus (SPFMV y SPVG) y ninguno en relación al efecto de SPCSV en dicha interacción.

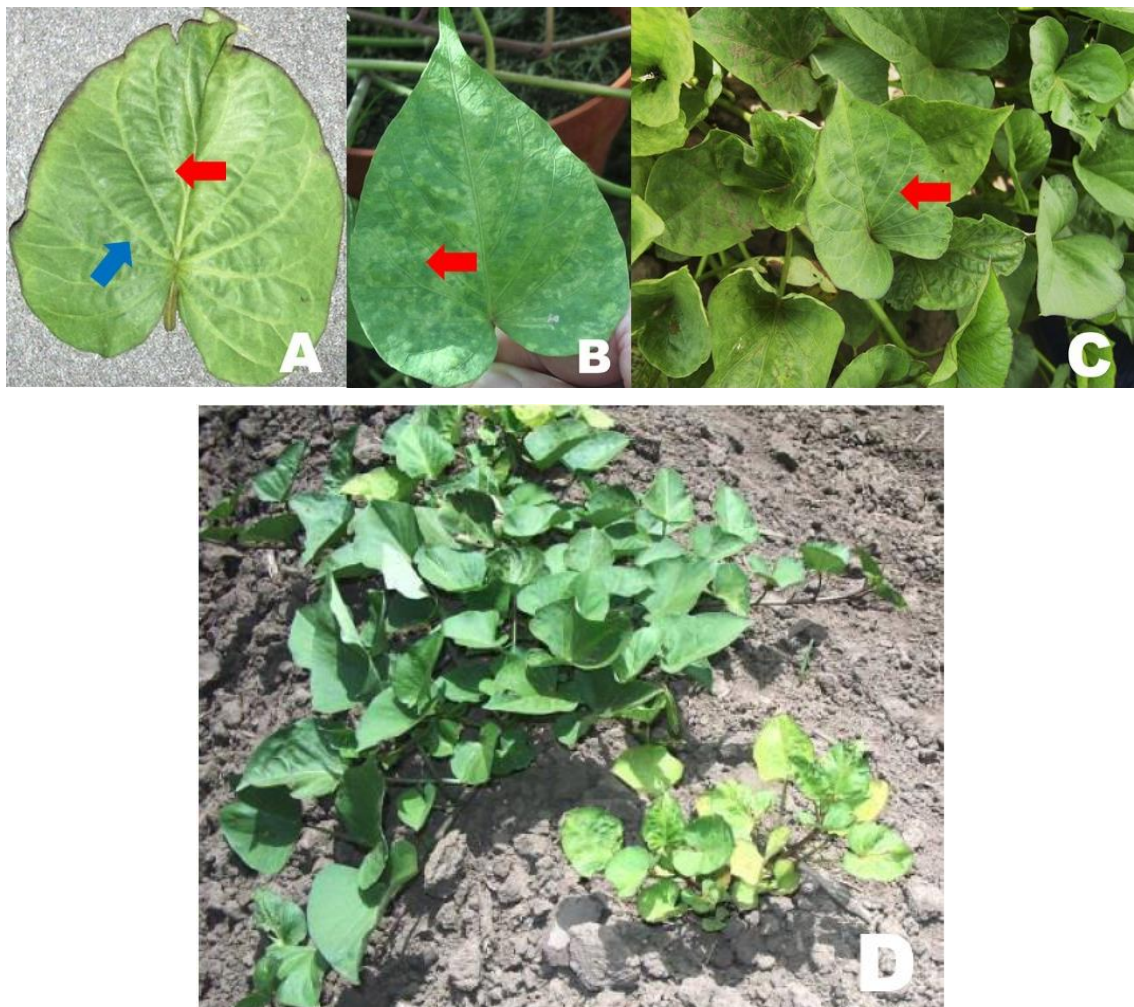


FIGURA 3. Síntomas foliares de “encrespamiento amarillo” en batata cv. Arapey INIA. A) Ampollamiento (flecha roja) y bandeado nerval (flecha azul). B) Punteado clorótico (flecha). C) Aclaramiento de nervadura (flecha). D) Izquierda planta sana y derecha enferma (Imagen tomada de Martinelli *et al.*, 2014).

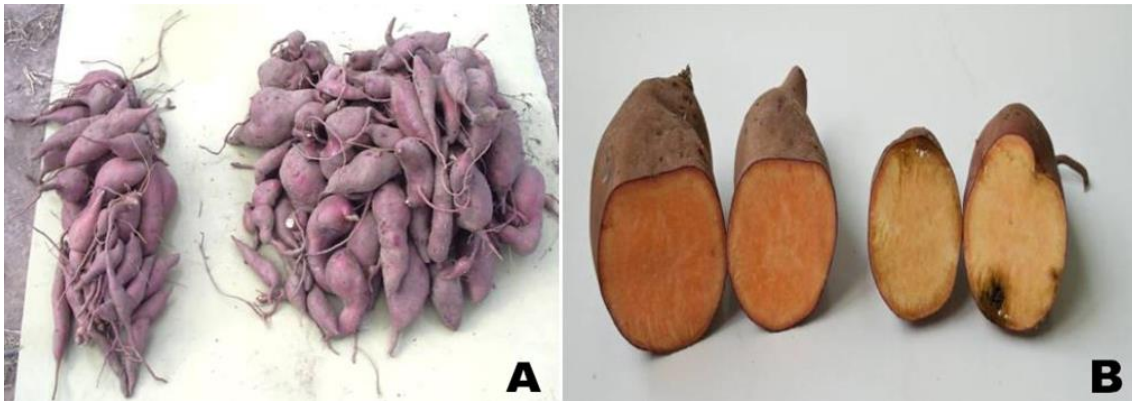


FIGURA 4. Efectos de “encrespamiento amarillo” en cv. Arapey INIA. A) Mermas de rendimiento: producción de raíces de 10 plantas enfermas (izq.) vs. 10 plantas sanas (der.) y B) Disminución del contenido de β -carotenos en raíces tuberosas de una planta infectada con EA (der.) en relación a una planta libre de virus (izq.) (Imagen tomada de Martinelli *et al.*, 2014).

1.4 LOS POTYVIRUS

El género *Potyvirus* es el que incluye mayor número de integrantes dentro de la familia *Potyviridae*, con 160 miembros reconocidos por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2016), los cuales son muy importantes económicamente, ya que constituyen el 25% de los virus conocidos de plantas (King *et al.*, 2011). Se caracterizan por sus partículas filamentosas, flexuosas y sin envoltura, cuya longitud y diámetro varían entre 680-900 nm y 11-15 nm, respectivamente (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) (Fig. 5). Son transmitidos por áfidos de manera no persistente. SPFMV es omnipresente en todas las regiones del mundo en las que se cultiva batata y, junto con SPCSV, producen *Sweet potato virus disease* (SPVD), la virosis de mayor relevancia para el cultivo. En infecciones simples, cada uno de estos virus no se manifiesta fenotípicamente, o bien sólo causa síntomas leves como SPFMV (punteado clorótico en hojas viejas); sin embargo, en infecciones dobles, generan sintomatología severa con pérdidas de rendimiento (Karyeija *et al.*, 1998). De igual manera, otros estudios indican que SPVG, es capaz de inducir síntomas típicos de complejo viral en infecciones mixtas con SPCSV (Kokkinos y Clark, 2006; Li *et al.*, 2012).

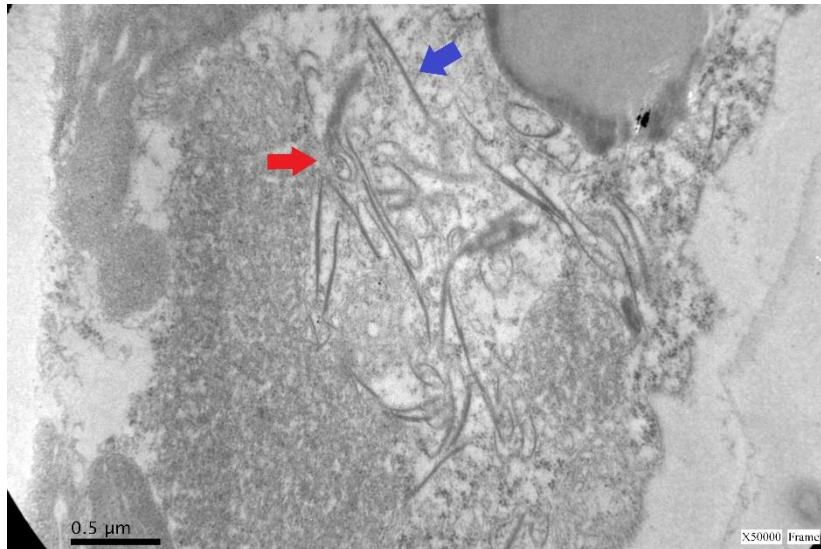


FIGURA 5. Fotografía obtenida por MET donde se observan inclusiones cilíndricas, característica de las infecciones de *potyvirus* (flecha roja) y morfología de la partícula viral (flecha azul). (x50000; barra 0.5 µm) (Imagen perteneciente al Sistema Nacional de Microscopía del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva)

1.4.1 Efecto de infecciones simples con potyvirus y de sinergia con SPCSV.

La interacción sinérgica se refiere a una situación en la cual un virus produce un incremento en la concentración, replicación y movimiento de otra entidad viral que co-infecta a la planta, la cual expresa una marcada severidad de síntomas en comparación a infecciones simples (Syller, 2012; Untiveros *et al.*, 2007). SPVD, ocasionada por la interacción sinérgica entre SPCSV y SPFMV, originó pérdidas de 80 a 90% en la mayoría de los clones del este de África, considerados de alto rendimiento (Karyeija *et al.*, 1998); las mismas fueron del 50% en ensayos experimentales llevados a cabo en Israel (Milgram *et al.*, 1996) y de 65 a 72% en lotes comerciales de Perú (Gutiérrez *et al.*, 2003). Dichas infecciones incrementan más de 600 veces el título de SPFMV y aparece una sintomatología severa (achaparramiento, clorosis, distorsión y disminución del área foliar) ausente en infecciones simples (Fig. 6 A) (Gutiérrez *et al.*, 2003). De igual manera, otros estudios establecen que SPVG es capaz de inducir SPVD en infecciones mixtas con SPCSV (Fig. 6 B)(Kokkinos y Clark, 2006; Li *et al.*, 2012). Existen también investigaciones recientes que indican la ocurrencia de interacciones sinérgicas entre el closterovirus y *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV), sweepovirus (geminivirus de batata, cuyo vector es también *B. tabaci*) (Gálvez *et al.*, 2013).

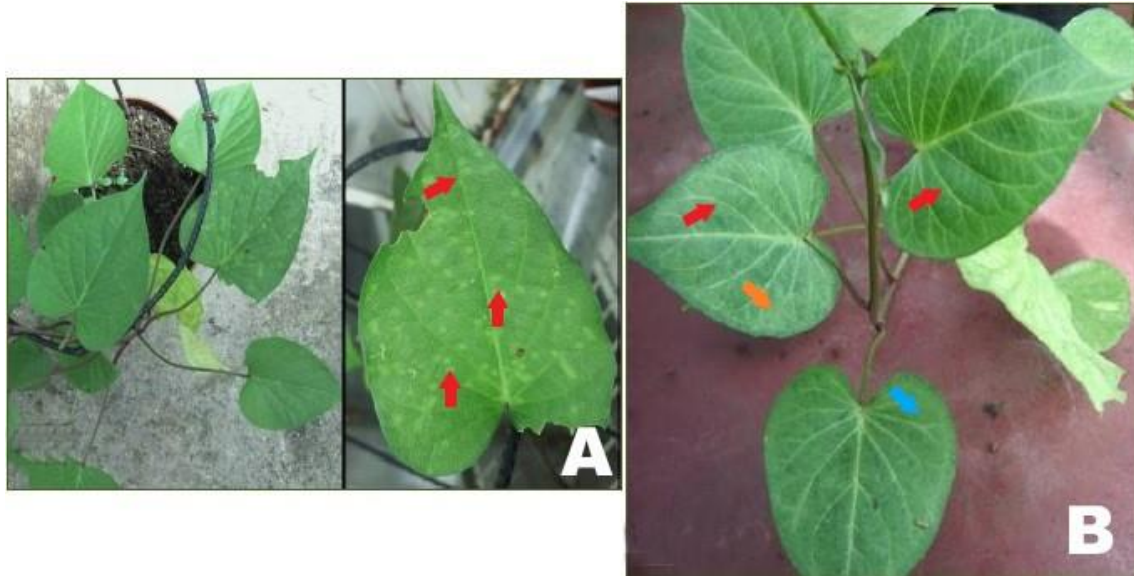


FIGURA 6. Cv Arapey INIA. A) Infección simple con SPFMV donde se observa punteado clorótico en hojas viejas (flecha roja). B) Síntomas incipientes de SPVD (SPFMV + SPCSV) donde se observa aclaramiento de nervaduras (flechas rojas), mosaico (flecha naranja) y bandeado nerval clorótico (flecha azul) (Imágenes tomadas de Martinelli *et al.*, 2014)

1.4.2 Antecedentes de antagonismo

Estudios previos relativos a la relación entre ambos potyvirus (SPVG y SPFMV), permitieron establecer la existencia de un posible antagonismo entre ambos virus, según el cual SPVG exhibe una disminución en su concentración en co-infección con SPFMV (Martinelli *et al.*, 2014). Los autores pudieron observar claramente lo expresado, al comparar la intensidad de las reacciones serológicas en infecciones simples con uno u otro potyvirus (controles), en relación a infecciones simultáneas con ambos. A su vez, los demás tratamientos contemplados en ese estudio (infecciones sucesivas con uno u otro), indicaron que SPFMV y SPVG, competían por el mismo “nicho” en la planta, ya que la concentración en los tejidos era mayor para el virus que había ingresado en primer término. Este fenómeno se explicaría por la estrecha relación existente entre los dos patógenos.

Por tal razón, es preciso indagar sobre los efectos en la expresión y severidad de síntomas y en la concentración viral producidos en dos cultivares de batata y en la indicadora *I. setosa*, por infecciones dobles con SPFMV+ SPVG y por infecciones triples en las que intervienen ambos potyvirus y SPCSV.

2. HIPOTESIS

- Existe una relación antagónica entre SPFMV y SPVG.
- La presencia de SPCSV modifica el antagonismo entre SPFMV y SPVG.
- La concentración viral y la severidad de síntomas en batata y en la indicadora *Ipomoea setosa* infectada con SPFMV + SPVG y con SPFMV + SPVG + SPCSV son variables al considerar diferentes tiempos a partir de la inoculación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

- Estudiar la interacción existente entre SPFMV y SPVG en infecciones dobles (SPFMV+SPVG) y en infecciones triples (SPFMV+SPVG+SPCSV) de dos cultivares comerciales de batata y de *Ipomoea setosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Trazar una curva patrón de concentración viral para SPFMV y SPVG
- Determinar la concentración viral en tejidos de dos cultivares comerciales de batata (GEM y Arapey INIA) y en la indicadora *I. setosa* frente a infecciones dobles (SPFMV+SPVG) y triples (SPFMV+SPVG+SPCSV), considerando diferentes tiempos a partir de la inoculación
- Establecer sintomatología y severidad de síntomas en dos cultivares comerciales de batata (GEM y Arapey INIA) y en la indicadora *I. setosa* frente a infecciones dobles (SPFMV+SPVG) y triples (SPFMV+SPVG+SPCSV), considerando diferentes tiempos a partir de la inoculación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 INTERACCIÓN ENTRE POTYVIRUS Y CRINIVIRUS

4.1.1 Fuente de inóculo

El material fuente de inóculo estuvo constituido por plantas de *I. setosa* que fueron infectadas mediante transmisión por *Myzus persicae* Sulzer en pruebas de *one probe*, efectuadas a partir de batata cv. Arapey INIA con “encrespamiento amarillo” (EA). De esta manera, se logró aislar a SPFMV y SPVG, respectivamente.

Por otro lado, se obtuvieron plantas de la indicadora, infectadas con SPCSV, aislado mediante transmisión por moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.).

4.1.2 Ensayo de inoculación

Plántulas de *I. setosa* y plantas libres de virus de los cvs. Arapey INIA y GEM, fueron inoculadas empleando injerto de púa lateral. Con hoja de afeitar se realizó una incisión oblicua (0,5-1 cm) en los tallos de plantas de *I. setosa* sanas, de aproximadamente tres semanas de edad, con al menos dos-tres hojas verdaderas completamente expandidas. Por su parte, se practicó una cuña de 0,5-1 cm de longitud en el extremo proximal de púas de plantas de *I. setosa* infectadas con los patógenos de interés, portadoras de una yema y su hoja correspondiente. La misma fue insertada en la incisión oblicua efectuada en la planta sana, donde se la sostuvo, envolviendo el tallo con papel *film*. La planta injertada fue cubierta con una bolsa plástica por siete días y mantenida en invernadero a 25 °C con buena iluminación. De esta manera, se constituyeron los siguientes tratamientos:

1. Plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA (seis de cada una), injertadas con púas con SPFMV y SPVG, respectivamente (injertos dobles).
2. Plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA (seis de cada una), injertadas con púas con SPFMV, SPVG y SPCSV, respectivamente (injertos triples)
3. Injertos simples de dos plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA injertadas con SPFMV.
4. Injertos simples de dos plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA injertadas con SPVG

5. Injertos dobles de dos plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA injertadas con SPVG + SPCSV.
 6. Injertos dobles de dos plantas de *I. setosa* y de batata cvs. GEM y Arapey INIA injertadas con SPFMV+ SPCSV.
 7. Plantas sanas de *I. setosa*, y de batata cvs. GEM y Arapey INIA, autoinjertadas.
- Se emplearon como controles los tratamientos 3 a 7.

4.1.3 Observación de síntomas

Tanto en plantas de *I. setosa* como de batata cvs. GEM y Arapey INIA, con injertos simples, dobles y triples, se registraron los síntomas de virus a los 7, 15, 21, 30 y 35 días a partir de la inoculación.

Se estableció tipo de sintomatología en *I. setosa* y en batata, además, la severidad de síntomas de acuerdo a una escala de severidad de cuatro grados (Grado 0: planta asintomática; Grado 1: planta con manchas cloróticas en las hojas basales y porte normal; Grado 2: planta con clorosis leve, mosaico y porte más reducido que el normal; Grado 3: planta con notable clorosis, mosaico, reducción del área foliar, severa distorsión de hojas y porte muy reducido).

4.2 PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN VIRAL

4.2.1 Purificación de SPFMV y SPVG

Para la purificación de SPFMV y SPVG, se empleó el método ya citado por Di Feo *et al.* (2000) (protocolo n°1). Para ello, se utilizó como material vegetal de partida, hojas con síntomas de *I. setosa* inoculadas mediante injertos con SPFMV y SPVG, respectivamente, que fueron cosechadas a los 21 días de la infección y mantenidas a -80 °C en *ultrafreezer*, hasta obtención de 100 g de tejido vegetal para iniciar la purificación.

Las hojas fueron maceradas en licuadora con tampón borato 0,5 M + EDTA 0,01 M (1/2 p/v: 200 ml), luego se adicionó cloroformo, tetracloruro de carbono y ácido tioglicólico en proporción 1/1 p/v. Se centrifugó y la fase acuosa obtenida se sembró en colchón de sacarosa. El pellet obtenido fue resuspendido en tampón borato 0,05 M + EDTA 0,001 M y, tras su ultracentrifugación, fue sembrado en un gradiente de cloruro de cesio (CICs) de

donde se obtuvieron bandas, las cuales fueron dializadas para extraer esta sal (Fig. 7) (Di Feo *et al.* 1992, Di Feo *et al.* 2000).

Por último, se calculó la pureza (A_{260}/A_{280}) y concentración viral (empleando un coeficiente de extinción= 2,5 correspondiente a potyvirus) de cada una de las bandas obtenidas, a través de lecturas espectrofotométricas.

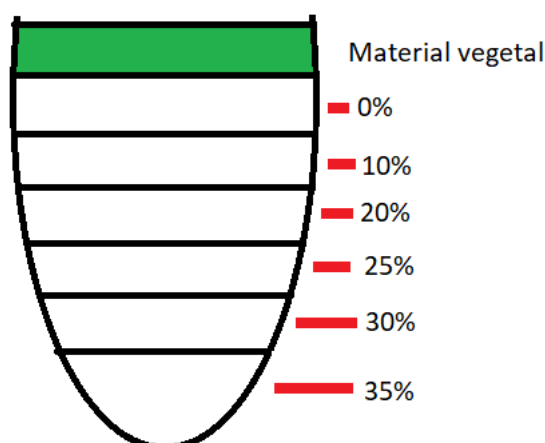


FIGURA 7. Representación del gradiente de CICs.

4.2.2 Trazado de curva patrón de concentración viral para SPFMV y SPVG

Con el objetivo de establecer la concentración viral en los tejidos de *I. setosa* y de batata, se tomó aquella banda que poseía mayor pureza y concentración viral, tanto para **SPFMV** como para **SPVG**. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas en jugo vegetal y en tampón extracción, respectivamente (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/8, 1/9, 1/10, 1/16, 1/20, 1/27, 1/32, 1/40, 1/64, 1/80, 1/81, 1/128, 1/160, 1/243, 1/256, 1/320, 1/512, 1/640, 1/1024, 1/1280, 1/2048, 1/2187, 1/2560, 1/4096, 1/5120 y 1/6561) a los fines de efectuar prueba de DAS-ELISA (protocolo n°2), tomando lecturas de absorbancia a $\lambda=405$ nm (A_{405}) de las distintas diluciones. Finalmente, se elaboró una curva de concentración viral (CV) en base a los valores de A_{405} obtenidos.

4.2.3 Puesta a punto de DAS-ELISA

Con el objetivo de corroborar la dilución de empleo óptima para DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) del antisuero y del conjugado enzimático para SPVG y SPFMV, se confrontaron diferentes diluciones de IgG (1/500 y 1/1.000) y de conjugado enzimático (1/500 y 1/1.000).

Se emplearon como controles positivos, plantas de batata y de *I. setosa* infectadas con SPVG y SPFMV y, como control negativo, plantas sanas de *I. setosa* y batata cvs. Arapey INIA y GEM. Indirectamente, se estimó la concentración viral a través de registros de A₄₀₅ en un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan MS), a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 min de colocado el sustrato en las placas de ELISA, y se consideró el tiempo de incubación en el cual fue máxima la diferencia entre la lectura de A₄₀₅ de los testigos sanos y enfermos.

4.2.4 Determinación de concentración viral

Se determinó la concentración de SPFMV y de SPVG en los tratamientos 1 a 6, a los 7, 15, 21, 30 y 35 días, a partir de la inoculación. Para ello, se recurrió a la prueba serológica de DAS-ELISA, en la que se emplearon antisueros elaborados en IPAVE, previamente calibrados (Gibbs y Ohshima, 2010).

Como se indica en el protocolo n°3, dichas pruebas se llevaron a cabo con los antisueros específicos para SPVG y SPFMV en todos los tratamientos, registrando la absorbancias $\lambda=405\text{nm}$ (A₄₀₅) a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min de colocado el tampón sustrato.

4.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA: Preparados *Dips*

Se recurrió a microscopía electrónica de transmisión (MET) JEOL JEM EX II 1220®, perteneciente al Sistema Nacional de Microscopía (SNM) del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva que se encuentra dentro del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), para comprobar presencia de partículas virales en las bandas obtenidas en la purificación. Se realizaron preparados *dip* de tinción negativa con acetato de uranilo 2%, como lo indica el protocolo n°4.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos para cada día y cultivar, se realizó un análisis de modelo lineal generalizado con función VarIdent: $g(d)=d$ para la variable "tratamientos". El nivel de significancia para este trabajo fue de 0,05 para cada análisis realizado.

Los análisis fueron efectuados con el programa estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2017).

5. RESULTADOS

5.1 INTERACCIÓN ENTRE POTYVIRUS Y CRINIVIRUS

5.1.1 Ensayo de inoculación

En *I. setosa*, se observó un efecto de sinergismo de los tres virus en infecciones triples en relación a las plantas sanas. Para SPFMV (Fig. 8), este efecto se manifestó a los 7 y 15 días posteriores a la infección (PI), con aumento del título de 152 y 93 veces respectivamente, mientras que para SPVG (Fig. 8) el incremento fue mayor a los 15 y 30 días (121 y 58 veces, respectivamente). El aumento de la acumulación de virus se correspondió con la presencia de síntomas y/o el aumento de su severidad en plantas afectadas y permitió su detección serológica.

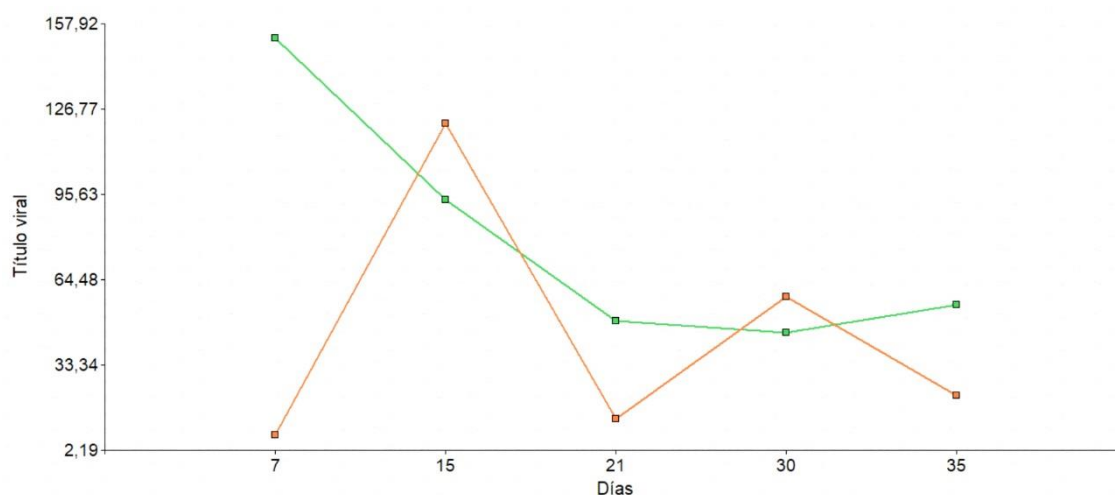


FIGURA 8. Incremento de título viral a los diferentes días, observado en injertos triples (SPFMV + SPVG + SPCSV) en relación a plantas sanas de *I. setosa*. Verde corresponde a SPFMV y naranja a SPVG.

En cv. Arapey INIA, no se manifestó el efecto sinérgico observado en *I. setosa*. Para SPFMV (Fig. 9), en infecciones triples, el mayor aumento del título viral solamente fue de 1,34 y 1,89 veces a los 21 y 35 días respectivamente, mientras que los valores del mismo para SPVG (Fig. 9) resultaron de 3 a los 7 días y de 1,37 a las 30 y 35 días. Sin embargo, la mayor concentración de virus ocurrió en las infecciones dobles entre los dos potyvirus (SPFMV + SPVG), con incrementos de dos veces en el día 35 para SPFMV y de tres veces para SPVG, en el día 7. Esto se manifestó en los síntomas que presentaron las plantas en ambas fechas, mientras que para los injertos triples el cultivar no mostró síntomas o éstos fueron muy leves.

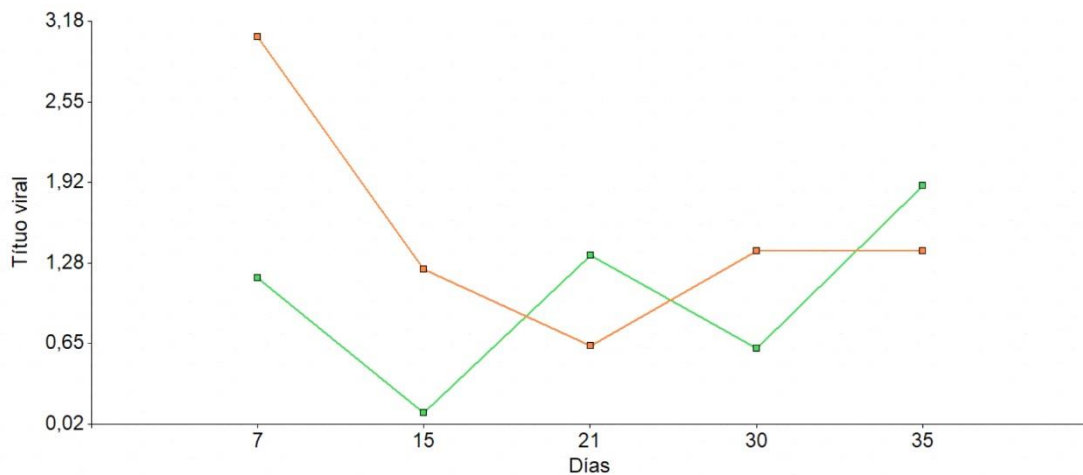


FIGURA 9. Incremento de título viral a los diferentes días, observado en injertos triples (SPFMV + SPVG + SPCSV) en relación a plantas sanas de cv. Arapey INIA. Verde corresponde a SPFMV y naranja SPVG.

Por último, en el cultivar GEM, el efecto sinérgico resultó más notable en comparación al cultivar Arapey INIA. En infecciones triples, el título para SPFMV (Fig. 10) se incrementó 53 veces el día 35 PI, mientras que en SPVG (Fig. 10), el aumento fue de 4,7 veces en el día 7 PI, correspondiendo esto al inicio de la sintomatología observada. En infecciones dobles de SPFMV + SPVG, se observó el mismo incremento del título para SPVG que en la infección simple, pero para SPFMV, éste fue de 2,8 en el día 35. Estos incrementos, menores a los observados en infecciones dobles de cada potyvirus con SPCSV, se reflejaron en los síntomas exhibidos por las plantas.

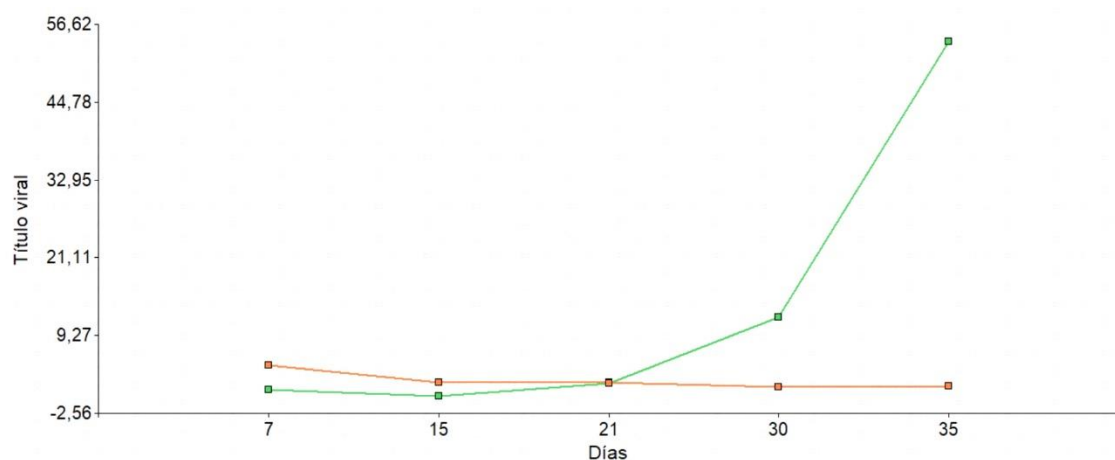


FIGURA 10. Incremento de título viral a los diferentes días, observado en injertos triples (SPFMV + SPVG + SPCSV) en relación a plantas sanas de cv. GEM. Verde corresponde a SPFMV y naranja SPVG.

Cuando se compararon las concentraciones obtenidas en los injertos dobles (con los dos potyvirus) y simples, ninguno de los cultivares evidenció un incremento notable del título para SPFMV y SPVG, tal como se observa en la tabla 1.

	7		15		21		30		35	
	SPFMV	SPVG	SPFMV	SPVG	SPFMV	SPVG	SPFMV	SPVG	SPFMV	SPVG
<i>I. setosa</i>	95,82	31,59	5,42	2,37	0,85	1,01	0,81	0,20	1,16	0,83
Arapey INIA	2,22	2,22	0,20	0,08	0,72	1,30	0,63	1,38	2,68	1,05
GEM	1,46	1,45	0,59	1,53	1,26	2,19	0,74	1,38	1,59	1,38

TABLA 1. Incremento de título viral a los diferentes días y en la indicadora *I. setosa* y los cvs. Arapey INIA y GEM observado en injerto SPFMV + SPVG en relación a injertos simples: SPFMV o SPVG.

5.1.2 Sintomatología observada

5.1.2.1. Injerto simple: SPFMV

Como se describe en la tabla 2, en *I. setosa*, se observó al día 15 PI moteado plumoso en venas secundarias (Fig. 11 C) (bandeado nerval con prolongaciones en forma de plumas) y aclaramiento de nervaduras (Fig. 11 B). Al día 21 PI además, aparecieron mosaico (Fig. 11 D) y puntos cloróticos (Fig. 11 F) en hojas inferiores, con remisión de síntomas a partir del día 35 PI. Severidad grado 1.

En cv. Arapey INIA (Tabla 2) los primeros síntomas se hicieron aparentes el día 30 PI, y sólo se evidenció moteado plumoso en hoja inferior (Fig. 12 B). Severidad grado 1.

Por último, el cv. GEM (Tabla 2) al día 15 PI, presentó vena central prominente (Fig. 13 B y C), aclaramiento de nervaduras junto con distorsión foliar e hiponastia (curvatura de la hoja hacia abajo, debido a que se detiene el crecimiento de la cara abaxial mientras que en la cara adaxial el crecimiento es normal) (Fig. 13 D) al día 35 PI. Severidad grado 1.

SPFMV		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Sin síntomas
15 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso en venas secundarias, aclaramiento de nervaduras en hojas inferiores (Fig. 11 B y C)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Vena central prominente, aclaramiento de nervaduras, distorsión foliar en hoja inferior (Fig. 13 B y C)
21 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso en venas principales, aclaramiento de nervaduras, mosaico y puntos cloróticos en hojas inferiores (Fig. 11 D)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Sin síntomas nuevos
30 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras, mosaico y puntos cloróticos en hojas inferiores (Fig. 11 E y F)
	Arapey INIA	Moteado plumoso en hoja inferior (Fig. 12 B)
	GEM	Sin síntomas nuevos
35 días	<i>I. setosa</i>	Remisión de síntomas
	Arapey INIA	Sin síntomas nuevos
	GEM	Distorsión foliar, venas prominentes, aclaramiento de nervaduras e hiponastia (Fig. 13 D)

TABLA 2. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPFMV.

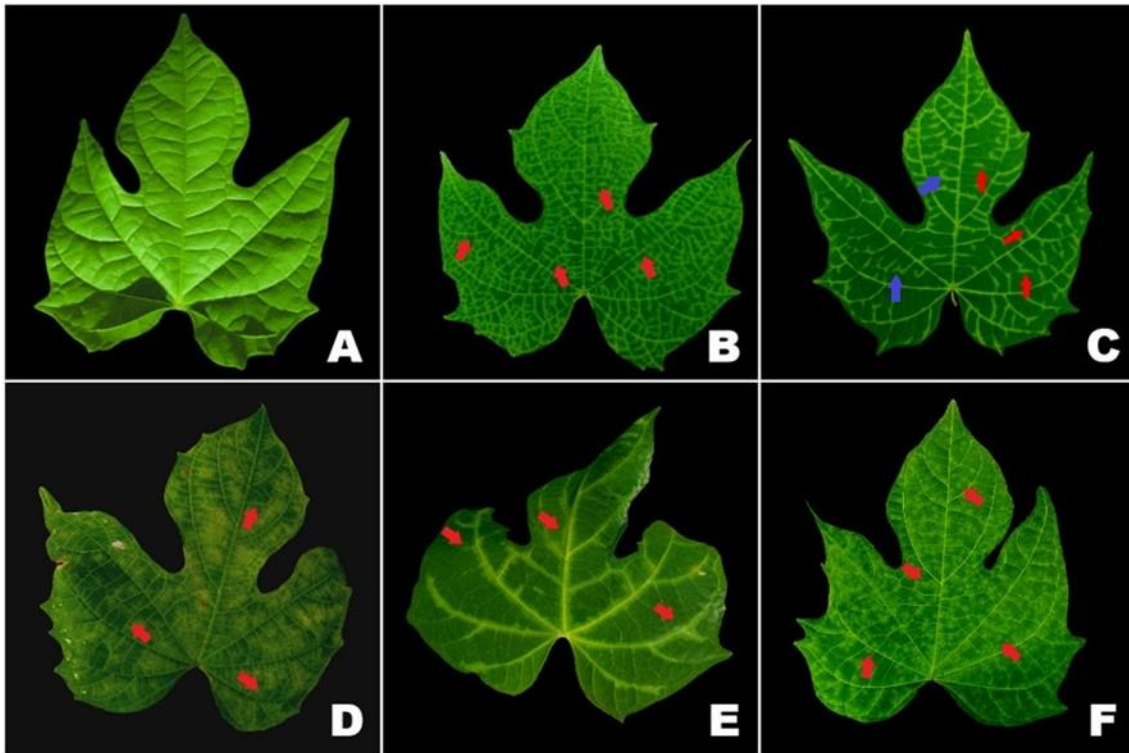


FIGURA 11. Síntomas en *I. setosa* a los 15, 21 30 y 35 días PI con SPFMV. A) Hoja Sana, B) aclaramiento de nervaduras (flechas), C) aclaramiento de venas principales (flechas rojas) e incipiente moteado plumoso (flechas azules) en venas secundarias (flechas), D) mosaico (flechas), E) moteado plumoso en venas principales (flechas) y D) punteado clorótico (flechas).

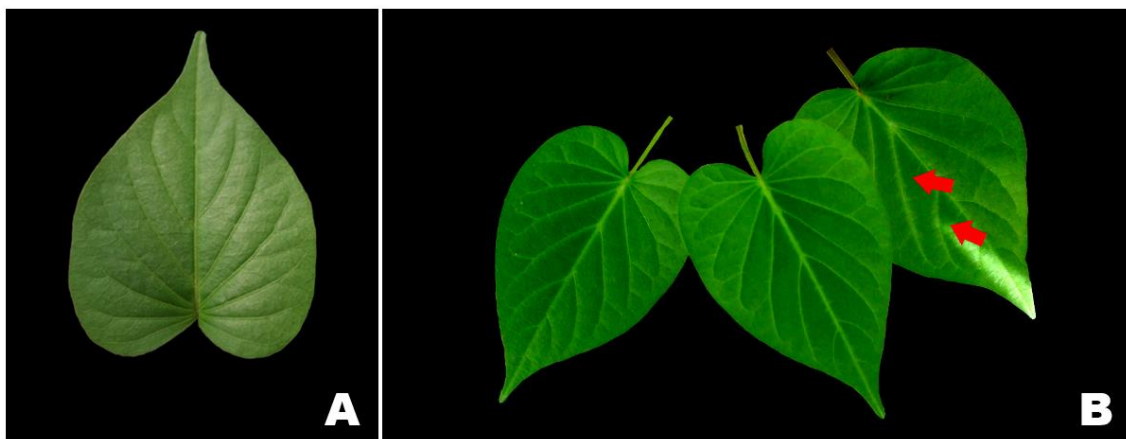


FIGURA 12. Cv. Arapey INIA luego de 30 días PI con SPFMV. A) Hoja sana B) a la izquierda se observan hojas inferiores sin síntomas y a derecha hoja con moteado plumoso (flechas).

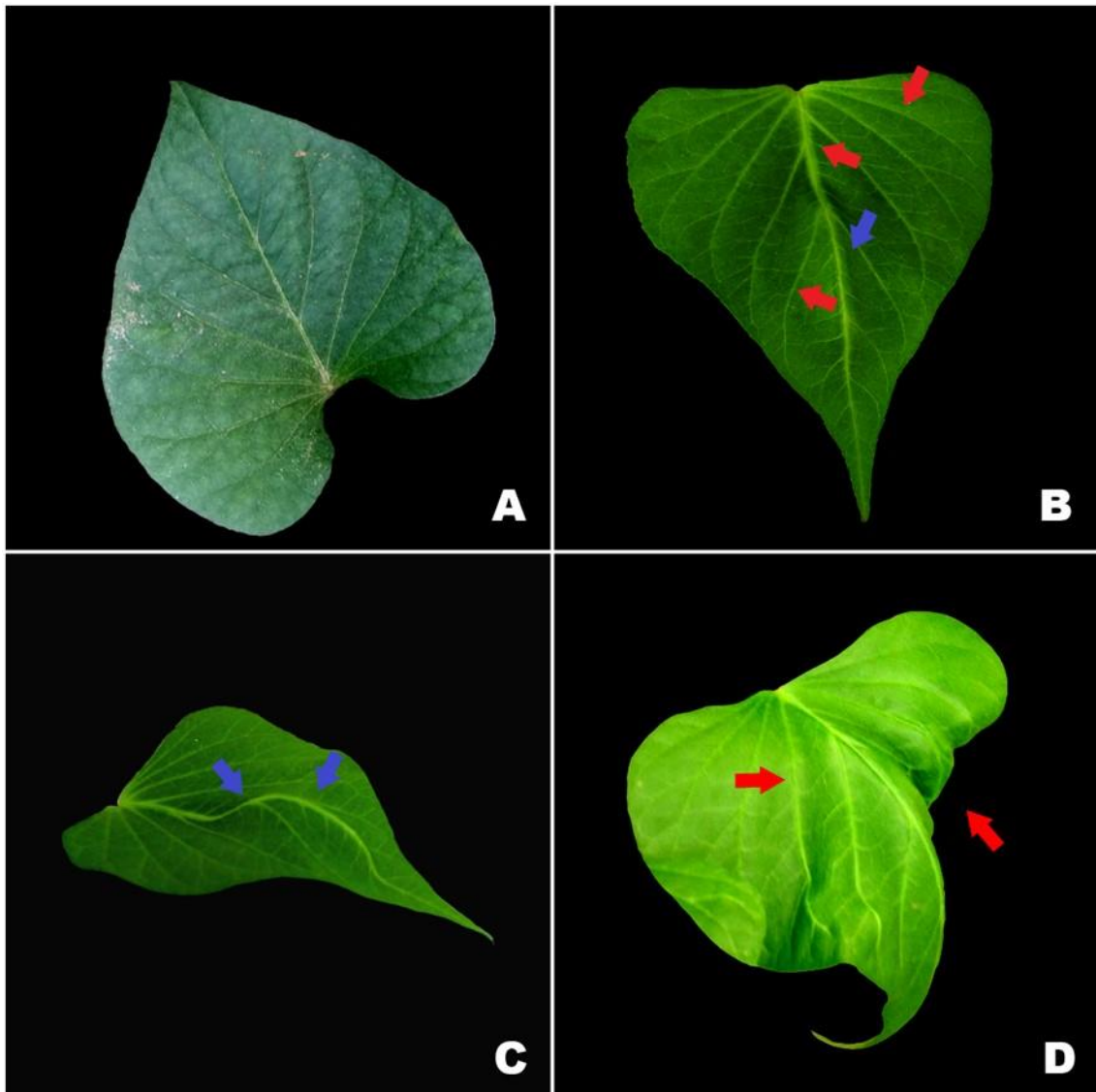


FIGURA 13. Cv. GEM. A) Hoja sana B y C) hoja con vena central prominente (flecha azul), aclaramiento de nervaduras y distorsión foliar (flechas azules) C), observado a los 15 días PI con SPFMV. Frente y costado, respectivamente. D) distorsión foliar (flecha), venas principales prominentes, bandeado nerval (flechas), aclaramiento de nervaduras e hiponastia al día 35 PI.

5.1.2.2 Injerto simple: SPVG

Cuando *I. setosa* se inoculó con SPVG (Tabla 3), presentó aclaramiento de nervaduras al día 15 PI (Fig. 14 B) en hojas inferiores y superiores. Al día 21 PI: moteado plumoso (Fig. 14 C), mosaico, ampollado (Fig. 14 F), y puntos cloróticos (Fig. 14 E) al día 30 PI tanto en hojas inferiores como superiores. Severidad grado 1.

El cv. Arapey INIA (Tabla 3) manifestó aclaramiento de nervaduras (Fig. 15 B) al día 7 PI, luego moteado plumoso en hoja inferior (Fig. 15 D) al día 21 PI y, por último, punteado clorótico al día 30 PI (Fig. 15 C). Severidad grado 1.

En el cv. GEM (Tabla 3), se observaron al día 15 PI, puntos cloróticos e hiponastia en hojas inferiores (Fig. 16 B) y superiores. Al día 21 PI: moteado plumoso (Fig. 16 C) y clorosis internerval. En los días 30 y 35 PI, una marcada hiponastia (Fig. 16 D). Severidad grado 1.

SPVG		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Aclaramiento de nervaduras en hojas inferiores y superiores (Fig. 15 B)
	GEM	Sin síntomas
15 días	<i>I. setosa</i>	Aclaramiento de nervaduras en hojas inferiores y superiores (Fig. 14 B)
	Arapey INIA	Sin nuevos síntomas
	GEM	Puntos cloróticos e hiponastia en hoja inferior (Fig. 16 B)
21 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras y leve distorsión de hoja inferior (Fig. 14 C y D)
	Arapey INIA	Leve moteado plumoso en hoja inferior (Fig. 15 D)
	GEM	Moteado plumoso y clorosis internerval en hoja inferior (Fig. 16 C)
30 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, ampollado y puntos cloróticos en hojas inferiores y superiores (Fig. 14 E y F)
	Arapey INIA	Puntos cloróticos en hoja inferior (Fig. 15 C)
	GEM	Hiponastia en hoja inferior (Fig. 16 D)
35 días	<i>I. setosa</i>	Sin nuevos síntomas
	Arapey INIA	Sin nuevos síntomas
	GEM	Marcada hiponastia en hojas inferiores (Fig. 16 D)

TABLA 3. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPVG.

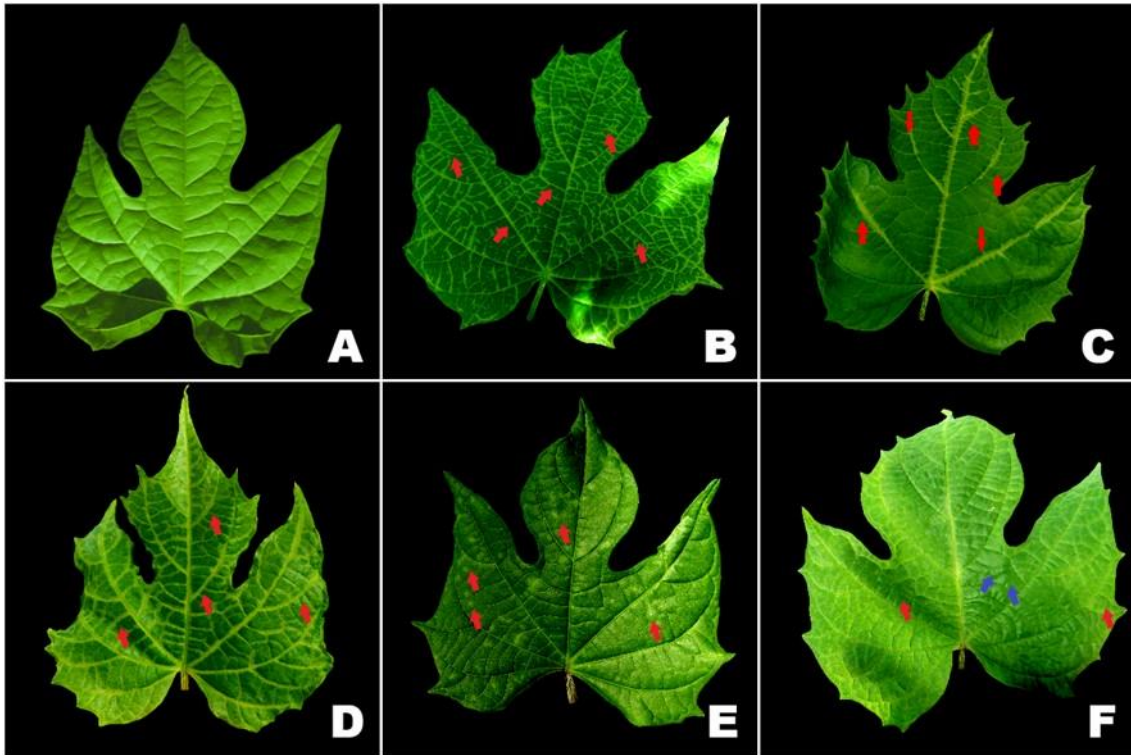


FIGURA 14. Síntomas en *I. setosa* ocasionados por SPVG. A) Hoja sana, B) aclaramiento de nervaduras (flechas) observado al día 15 PI, C) moteado plumoso en venas principales (flechas) (día 21 PI), D) aclaramiento de nervaduras (flechas) (día 21 PI), E) punteado clorótico (flechas) observado al día 30 PI y F) mosaico (flechas rojas) y ampollado (flechas azules) en hoja media al día 35 PI.

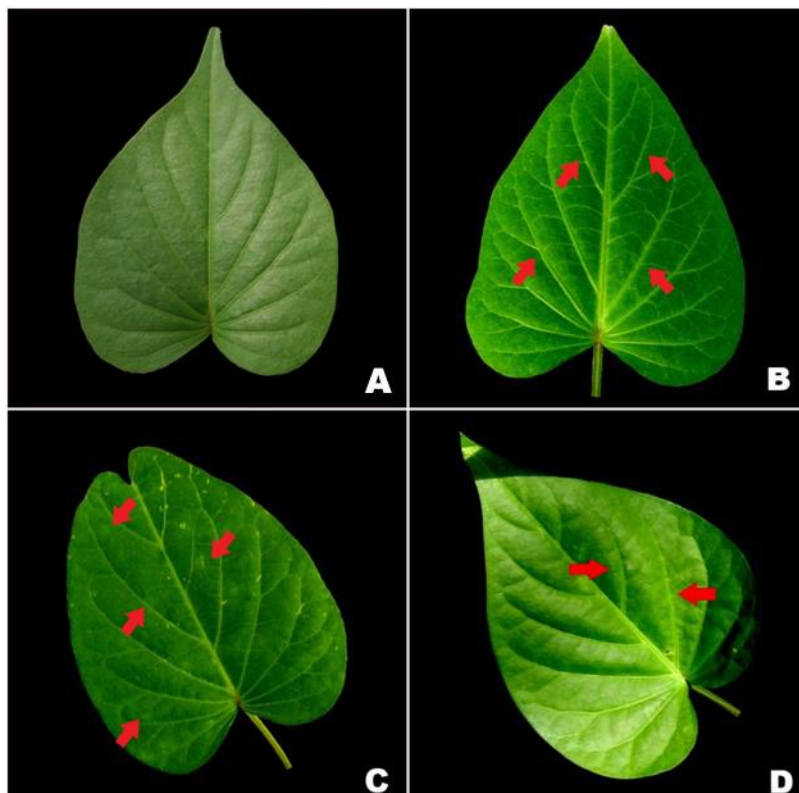


FIGURA 15. Síntomas observados en cv. Arapey INIA luego de inoculado con SPVG. A) Hoja sana, B) aclaramiento de nervaduras (flechas) en hoja inferior observado al día 7 PI, C) día 21 PI presenta leve punteado clorótico (flechas) y D) al día 30 PI se observa moteado plumoso suave (flechas).

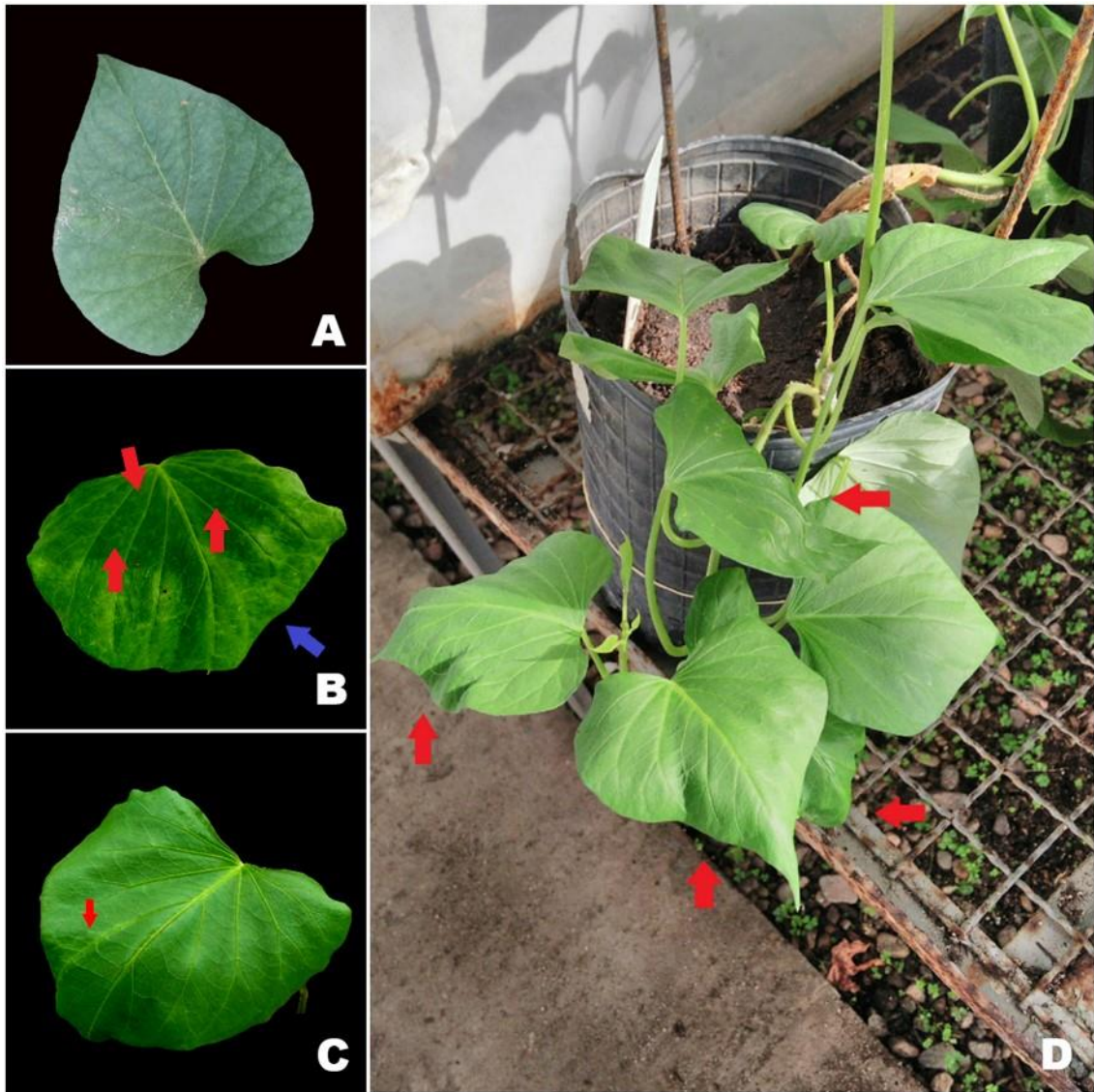


FIGURA 16. Cv. GEM inoculado con SPVG. A) Hoja sana, B) punteado clorótico (flechas rojas) e hiponastia (flecha azul) en hoja inferior C) moteado plumoso (flecha) observado al día 21 y D) marcada hiponastia (flechas) desarrollada a los días 30 y 35.

5.1.2.3 Injerto doble: SPFMV + SPCSV

Tal como se muestra en la tabla 4, en *I. setosa* se revelaron los primeros síntomas al día 21 PI: mosaico (Fig. 17 B), moteado plumoso (Fig. 17 C), puntos cloróticos (Fig. 17 D) y cordón de zapato (a medida que se avanza en la guía, las hojas disminuyen su área foliar, quedando reducidas a las nervaduras y finalmente a protuberancias) (Fig. 17 E). Al día 30 PI se observó además, disminución de dos veces (Fig. 17 F) y distorsión del área foliar, bandeado nerval clorótico y ampollado. Severidad grado 2.

El cv. Arapey INIA no mostró síntomas. Severidad grado 0.

Por último, el cv. GEM (tabla 4) desarrolló clorosis generalizada, mosaico (Fig. 18 B y C), puntos cloróticos (Fig. 18 B) y moteado plumoso en hojas inferiores (Fig. 18 D) al día 15. Además, al día 21: hiponastia y venas prominentes (Fig. 18 G) y al día 35: distorsión y deformación de lámina foliar. Severidad grado 2.

SPFMV + SPCSV		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Sin síntomas
15 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Clorosis generalizada, mosaico, puntos cloróticos y leve moteado plumoso en hojas inferiores (Fig. 18 B, C y D)
21 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso, puntos cloróticos y cordón de zapato (Fig. 17 B y D)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Moteado plumoso en hojas nuevas, puntos cloróticos, hiponastia, venas prominentes, bandeado nerval clorótico (Fig. 18 E y F)
30 días	<i>I. setosa</i>	Disminución área foliar, bandeado nerval clorótico, mosaico, ampollado y distorsión foliar, cordón de zapato (Fig. 17 C)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Moteado plumoso, puntos cloróticos e hiponastia (Fig. 18 G)
35 días	<i>I. setosa</i>	Cordón de zapato (Fig. 17 E y F)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Distorsión foliar, venas prominentes, clorosis, aclaramiento de nervaduras y deformación de lámina foliar (Fig. 18 H e I)

TABLA 4. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPFMV y SPCSV.

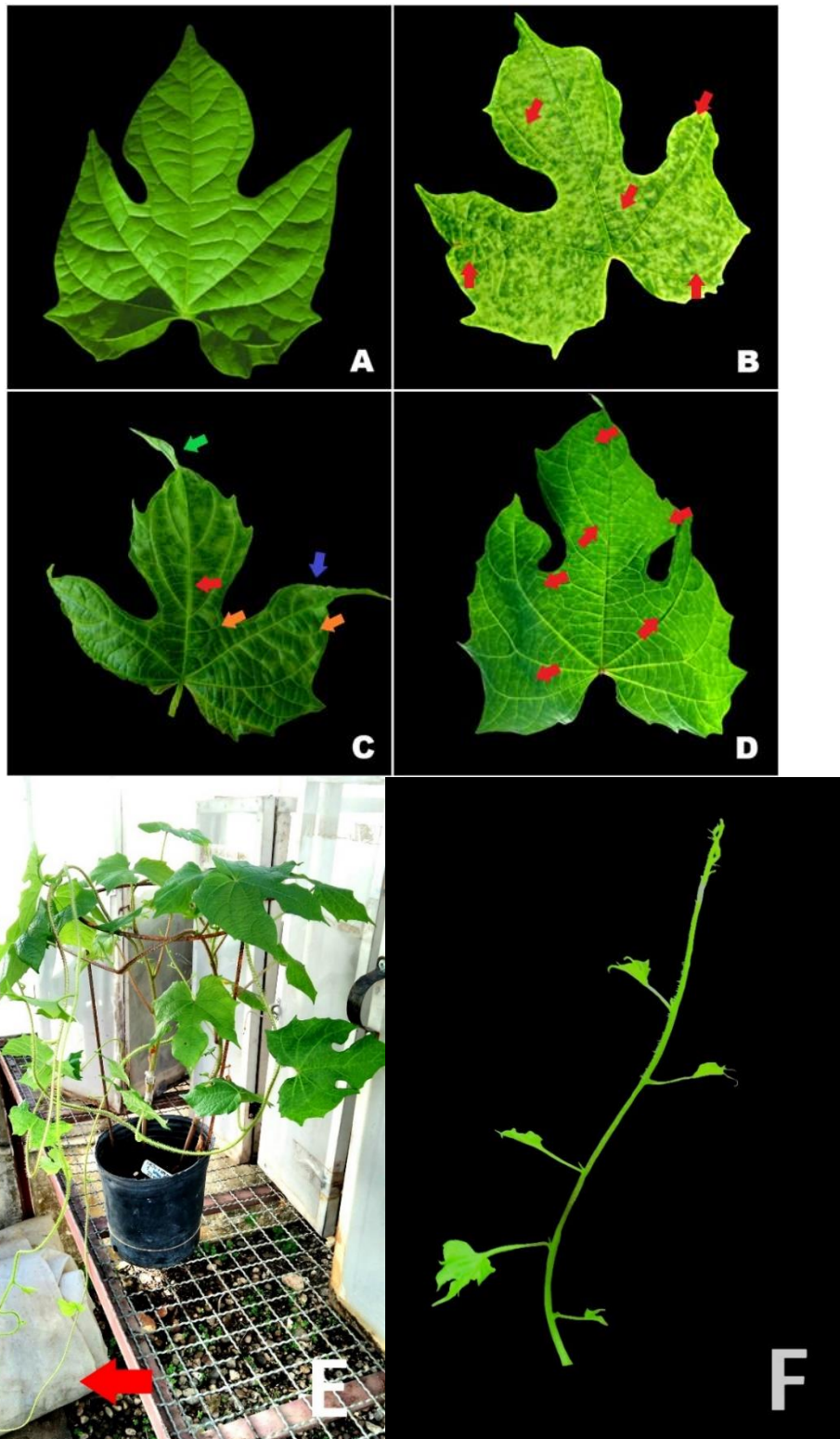


FIGURA. 17. Síntomas de complejo viral observados en *I. setosa* a los días 21, 30 y 35 de ser inoculado con SPFMV + SPCSV. A) Hoja sana, B) mosaico (flechas), C) disminución del área foliar, bandeado nerval clorótico (flecha roja), mosaico (flecha azul), ampollado (flechas naranjas) y distorsión de la hoja (flecha verde) D) punteado clorótico (flechas), E) cordón de zapato (flechas), quedando reducidas a las nervaduras y finalmente a protuberancias y F) disminución de área foliar progresiva.

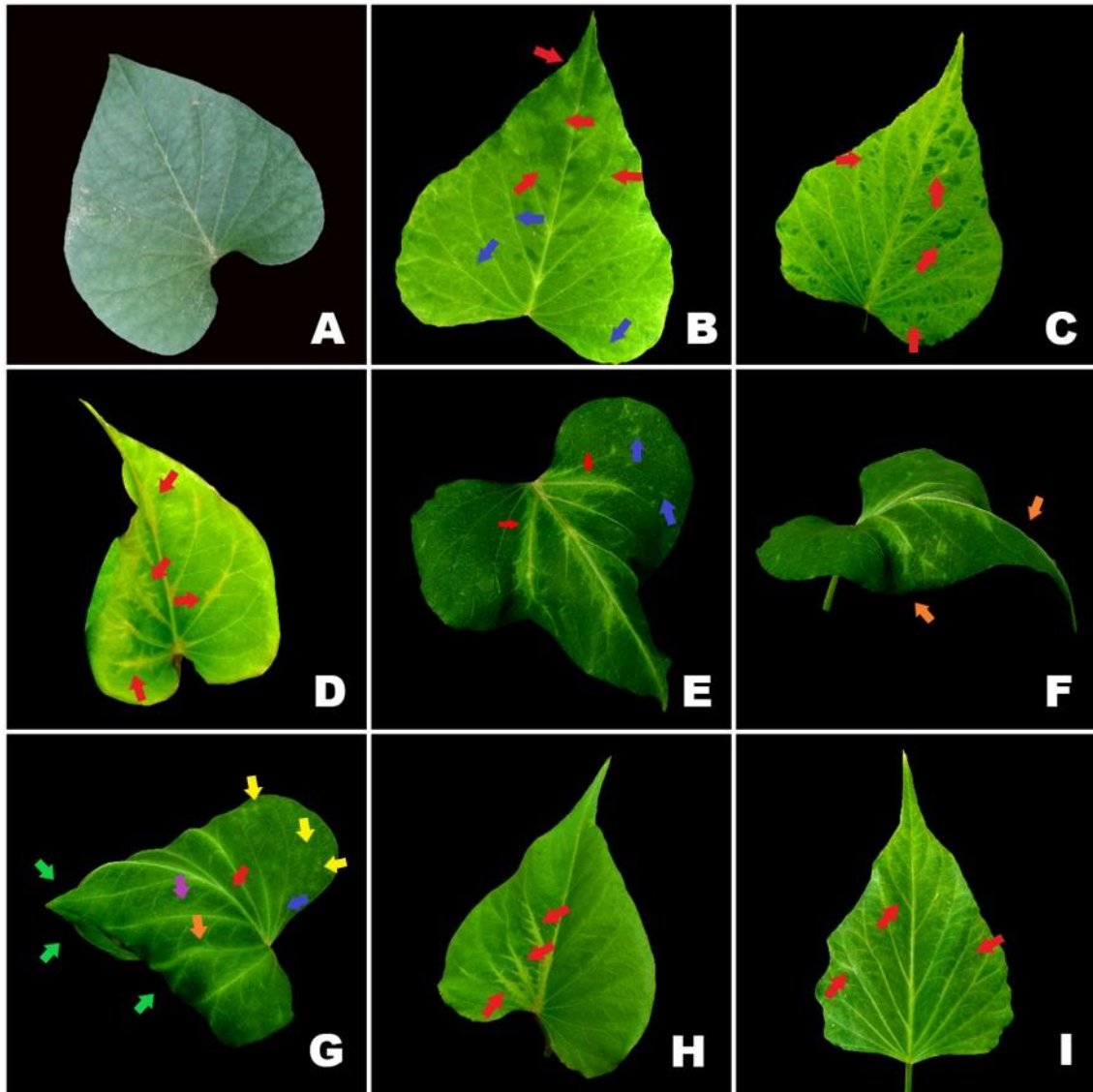


FIGURA 18. Cv. GEM inoculado con SPFMV + SPCSV. A) Hoja sana, B) se observa mosaico (flechas rojas) y leves puntos cloróticos (flechas azules) (día 15 PI), C) clorosis generalizada y mosaico (flechas rojas) (día 15 PI), D) moteado plumoso (flechas) en venas principales (día 15 PI), E) y F) frente y costado donde se observa marcado moteado plumoso (flechas rojas) en venas principales, puntos cloróticos (flechas azules) e hiponastia (flechas naranjas), G) nervaduras prominentes (flecha roja), aclaramiento de nervaduras (flecha azul), bandeado nerval clorótico (flecha naranja), moteado plumoso (flecha violeta), puntos cloróticos (flechas amarillas) y marcada hiponastia (flechas verdes), H) moteado plumoso (flechas) en lado izquierdo de hoja e I) aclaramiento de nervaduras (flechas). Estos síntomas fueron observados a los 21, 30 y 35 días PI.

5.1.2.4 Injerto doble: SPVG + SPCSV

I. setosa, tal como se describe en la tabla 5, mostró sus primeros síntomas al día 21 PI: puntos cloróticos y mosaico (Fig. 19 B y C). A los días 30 y 35 PI, también se observó moteado plumoso (Fig. 19 D), aclaramiento de nervaduras (Fig. 19 E) y cordón de zapato (Fig. 19 F y G). Severidad grado 2.

El cv. Arapey INIA (tabla 5), al día 7 PI, manifestó leve aclaramiento de nervaduras y punteado clorótico (Fig. 20 B), además, al día 21 se observó moteado plumoso (Fig. 20 C). A los días 30 y 35 PI, también presentó cordón de zapato (Fig. 20 D). Severidad grado 2.

Al día 7 PI, en el cv. GEM (tabla 5), se observó mosaico y aclaramiento de nervaduras (Fig. 21 B), además a los días 30 y 35, desarrolló cordón de zapato (Fig. 21 C). Severidad grado 2.

SPVG + SPCSV		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Leve aclaramiento de nervaduras y punteado clorótico (Fig. 20 B)
	GEM	Mosaico y aclaramiento de nervaduras (Fig. 21 B)
15 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Suave aclaramiento de nervaduras, punto clorótico y moteado plumoso (Fig. 20 B)
	GEM	Sin síntomas nuevos
21 días	<i>I. setosa</i>	Puntos cloróticos y mosaico (Fig. 19 B y C)
	Arapey INIA	Sin síntomas nuevos
	GEM	Alargamiento de entrenudos (Fig. 21 C)
30 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras y cordón de zapato (Fig. 19 D y E)
	Arapey INIA	Moteado plumoso (Fig. 20 C)
	GEM	Cordón de zapato
35 días	<i>I. setosa</i>	Puntos cloróticos, moteado plumoso y cordón de zapato (Fig. 19 F y G)
	Arapey INIA	Moteado plumoso y cordón de zapato (Fig. 20 D)
	GEM	Moteado plumoso y cordón de zapato (Fig. 21 C)

TABLA 5. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPVG y SPCSV.

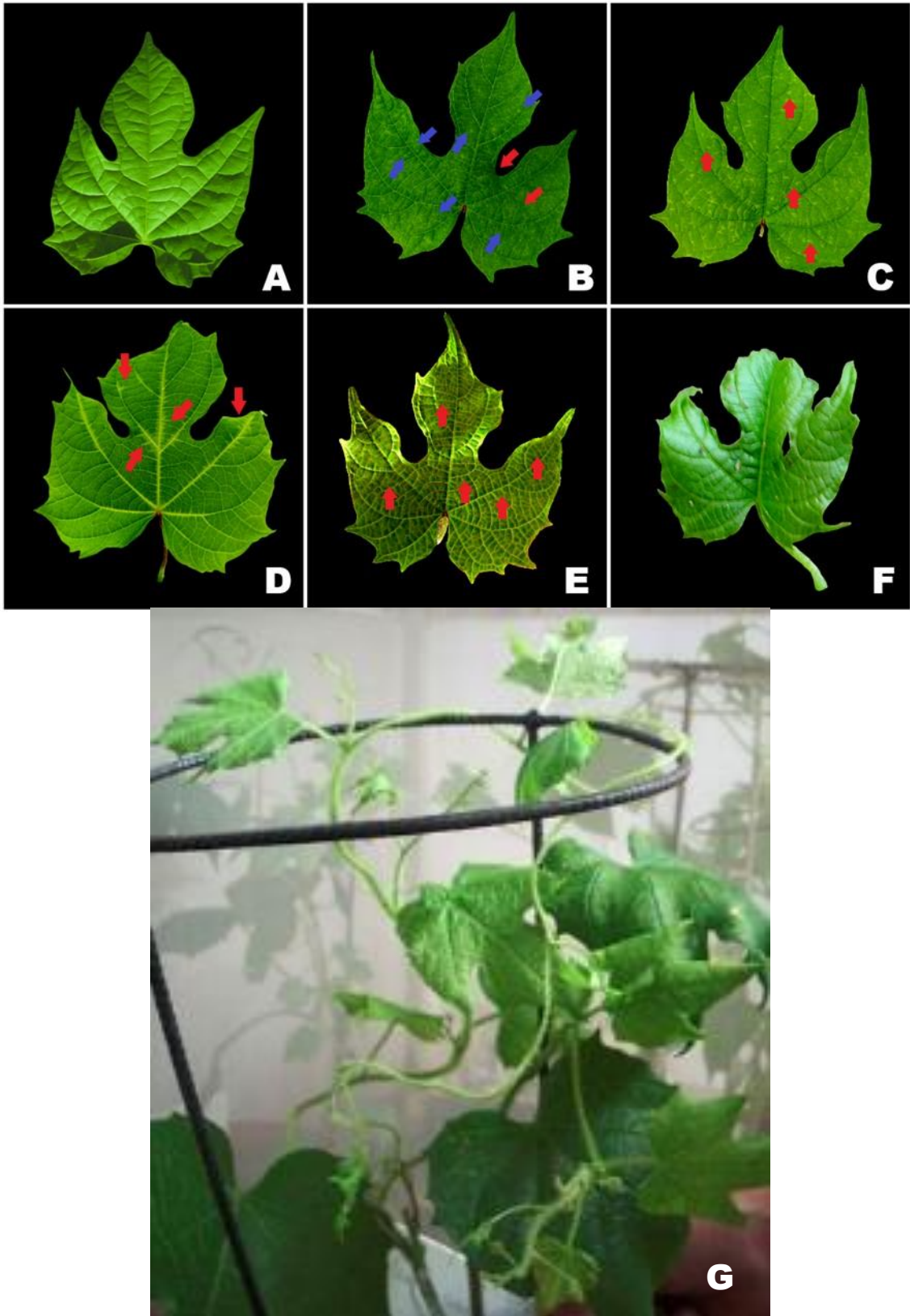


FIGURA 19. Síntomas observados al inocular SPVG + SPCSV a los días 21, 30 y 35. A) Hoja sana *I. setosa*, B) mosaico (flechas rojas) e incipiente punteado clorótico (flechas azules), C) punteado clorótico (flechas), D) moteado plumoso (flechas) en venas principales, E) aclaramiento de nervaduras (flechas), F) disminución de dos veces del área foliar y G) cordón de zapato con disminución del área foliar observado al día 35 PI.

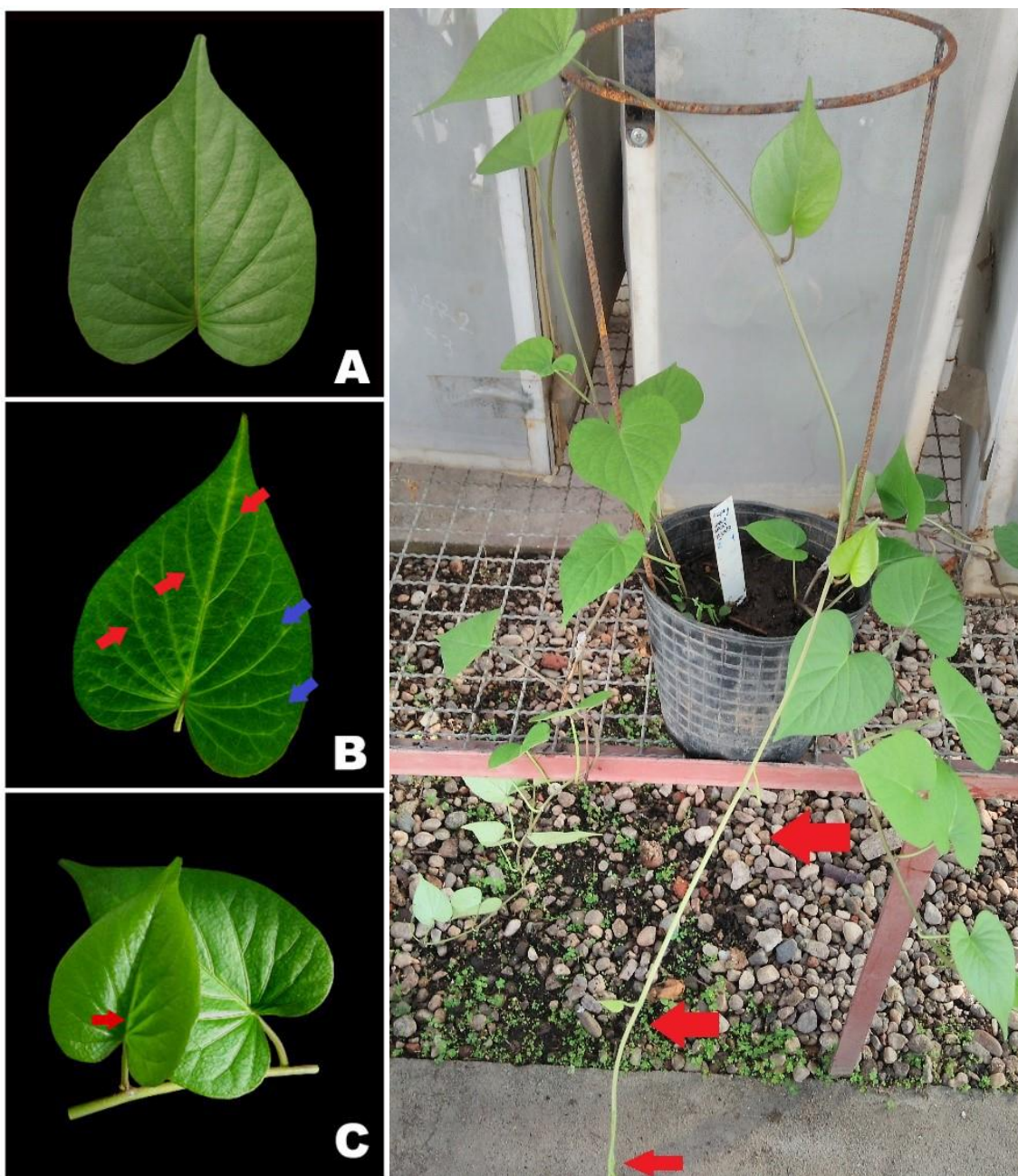


FIGURA 20. Síntomas observados al inocular SPVG + SPCSV. A) Hoja sana cv. Arapey INIA, B) aclaramiento de nervaduras (flechas rojas) y puntos cloróticos (flechas azules) presentados al día 7 PI, C) leve moteado plumoso (flecha) que se observa en la mitad derecha de hoja, D) cordón de zapato (flechas) observado a los días 30 y 35 PI.

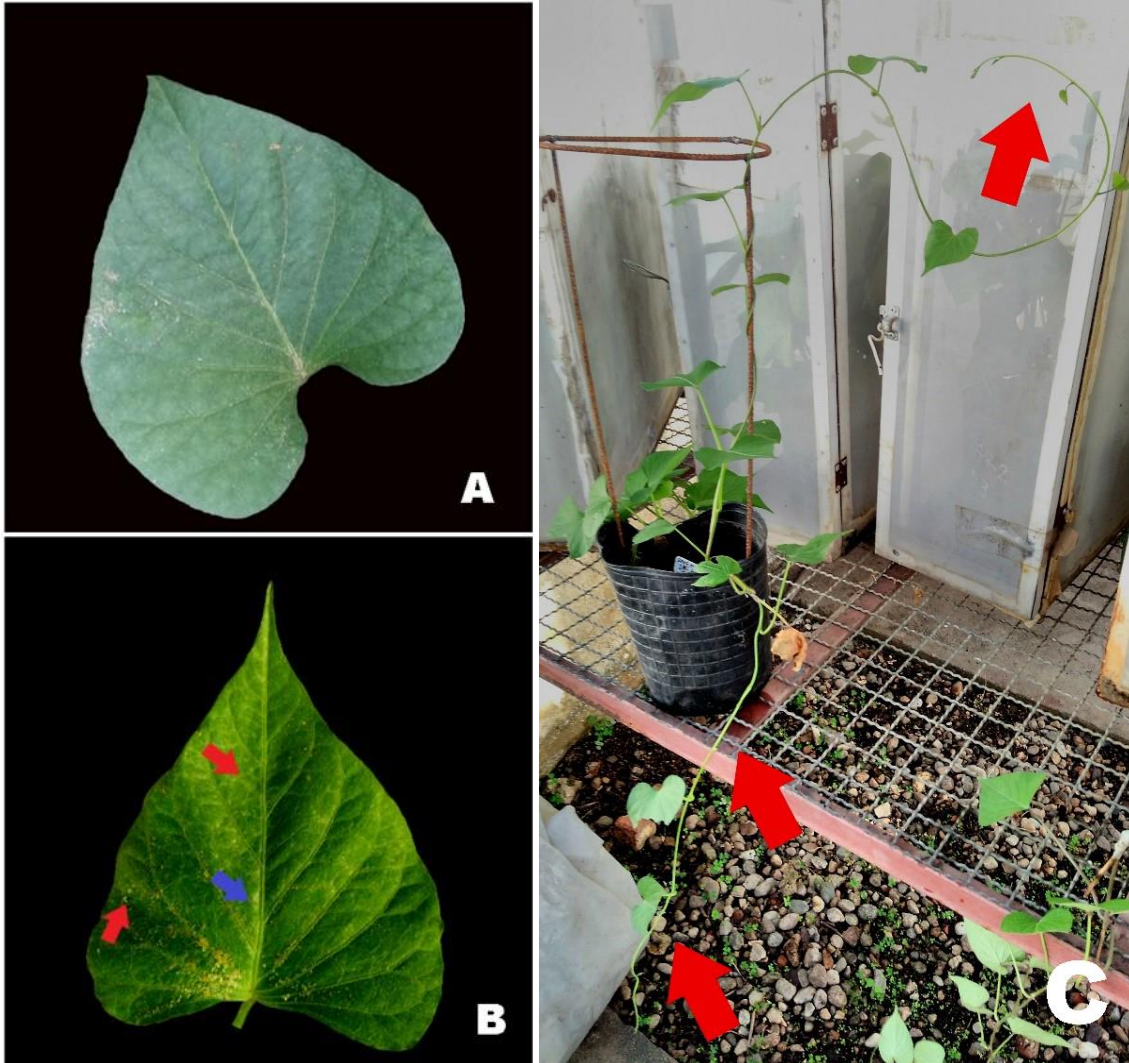


FIGURA 21. Síntomas observados al inocular SPVG + SPCSV en cv. GEM. A) Hoja sana, B) aclaramiento de nervadura (flecha azul) y mosaico (flechas rojas) al día 7 PI y C) cordón de zapato (flechas) presentado a los días 30 y 35 PI.

5.1.2.5 Injerto doble: SPFMV + SPVG

Como se describe en la tabla 6, *I. setosa*, al día 15 PI manifestó mosaico (Fig. 22 C), moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras y puntos cloróticos (Fig. 22 B), además bandeado nerval clorótico (Fig. 22 D) y deformación de lámina foliar a los días 30 y 35 PI (Fig. 22 F). Severidad grado 2.

El cv. Arapey INIA (tabla 6), desarrolló solamente puntos cloróticos al día 21 PI (Fig. 23 B). Severidad grado 1.

El cv. GEM (tabla 6) al día 15 PI, evidenció aclaramiento de nervaduras, engrosamiento de venas principales e hiponastia en hoja inferior (Fig. 24 B) y al día 21 PI: puntos cloróticos (Fig. 24 C). Severidad grado 2.

SPFMV +SPVG		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Sin síntomas
15 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso en venas principales, aclaramiento de nervaduras y puntos cloróticos (Fig. 22 B)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Aclaramiento de nervaduras, engrosamiento de venas principales e hiponastia en hoja inferior (Fig. 24 B)
21 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras, bandeado nerval clorótico y puntos cloróticos (Fig. 22 C y D)
	Arapey INIA	Puntos cloróticos en hoja inferior (Fig. 23 B)
	GEM	Puntos cloróticos (Fig. 24 C)
30 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, clorosis generalizada y deformación lámina foliar (Fig. 22 E)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Puntos cloróticos e hiponastia en hoja inferior (Fig. 24 C)
35 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras, puntos cloróticos, clorosis generalizada y deformación de hoja (Fig. 22 F)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Hiponastia en hojas inferiores (Fig. 24 D)

TABLA 6. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPFMV y SPVG.

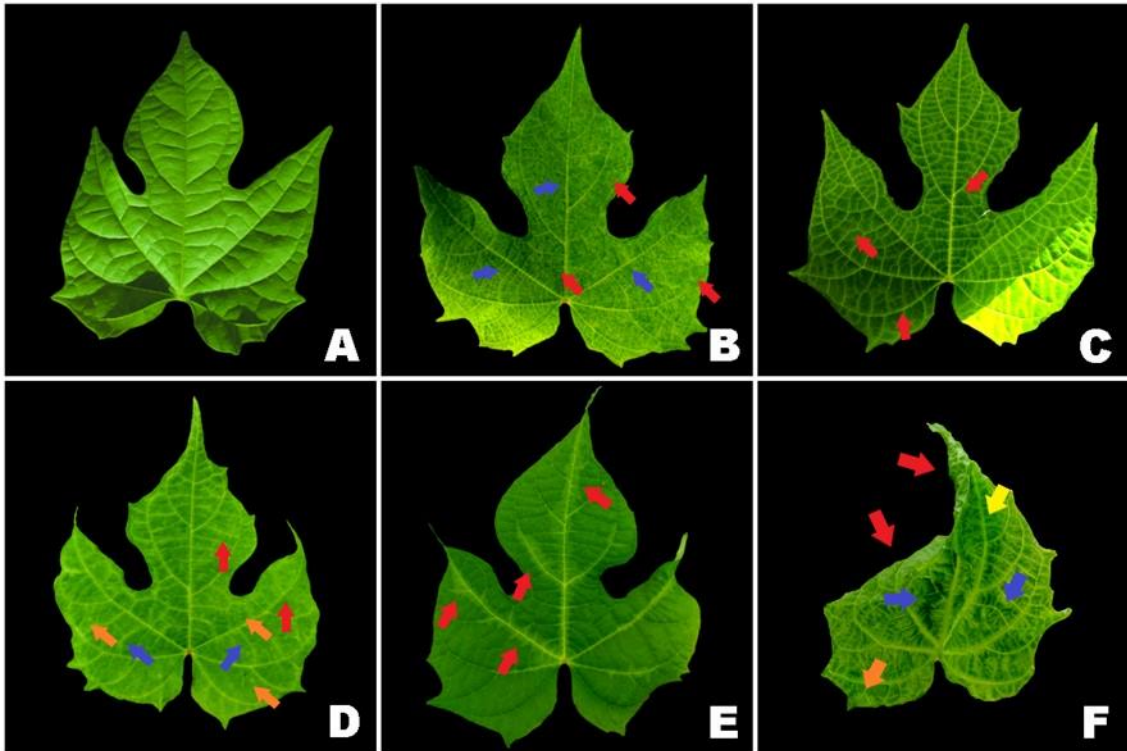


FIGURA 22. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG en *I. setosa*. A) Hoja sana B) punteado clorótico (flechas rojas) y aclaramiento de nervadura (flechas azules) presentado al día 15 PI, C) mosaico (flechas), D) moteado plumoso (flechas rojas), bandeado nerval clorótico (flechas azules) y puntuado clorótico (flechas naranjas) observado al día 21 PI, E) moteado plumoso (flechas) en venas principales y F) deformación de lámina foliar (flechas rojas), mosaico (flechas azules), moteado plumoso (flecha naranja) y aclaramiento de nervadura (flecha amarilla) al día 35 PI.

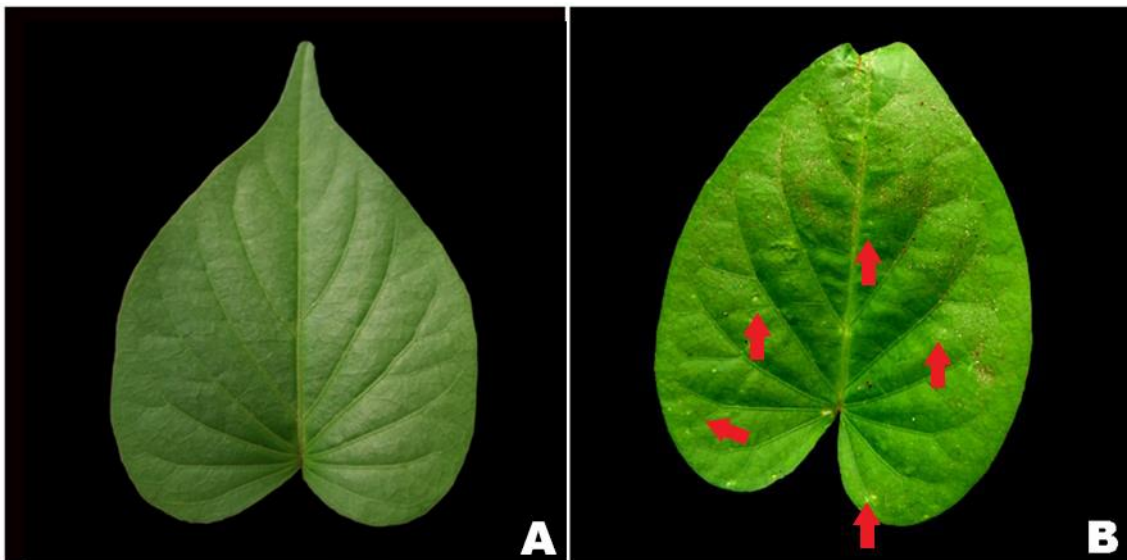


FIGURA 23. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG en cv. Arapey INIA. A) Hoja sana B) puntos cloróticos (flechas) presentes al día 21 PI.

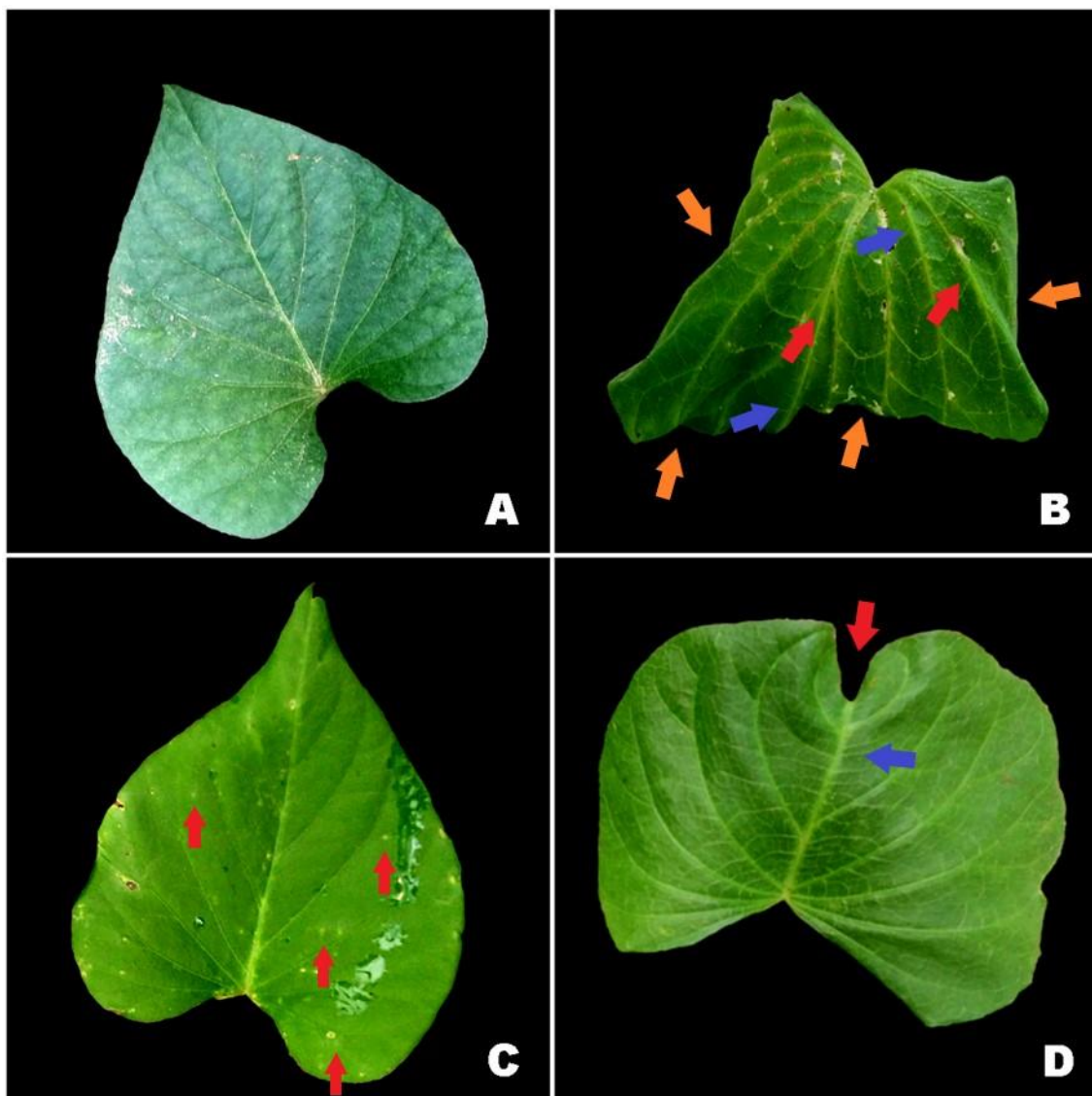


FIGURA 24. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG en cv. GEM. A) Hoja sana B) aclaramiento de nervadura (flechas rojas), engrosamiento de venas principales (flechas azules) e hiponastia (flechas naranjas) observado al día 15 PI en hoja inferior, C) puntos cloróticos (flechas) presentes al día 21 PI y D) hiponastia (flecha roja) y aclaramiento de venas (flecha azul) en hoja inferior presente a los días 30 y 35 PI.

5.1.2.6 Injerto triple: SPFMV + SPVG + SPCSV

I. setosa, tal como se muestra en la tabla 7, presentó los primeros síntomas a los días 15 y 21 PI: mosaico (Fig. 25 D), moteado plumoso (Fig. 25 E), aclaramiento de nervaduras (Fig. 25 B) y deformación de lámina foliar (Fig. 25 C) en hojas superiores e inferiores. A los días 30 y 35 PI, también se observó cordón de zapato (Fig. 25 K). Severidad grado 3.

El cv. Arapey INIA (tabla 7) a partir del día 7 PI, exhibió principalmente punteado clorótico en hojas inferiores y superiores (Fig. 26 C, D y E). También aclaramiento de nervaduras (Fig. 26 B) y moteado plumoso (Fig. 26 F) a los días 7 y 30 PI, respectivamente. Severidad grado 2.

Por último, el cv. GEM (tabla 7), mostró síntomas a partir del día 7 PI: incipiente moteado (Fig. 27 C) plumoso, deformación de lámina foliar y engrosamiento de nervadura (Fig. 27 B). A los días 15 y 21 PI, además, punteado clorótico (Fig. 27 D y F), mosaico (Fig. 27 H) y aclaramiento de nervaduras (Fig. 27 N) a los días 30 y 35. Severidad grado 3.

SPFMV + SPVG + SPCSV		
	Cultivar	Síntomas
7 días	<i>I. setosa</i>	Sin síntomas
	Arapey INIA	Aclaramiento de nervaduras, puntos cloróticos en hojas inferiores (Fig. 26 B y C)
	GEM	Incipiente moteado plumoso, deformación lámina foliar y engrosamiento de nervaduras (Fig. 27 B y C)
15 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras y deformación lámina foliar en hojas inferiores y superiores (Fig. 25 B y C)
	Arapey INIA	Puntos cloróticos en hoja superior e inferior (Fig. 26 D)
	GEM	Puntos cloróticos en hoja inferior y engrosamiento de nervaduras (Fig. 27 D y E)
21 días	<i>I. setosa</i>	Mosaico, moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras y deformación lámina foliar (Fig. 25 D, E y F)
	Arapey INIA	Puntos cloróticos (Fig. 26 E)
	GEM	Puntos cloróticos en hoja inferior, engrosamiento de nervaduras e hiponastia en hoja superior (Fig. 27 F y G)
30 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, mosaico, aclaramiento de nervaduras, ampollado, deformación y reducción de lámina foliar y cordón de zapato (Fig. 25 G, H e I)
	Arapey INIA	Moteado plumoso y puntos cloróticos (Fig. 26 F)
	GEM	Mosaico, moteado plumoso y puntos cloróticos (Fig. 27 H, I y J)
35 días	<i>I. setosa</i>	Moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras, puntos cloróticos y cordón de zapato (Fig. 25 J y K)
	Arapey INIA	Sin síntomas
	GEM	Mosaico, moteado plumoso, aclaramiento de venas principales e hiponastia en hojas superiores e inferiores (Fig. 27 K, L, M y N)

TABLA 7. Síntomas observados en *I. setosa* y en los cvs. Arapey INIA y GEM injertados con SPFMV, SPVG y SPCSV.

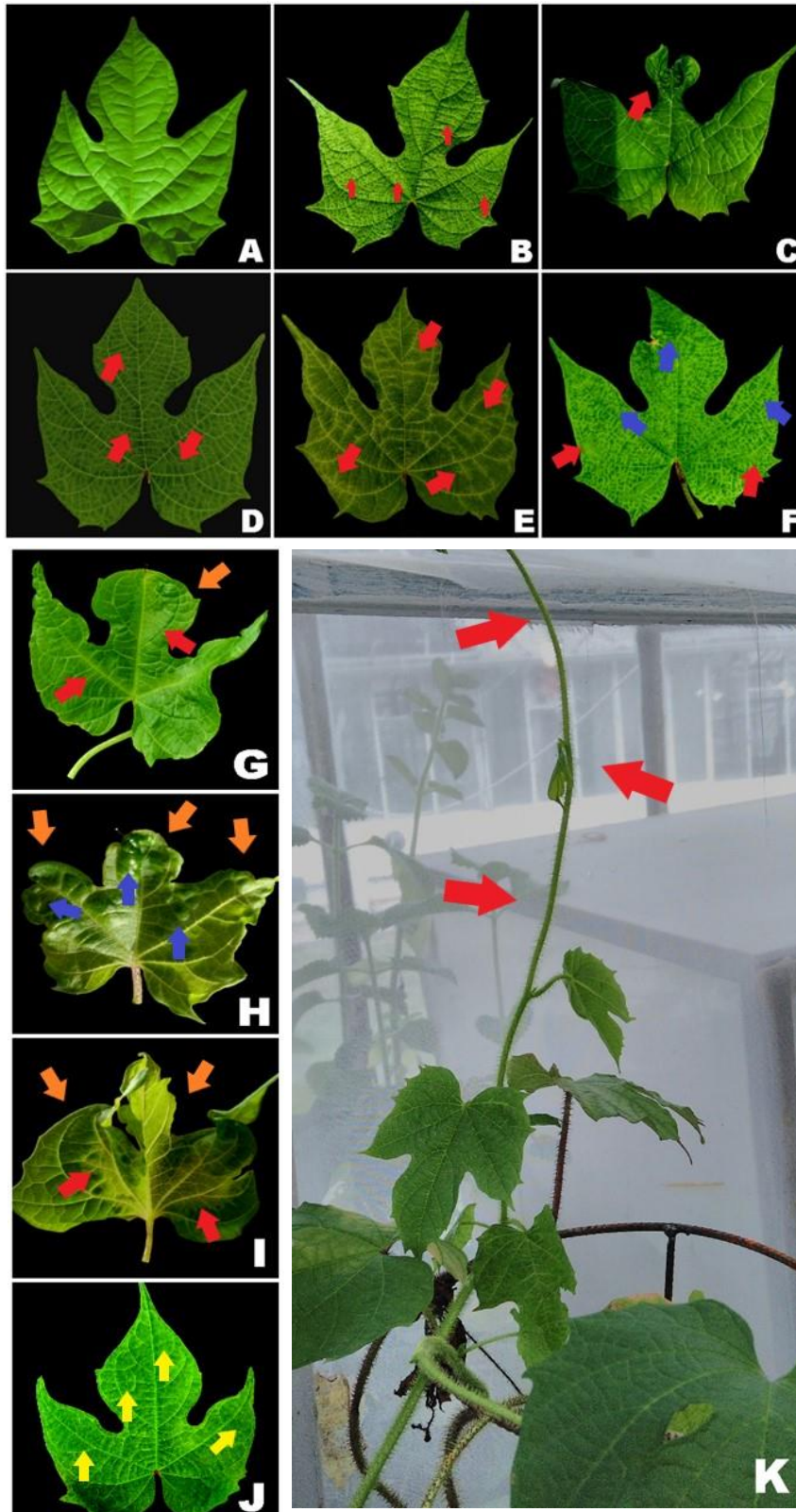


FIGURA 25. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG + SPCSV en *I. setosa*. A) Hoja sana B) aclaramiento de nervaduras (flechas) observado al día 15 PI en hoja inferior, C) deformación lámina foliar (flecha), D) mosaico (flechas), E) moteado plumoso (flechas), F) moteado plumoso (flechas rojas) y mosaico (flechas azules) presente al día 21 PI, G, H y I) se observa reducción de tres veces y distorsión (flechas naranjas) severa de lámina foliar, moteado plumoso (flechas rojas) en venas principales además de ampollado (flechas azules), en la figura H, síntomas presentes al día 30 y 35 PI, J) punteado clorótico (flechas amarillas) y K) cordón de zapato (flechas).

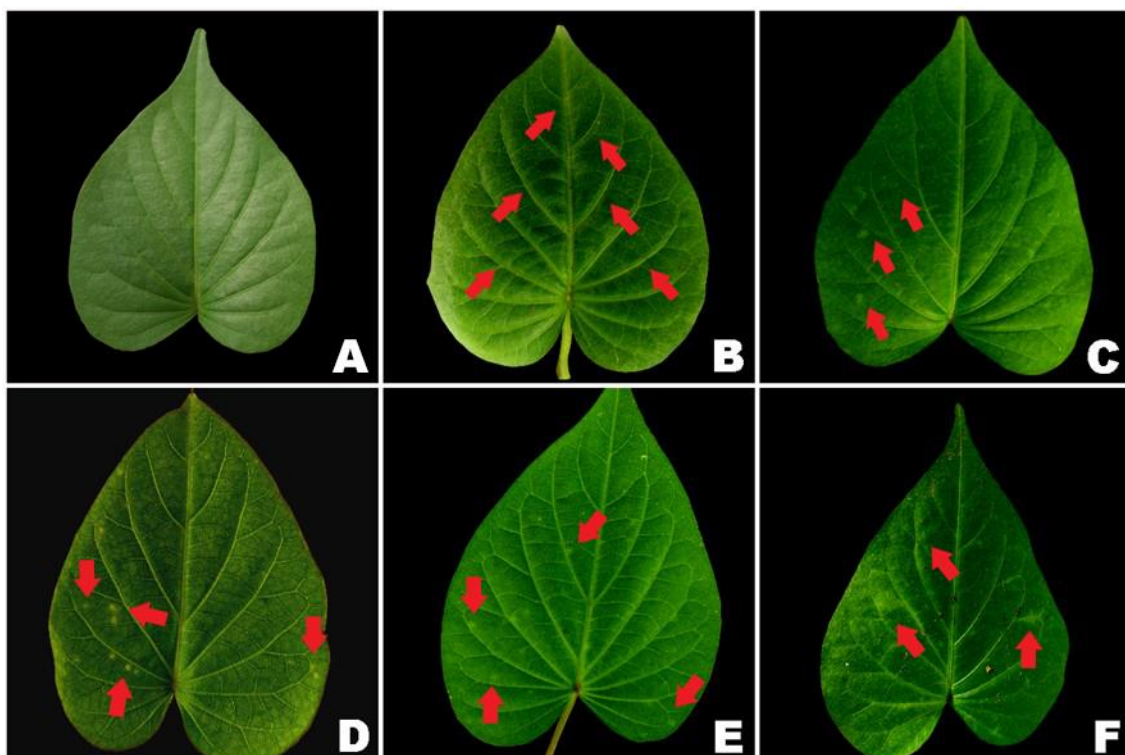


FIGURA 26. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG + SPCSV en cv. Arapey INIA. A) Hoja sana, B) aclaramiento de nervadura (flechas) observado al día 7 PI en hoja inferior, C) puntos cloróticos (flechas) en hoja inferior, D) puntos cloróticos (flechas) presentes al día 15 PI en hoja inferior, E) puntos cloróticos (flechas) al día 30 PI y F) moteado plumoso (flechas) al día 30 PI.

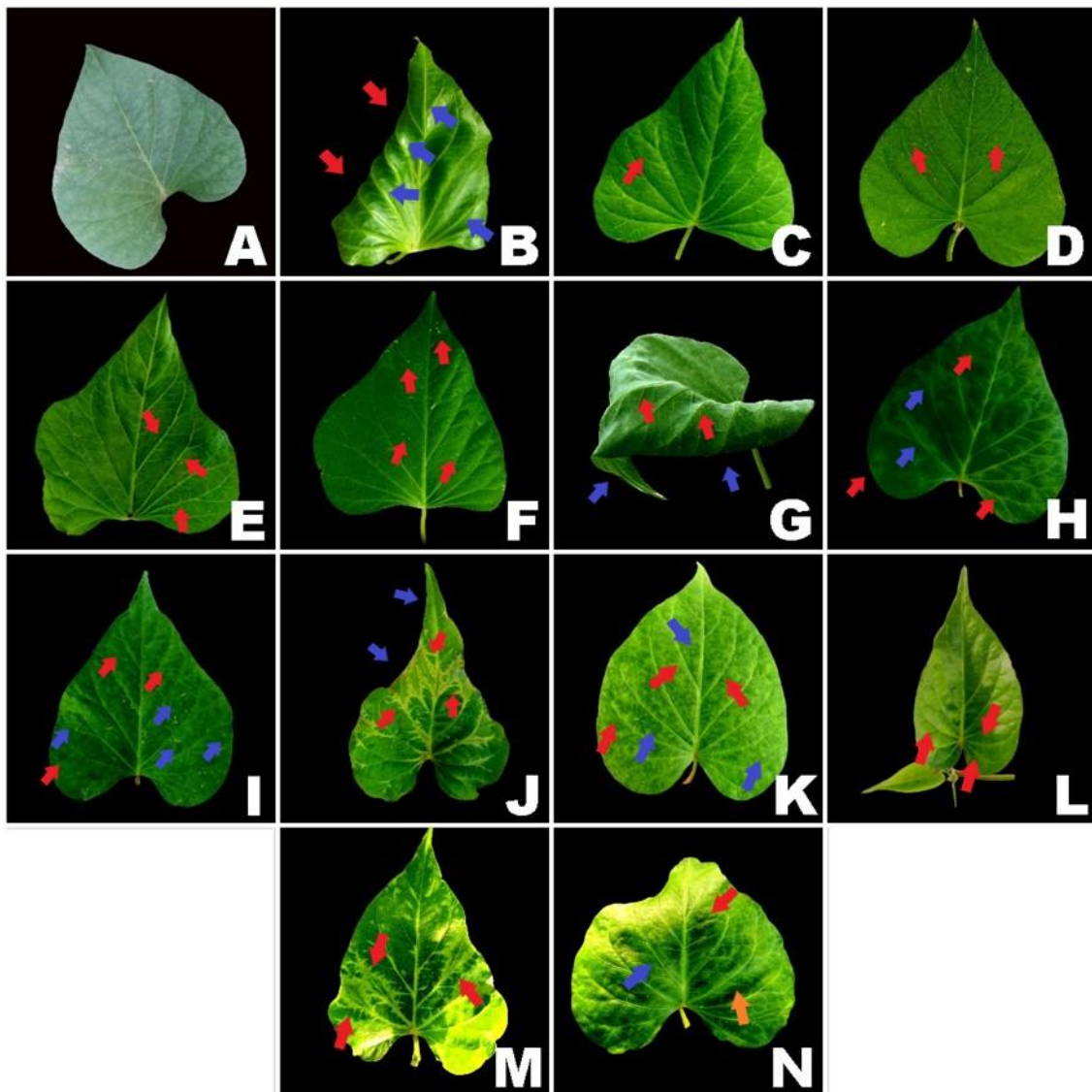


FIGURA 27. Síntomas observados al inocular SPFMV + SPVG + SPCSV en cv. GEM. A) Hoja sana, B) deformación lámina foliar (flechas rojas) y engrosamiento de nervadura (flechas azules) observado al día 7 PI en hoja inferior, C) incipiente moteado plumoso (flecha) al día 7 PI, D) puntos cloróticos (flechas) presentes al día 15 PI en hoja inferior, E) engrosamiento de venas principales (flechas) presente al día 15 PI, F) puntos cloróticos (flechas) en hoja inferior, G) engrosamiento de venas principales (flechas rojas) e hiponastia (flechas azules) de hoja inferior presentado al día 21 PI, H) mosaico (flechas rojas) y moteado plumoso (flechas azules) al día 30 PI, I) mosaico (flechas rojas) y punteado clorótico (flechas azules), J) moteado plumoso (flechas rojas) y deformación de lámina foliar (flechas azules) al día 30 PI, K) aclaramiento de venas principales (flechas rojas) y punteado clorótico (flechas azules) en hoja inferior al día 35 PI, L) leve moteado plumoso (flechas) en hoja superior, M) moteado plumoso (flechas rojas) y N) mosaico (flecha roja), aclaramiento de venas principales (flecha azul) y moteado plumoso (flecha naranja) presente al día 35 PI.

5.2 PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION VIRAL

5.2.1 Purificación viral de SPFMV y SPVG

En el gradiente de CICs para **SPFMV** (Fig. 28 A) quedaron diferenciadas tres bandas. Las bandas 1 y 3 de menor pureza (1,12 y 1,16 respectivamente) y baja concentración viral (0,11 y 0,135 mg/ml) en comparación a la banda 2, con una pureza de 1,162 y una concentración viral de 0,197 mg/ml. Esta última se seleccionó para la construcción de la curva patrón de concentración viral.

Igual situación se presentó en el caso de **SPVG** (Fig. 28 B), la banda 2 presentó mayor pureza (1,155) y concentración viral (0,161 mg/ml) en relación a las bandas 1 y 3 (1,11 y 1,14 de pureza y 0,084 mg/ml y 0,101 mg/ml, de concentración viral, respectivamente).

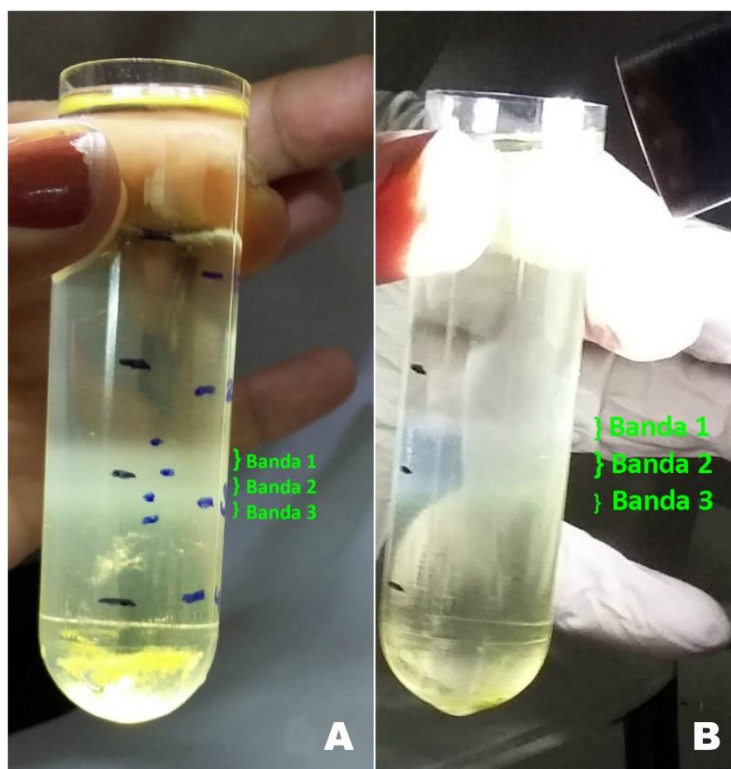


FIGURA 28. Bandas obtenidas en el gradiente de CICs luego de la ultracentrifugación, observadas mediante luz puntual blanca en A) para SPFMV y en B) para SPVG.

5.2.2 Trazado de curva patrón de concentración viral para SPFMV y SPVG

Para la construcción de la curva patrón de concentración viral en **SPFMV** se realizó un análisis de regresión no lineal modelo Gompertz (Fig. 29), donde se tomó como variable dependiente la concentración viral (concentración viral de la banda elegida dividida las diluciones), y como variable regresora: la absorbancia (A_{405}) a los 270 minutos. La ecuación resultante fue $CV = \alpha * (-\beta * (-\gamma * A_{405}))$; $\alpha=0,13$ ($p<0,0001$), $\beta=7,04$ ($p<0,0001$) y $\gamma=1,44$ ($p<0,0001$)

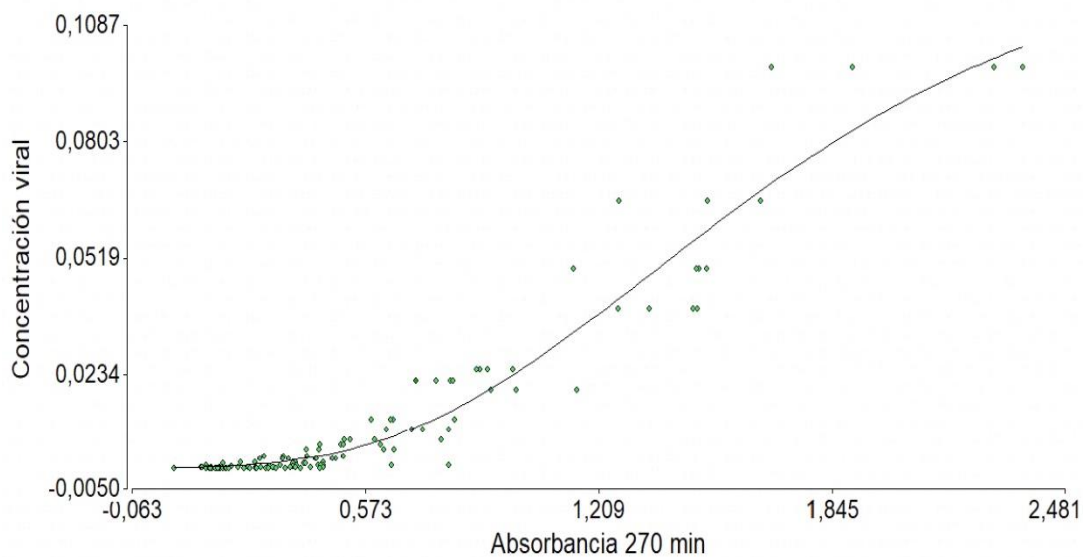


FIGURA 29. Curva patrón de concentración viral para SPFMV

En cuanto a **SPVG**, se realizó un análisis de regresión no lineal modelo logístico (Fig. 30) en el que al igual que en el caso anterior, se identificó como variable dependiente la concentración viral y como regresora la absorbancia a los 90 minutos. La ecuación obtenida fue: $CV = \alpha / (1 + \beta * (-\gamma * A_{405}))$; donde $\alpha = 0,08$ (p -valor $<0,0001$); $\beta = 1309,07$ (p -valor $0,0687$); $\gamma = 5,36$ (p -valor $<0,0001$).

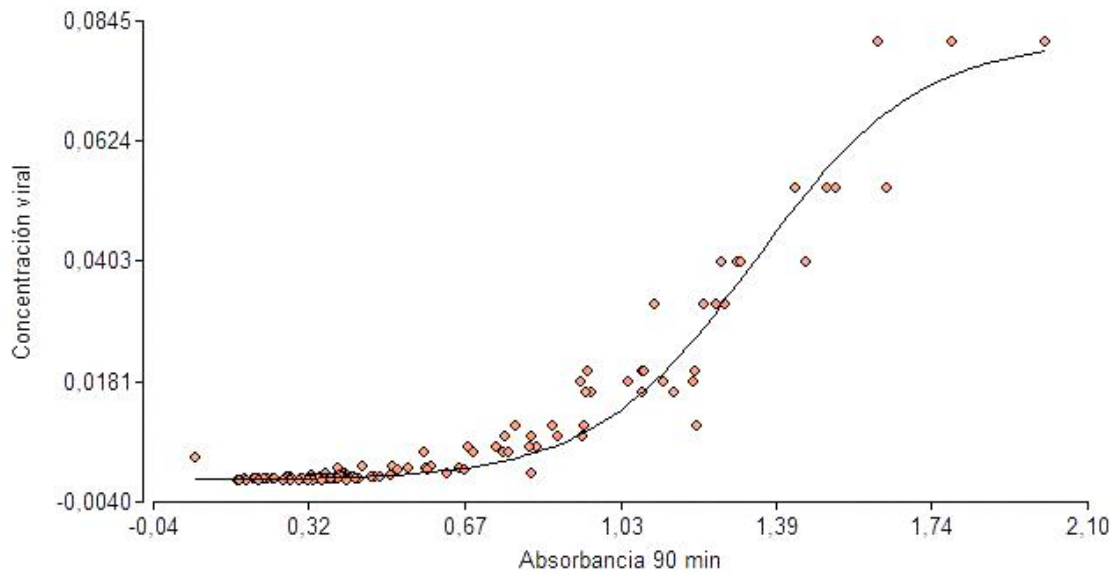


FIGURA 30. Curva patrón de concentración viral para SPVG

5.2.3 Puesta a punto DAS-ELISA y determinación de concentración viral

Tanto para **SPFMV** como para **SPVG**, la dilución adecuada de inmunoglobulina G fue 1/1000, mientras que la del conjugado enzimático fue de 1/1000 para **SPFMV** y 1/500 para **SPVG**.

Además, los valores óptimos de A_{405} se obtuvieron a los 90 min de colocado el sustrato en la placa (máximas diferencias entre los testigos enfermos y sanos).

5. 3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: Preparados *Dips*

A través de esta técnica, se observaron partículas filamentosas elongadas y flexuosas, típicas de potyvirus (Figs. 31 y 32). Además, la misma permitió corroborar la pureza y concentración de las bandas obtenidas en la purificación.

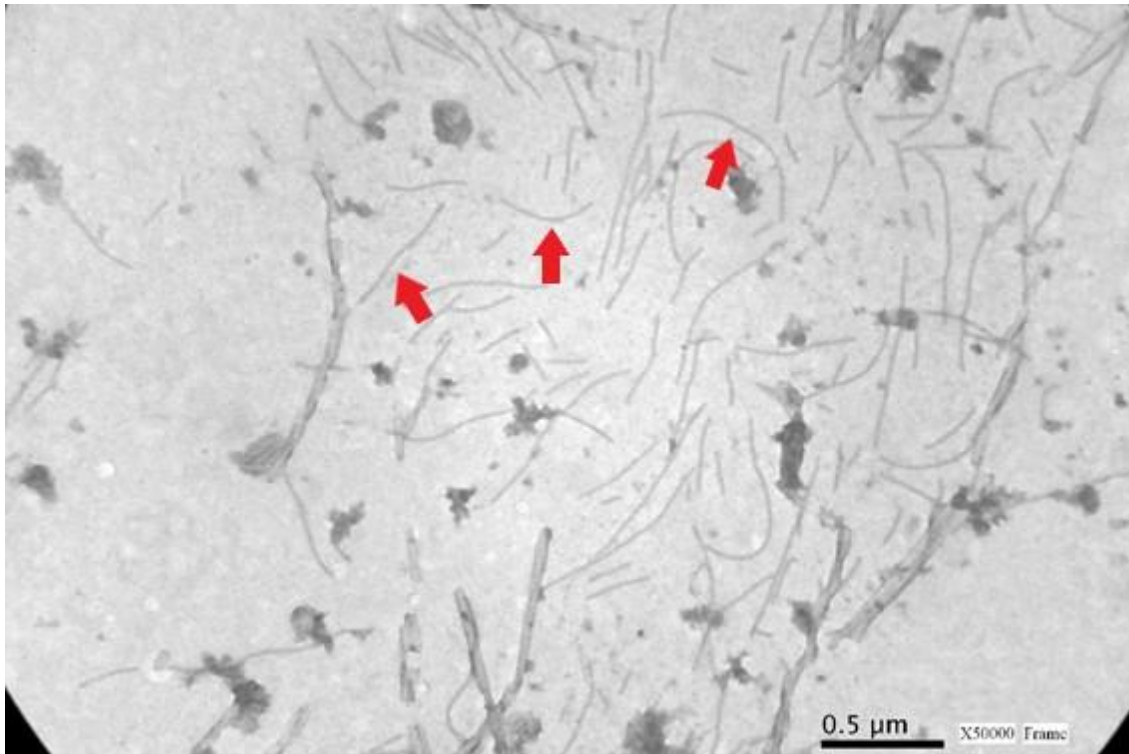


FIGURA 31. Fotografía obtenida por MET de partículas virales correspondientes a la banda 2 de la purificación de SPFMV (x 50000; barra 0,5 μm)

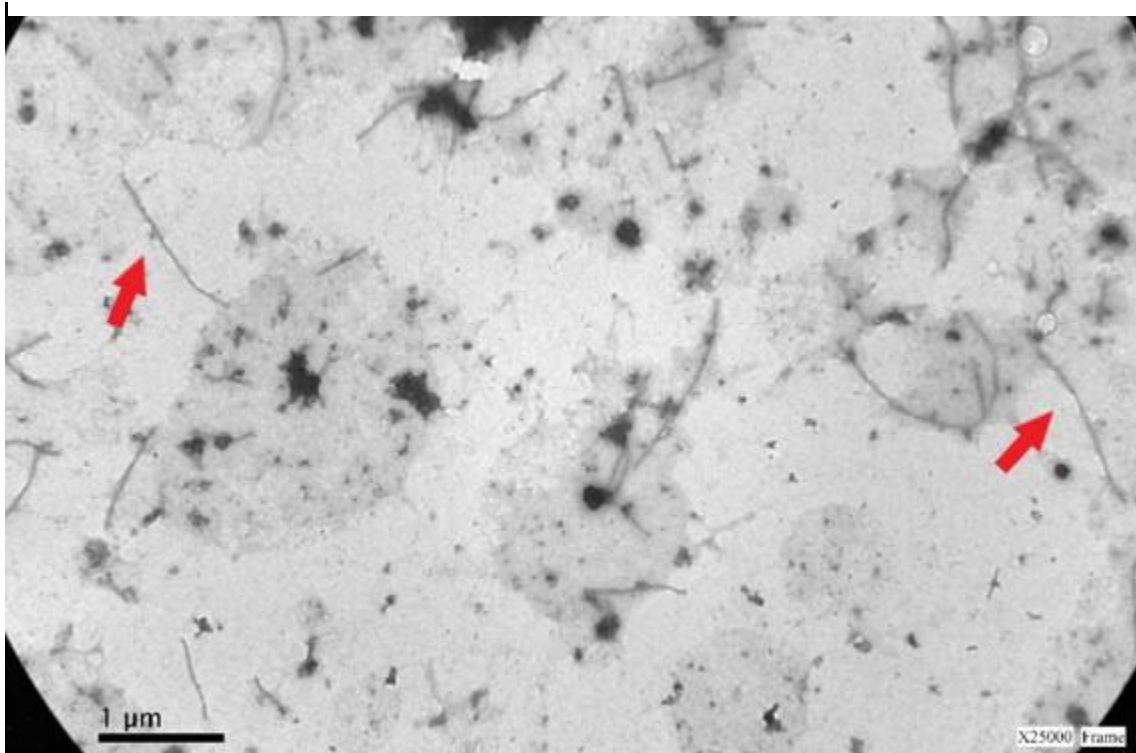


FIGURA 32. Fotografía obtenida por MET de partículas virales correspondientes a la banda 2 de la purificación de SPVG (x 25000; barra 1μm)

6. DISCUSIÓN

Con respecto a la sintomatología y a su severidad, en infecciones simples con SPFMV, los primeros síntomas aparecieron a los 15 días PI en *I. setosa*: moteado plumoso, aclaramiento de nervaduras en hojas inferiores. Al día 21 PI, mosaico y puntos cloróticos, y remisión de síntomas al día 35 tal como ya había informado Kreuze y Fuentes (2008). El cv. Arapey INIA fue asintomático y en el cv. GEM solamente se observaron aclaramiento de nervaduras e hiponastia. Por su parte, SPVG provocó aclaramiento de nervaduras, puntos cloróticos y mosaico en hojas superiores e inferiores, tanto en la indicadora como en los dos cultivares, a diferencia de lo manifestado por Martinelli *et al.* (2014) quienes no observaron sintomatología en Arapey INIA. Por otra parte, estos autores, observaron en la indicadora, ampollado, aclaramiento de nervadura y mosaico principalmente en hojas inferiores y, en menor medida, en hojas superiores.

Si bien en infecciones simples, SPFMV no se manifiesta fenotípicamente, o bien solo causa síntomas leves, en infecciones mixtas con SPCSV genera síntomas severos (achaparramiento, clorosis, distorsión y disminución del área foliar) y pérdidas de rendimiento (Karyeija *et al.*, 1998, Di Feo *et al.*, 2000, Gutiérrez *et al.*, 2003). En este estudio, en *I. setosa* y cv. GEM se observó: mosaico, moteado plumoso, puntos cloróticos, disminución y distorsión de lámina foliar, bandeado nerval clorótico y ampollado, mientras que Arapey INIA no mostró síntomas. Sin embargo, SPVG es capaz de inducir síntomas típicos de complejo viral en co-infección con SPCSV (Kokkinos y Clark, 2006, Li *et al.*, 2012): aclaramiento de nervadura que luego evoluciona a una distorsión leve de la lámina foliar y mosaico intenso (Martinelli *et al.*, 2014). En este trabajo, también pudo visualizarse moteado plumoso y punteado clorótico en la indicadora y cv. Arapey INIA, además de cordón de zapato a partir del día 30 PI, en los tres cultivares.

Untiveros *et al.* (2003), al injertar plantas con SPFMV y otro potyvirus como *Sweet potato latent virus* (SPLV) o *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), determinaron que las plantas permanecían asintomáticas, sin evidencia alguna de sinergia entre los patógenos. En contraposición, en este estudio, las infecciones con SPFMV y SPVG, a partir del día 15 PI dieron lugar a síntomas típicos de complejo viral, tales como: puntos cloróticos,

moteado plumoso en venas principales, clorosis de nervadura y bandeado nerval en hojas inferiores de GEM e *I. setosa*, mientras que Arapey INIA solamente mostró leve sintomatología (punteado clorótico) el día 21 PI.

En este estudio, las infecciones triples iniciaron la sintomatología el día 7 PI, siendo éstos notables y severos (moteado plumoso, mosaico, aclaramiento de nervaduras, deformación de lámina foliar y cordón de zapato) en *I. setosa*. Arapey INIA exhibió principalmente punteado clorótico en hojas superiores e inferiores, en menor porcentaje aclaramiento de nervaduras y moteado plumoso. Por último, el cv. GEM manifestó moteado plumoso, deformación de lámina foliar, engrosamiento de nervadura. A los 30 y 35 PI días punteado clorótico, mosaico y aclaramiento de nervaduras. Esta sintomatología fue igualmente severa que la presentada por *Sweet potato chlorotic dwarf* (SPCD) una enfermedad en batata producto de la interacción entre dos potyvirus y el agente sinérgico (SPCSV, SPFMV SPMSV) que causa mosaico muy severo, clorosis, retraso en el crecimiento y reducción y deformación de lámina foliar progresivas hacia la porción distal de las guías (Di Feo *et al.*, 2000).

En este trabajo se proporcionan evidencias de la existencia de una interacción sinérgica a los 15 días desde la infección con los tres virus (SPFMV + SPVG + SPCSV) en la indicadora, con aumentos significativos de los títulos de SPFMV y de SPVG (cerca de 100 veces en relación a infecciones simples de ambos potyvirus). Este hecho fue notable en GEM, con incrementos de concentración de aproximadamente 50 veces a los 35 días de infección y de dos veces a los 21 días PI, para SPFMV y SPVG, respectivamente. Esto sugiere que la expresión de los síntomas o el aumento de la gravedad de los mismos, en comparación a otros tratamientos, pueden resultar de un aumento de los niveles de acumulación de virus en los tejidos vegetales (Untiveros *et al.*, 2003). Además, las mayores concentraciones de virus, en general, ocurrieron en *I. setosa*, luego en el cv GEM de batata y por último, en Arapey INIA. De este modo, *I. setosa* se rectifica como planta indicadora, además se debería seguir indagando en el cv. Arapey INIA como cultivar tolerante debido a la poca sintomatología que presentó lo cual condice con los bajos títulos virales observados.

Además no se evidenció un aumento significativo del título viral en los injertos con ambos potyvirus, contrariamente a lo observado por Martinelli *et al.* (2014), quienes observaron que SPFMV aumentaba su concentración en los tejidos cuando estaba presente SPVG y, por su parte, SPVG exhibía una disminución en su concentración en co-infección con SPFMV. A su vez, los demás tratamientos contemplados en dicho estudio, indicaron que SPFMV y SPVG competían por el mismo “nicho”, pues la concentración en los tejidos era mayor para el virus que había ingresado en primer término.

Por último, es importante hacer mención a la importancia de la utilización de **plantines de sanidad controlada (“semilla” sana)** como único modo eficiente, económico e inmediato de control de virosis en batata (Di Feo, 2015).

7. CONCLUSIÓN

En este estudio, se logró purificar SPFMV y SPVG, lo que posibilitó el trazado de curvas de concentración para ambos virus, que se ajustaron a ecuaciones sigmoideas. Esto permitió calcular la concentración viral de ambos potyvirus en diferentes tiempos para infecciones simples, dobles y triples en la indicadora *I. setosa* y en los dos cultivares. Esto constituye un avance importante en estudios epidemiológicos de virosis de batata en Argentina ya que estas curvas servirán para conocer las concentraciones virales de estos patógenos en muestras de batatas de todas las provincias productoras del país. Este dato es de suma utilidad en estudios de correlación de concentraciones virales vs severidad de síntomas, epidemiológicos y desde el punto de vista de manejo de las enfermedades.

En cuanto a la sintomatología, en los injertos triples se observó una mayor cantidad y severidad de los mismos (moteado plumoso, mosaico, aclaramiento de nervaduras, reducción y deformación de lámina foliar, punteado clorótico, engrosamiento de nervadura y cordón de zapato tanto en hojas superiores como inferiores) sobre todo en *I. setosa* seguida de GEM y, por último, Arapey INIA. En los injertos dobles con ambos potyvirus, los síntomas expresados fueron característicos de complejo viral: punteado clorótico, moteado plumoso y aclaramiento de nervaduras; además a partir del día 15 posterior a la infección los mismos persistieron, a diferencia de lo sucedido para los injertos simples donde *I. setosa* expresó mayor cantidad de síntomas con respecto a ambos cultivares de batata. Arapey INIA, infectada con SPFMV, solo evidenció moteado plumoso al día 30 y, con SPVG: moteado plumoso, leve aclaramiento de nervaduras y puntos cloróticos a los 21 y 30 días. En el cv. GEM, SPFMV produjo distorsión foliar, venas prominentes e hiponastia al día 35 y SPVG, moteado plumoso, puntos cloróticos e hiponastia a partir del 15. Por último, en infecciones mixtas con SPCSV, se observaron síntomas característicos de complejo viral, en cv GEM, que fue más conspicuo en la indicadora.

Las mayores concentraciones de virus, en general, ocurrieron en *I. setosa*, luego en el cv GEM y por último, en Arapey INIA. De igual modo, se demostró un efecto sinérgico mayor a los 15 días desde la infección con los tres virus (SPFMV + SPVG + SPCSV) en la indicadora.

Este hecho también fue notable en GEM. Por último, no se evidenció antagonismo entre ambos potyvirus.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M., Harrach, B., Harrison R.L., Knowles, N.J., Kropinski .M., Krupovic, M., Kuhn, J.H. y Mushegian A.R. (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Archives of Virology* 161(10): 2921-2949

Arizio, C. M. (2011). Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Austin, D. F. (1988). The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. En: Gregory, P. *Exploration, Maintenance, and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources. First Sweet Potato Planning Conference, 1987* (pp. 27-59). Lima, Perú. International Potato Center.

Bejerman, N., Zanini, Z., Rodríguez Pardina, P. y Di Feo, L. (2016). Use of 454-Pyrosequencing for the Characterization of *Sweet potato virus C* and *Sweet potato feathery mottle virus* isolates from Argentina and development of a multiplex one-step RT-PCR for their simultaneous detection. *Journal of Phytopathology* 164(6): 386-394.

Biderbost, E., Brugnoli, E., Mollinedo, V., y Di Feo, L. (1990). Estimación de daños producidos por el *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) en la cv Morada INTA de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 22(1): 251-255.

Bourke, R. M., y Vlassak, V. (2004). *Estimates of food crop production in Papua New Guinea*. Canberra, Australian. Land Management Group, Australian National University.

Clark, C. A., Davis, J. A., Abad, J. A., Cuellar, W. J., Fuentes, S., Kreuze, J. F., Gibson, R. W., Mukasa, S. B., Tugume, A. K., y Tairo, F. D. (2012). Sweetpotato viruses: 15 years of progress on understanding and managing complex diseases. *Plant Disease* 96: 168-185.

Clark, M. F. y Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483

Cusumano, C., y Zamudio, N. (2013). *Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la provincia de Tucumán (Argentina)*. Santiago del Estero, Argentina. Ediciones INTA.

Di Feo, L. y Martí H. (2012). En IPAVE (CIAP) se producen los primeros plantines de batata de sanidad certificada. Córdoba, Argentina. Disponible en <https://inta.gob.ar/noticias/en-ipave-ciap-se-producen-los-primeros-plantines-de-batata-de-sanidad-certificada>

Di Feo, L. D. V. (2015). Producción, multiplicación y manejo de propágulos de batata de sanidad controlada. Córdoba, Argentina. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Ministerio De Industria, Comercio y Desarrollo Científico Tecnológico. Gobierno de la Provincia De Córdoba. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/288503472> Produccion multiplicacion y manejo de propagulos de batata de sanidad controlada Liliana del Valle Di Feo

Di Feo, L., Nome, S., Biderbost, E., Fuentes, S., y Salazar, L. F. (2000). Etiology of *Sweet Potato Chlorotic Dwarf Disease* in Argentina. *Plant Disease* 84: 35-39.

Di Feo, L., Ducasse, D. A. y Nome, S. F. (1992). Un método eficiente y rápido de purificación de el o los agentes causales del “enanismo clorótico en batata”. En: *Libro de Resúmenes VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. Paraná, Argentina. Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., y Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>

FAOSTAT, F. (2016). Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014). Recuperado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>

Faroni P.A. (2017). Caracterización de la raza *Sweet potato feahtery mottle virus* que afecta a *Ipomoea batatas* (L.) Lam. en Argentina y establecimiento de un método rápido de diagnóstico en plantas *in vitro*. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Gálvez, M., Cuellar, W., Fuentes, S., y Kreuze, J. (2013). Caracterización molecular de aislamientos de sweepovirus que infectan *Ipomoea batatas* (L.) Lam. y estudio de sinergismo con el *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). En Asociación Peruana de Fitopatología (APF) *Libro de Resúmenes XXII Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología* (pp.75). Lima, Perú. Asociación Peruana de Fitopatología.

Gibbs, A., y Ohshima, K. (2010). Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* 48: 205-223.

Gutiérrez, D., Fuentes, S., y Salazar, L. (2003). *Sweetpotato virus disease* (SPVD): distribution, incidence, and effect on sweetpotato yield in Peru. *Plant Disease* 87: 297-302.

Karyeija, R., Gibson, R., y Valkonen, J. (1998). The significance of *sweet potato feathery mottle virus* in subsistence sweet potato production in Africa. *Plant Disease* 82(1): 4-15.

King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., y Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.

Kokkinos, C. D., y Clark, C. A. (2006). Interactions Among *Sweet potato chlorotic stunt virus* and Different Potyviruses and Potyvirus Strains Infecting Sweetpotato in the United States. *Plant Disease* 90(10): 1347-1352.

Kreuze, J. y Fuentes, S. (2008). *Sweetpotato Viruses. International Potato Center (CIP)*. Lima, Perú. Elsevier

Li, F., Zuo, R., Abad, J., Xu, D., Bao, G., y Li, R. (2012). Simultaneous detection and differentiation of four closely related sweet potato potyviruses by a multiplex one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 186: 161-166.

Loebenstein, G., y Thottappilly, G. (Eds.). (2009). *The Sweetpotato*. The Netherlands. Springer Science & Business Media.

Loebenstein, G., Thottappilly, G., Fuentes, S., y Cohen, J. (2009). Virus and phytoplasma diseases. En Loebenstein G. y Thottappilly. *The sweetpotato* (pp. 105-134). The Netherlands. Springer Science & Business Media.

López Colomba, E., Rodríguez Pardina, P., Luque, A., Nome, C., Nome, F., y Di Feo, L. (2011). Estimación de daños potenciales causados por virus involucrados en el “encrespamiento amarillo de la batata”. *Revista de la Asociación Argentina de Horticultura* 73(30):55

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

Martí, H. (2013). Orígen, denominación y descripción botánica. En: Martí, H. Chiandussi, M.C., Filippi M. (Eds.). *Producción agroecológica de batata par el gran cultivo y la huerta familiar* (pp. 6-11). Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA. Disponible en <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-intasp-marti-et-al-manual-cultivo-de-batata-2014.pdf>

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

Martí H. (2013). Problemas y oportunidades para el cultivo de batata ante la intensificación de algunos planteos productivos y la incorporación de cultivares más susceptibles a enfermedades. En: Mitidieri, M.S. y Francescangeli, N. (Eds.). *Sanidad en Cultivos Intensivos 2013. Módulo 3: Batata, arveja, hortalizas de hoja y aromáticas. No hay sencillez que no esconda sus vueltas* (pp. 8-12). Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA. Disponible en https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_san_pedro-sanidad_en_cultivos_intensivos_2013_mo_3.pdf

Martinelli, D., Martino, J., Luque, A., y Di Feo, L. (2014). Estudios preliminares de la relación entre *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y *Sweet potato virus G* (SPVG). En: Ploper, L. D. (Ed.). *Libro de Resúmenes III Congreso Argentino de Fitopatología* (pp. 516). Tucumán, Argentina. Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos.

Martino, J. A., Di Feo, L., y Pardina, P. E. R. (2016). Primer reporte de *Sweet potato leaf curl virus* en las provincias de Córdoba y Santiago del Estero de Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 3: 105-109.

Martino J.A., Fontenele R.S., Ferreira F.A., Ribeiro S.G. y Di Feo L.D.V. (2017). First report of *Sweet potato leaf curl Georgia virus* in Sweet Potato in Argentina. *Plant Disease* 101 (3): 513.

Martino J.A., Suasnabar R., Contrdi C, y Di Feo L. (2017). Un nuevo patógeno afecta a los cultivos de batata en Argentina. En: *Libro de Resúmenes del Cuarto Congreso Argentino de Fitopatología* (pp. 264). Mendoza, Argentina. Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos.

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

Nome, S. F. (1973). *Sweet potato vein mosaic virus* in Argentina. *Phytopathol Z.* 77: 44-54.

Nome, S. F., y Docampo, D. (1974). Incidencia del virus del mosaico de las nervaduras (*sweet potato vein mosaic virus*) en rendimientos en batata. *IDIA-INTA* 315: 1-6

Onwueme, I. C. y Charles, W. B. (1994). *Tropical root and tuber crops: production, perspectives and future prospects (N° 126)*. Roma, Italia. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Pardina, P. R., Luque, A., Nome, C., Colomba, E. L., Delgado, S. F., y Di Feo, L. (2012). First report of *Sweet potato leaf curl virus* infecting sweet potato in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 7(1): 157-160.

Rodríguez Pardina, P. E., Bejerman, N., Luque, A. V., y Di Feo, L. (2012). Complete nucleotide sequence of an Argentinean isolate of *sweet potato virus G*. *Virus Genes* 45(3): 593-595.

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

Salazar, L. (1996). *Potato Viruses and Their Control*. Lima, Perú. International Potato Center.

Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13: 204-216.

Tolocka, P., López Colomba, E., Corbino, G., Luque, A., Suasnabar, R., Martí, H., Rodríguez Pardina, P., y Di Feo, L. (2012). Estimación experimental de daños causados por el "encrespamiento amarillo de la batata", *Ipomoea batatas* (L.) Lam., en el rendimiento del cultivar Arapey INIA. En: *XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas* (pp. 85). San Luis, Argentina. Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos.

Untiveros, M., Fuentes, S., y Salazar, L. (2007). Synergistic Interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (Crinivirus) with *Carla*-, *Cucumo*-, *Ipomo*-, and *Potyviruses* Infecting Sweet Potato. *Plant Disease* 91: 669-676.

Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.-L., y Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74: 157-175.

Valverde, R. A., Clark, C. A. y Fauquet, C. M. (2003). "Properties of a begomovirus isolate from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) LAM) infected with *Sweet potato leaf curl virus*." *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2): 128-136.

Woolfe, J. A. (1992). *Sweet potato: an untapped food resource*. New York, E.E.U.U. Cambridge University Press.

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

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

9. ANEXO: PROTOCOLOS

PROTOCOLO N°1: Purificación viral de SPFMV y SPVG

1. Cosechar 100 g de hojas sintomáticas de plantas enfermas.
2. Macerarlas con licuadora en tampón borato 0,5 M + EDTA 0,01 M, pH 8 (1/2 p/v). Bajo campana de extracción, agregar 1/1 p/v de cloroformo, 1/1 p/v de tetracloruro de carbono, 100 µl de ácido tioglicólico (gota a gota), y homogeneizar con politrón.
3. Pasar el homogenato a botellas de acero (250 ml).
4. Centrifugar a 11.000 rpm por 16 min.
5. Trasvasar la fase acuosa, sin tocar el pellet.
6. Sembrar la fase acuosa recogida en el paso anterior en colchón de sacarosa al 25% en tampón borato 0,05 M + EDTA 0,001 M pH=8.
7. Ultracentrifugar a 32.000 rpm durante 3 h.
8. Resuspender el pellet en tampón borato 0,05 M + EDTA 0,001 M pH=8 durante toda la noche a 4 °C
9. Realizar un gradiente, en tubos de nitrocelulosa de 39 ml, de cloruro de cesio (ClCs) (35, 30, 25, 20, 10 y 0%) en tampón borato 0,05 M + EDT 0,001 M pH 8 conteniendo 20% de sacarosa.
10. Sembrar el resuspendido viral clarificado en el gradiente.
11. Centrifugar el gradiente a 25.800 rpm durante 6 h.
12. Obtener cuidadosamente las bandas formadas.
13. Dializar cada banda extraída en el paso anterior toda la noche con tampón borato 0,05 M + EDTA 0,001 M pH 8 para extraer el ClCs.

PROTOCOLO N°2: Curva patrón de concentración viral para SPFMV

1. Sensibilizar la placa con 100 µl por celdilla con IgG diluida 1/800 en tampón *Coating*. Incubar a 37 °C por 4 h.
2. Lavar la placa con tampón lavado (PBS 1X + Tween 20), dejar reposar 3 min. Repetir este procedimiento tres veces.
3. Realizar diluciones seriadas (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/8, 1/9, 1/10, 1/16, 1/20, 1/27, 1/32, 1/40, 1/64, 1/80, 1/81, 1/128, 1/160, 1/243, 1/256, 1/320, 1/512, 1/640, 1/1024, 1/1280,

1/2048, 1/2187, 1/2560, 1/4096, 1/5120 y 1/6561) del virus purificado tanto en jugo vegetal como en tampón extracción.

4. Sembrar en la placa 100 μ l por celdilla de cada dilución. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
5. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
6. Agregar 100 μ l del conjugado enzimático diluido 1/800 (IgG-enzima) diluida en tampón enzima. Incubar a 37 °C por 4 h.
7. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
8. Adicionar 100 μ l por celdilla de P-nitrofenilfosfato a razón de 0,8 mg/ml de tampón sustrato. Mantener la placa en oscuridad y efectuar lecturas a intervalos de 15 min.

Curva patrón de concentración viral para SPVG

1. Sensibilizar la placa con 100 μ l por celdilla con IgG diluida 1/1000 en tampón *Coating*. Incubar a 37 °C por 4 h.
2. Lavar la placa con tampón lavado (PBS 1X + Tween 20), dejar reposar 3 min. Repetir este procedimiento tres veces.
3. Realizar diluciones seriadas (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/8, 1/9, 1/10, 1/16, 1/20, 1/27, 1/32, 1/40, 1/64, 1/80, 1/81, 1/128, 1/160, 1/243, 1/256, 1/320, 1/512, 1/640, 1/1024, 1/1280, 1/2048, 1/2187, 1/2560, 1/4096, 1/5120 y 1/6561) del virus purificado tanto en jugo vegetal como en tampón extracción.
4. Sembrar en la placa 100 μ l por celdilla de cada dilución. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
5. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
6. Agregar 100 μ l del conjugado enzimático diluido 1/500 (IgG-enzima) diluida en tampón enzima. Incubar a 37 °C por 4 h.
7. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
8. Adicionar 100 μ l por celdilla de P-nitrofenilfosfato a razón de 0,8 mg/ml de tampón sustrato. Mantener la placa en oscuridad y efectuar lecturas a intervalos de 15 min.

PROTOCOLO N°3: Double Antibody Sandwich- ELISA (DAS-ELISA) para SPFMV

1. Sensibilizar la placa con 100 µl por celdilla con IgG diluida 1/1000 en tampón *Coating*. Incubar a 37 °C por 4 h.
2. Lavar la placa con tampón lavado (PBS 1X + Tween 20), dejar reposar 3 min. Repetir este procedimiento tres veces.
3. Colocar 100 µl por celdilla de hojas maceradas en tampón de extracción. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
5. Agregar 100 µl del conjugado enzimático diluido 1/1000 (IgG-enzima) diluida en tampón enzima. Incubar a 37 °C por 4 h.
6. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
7. Adicionar 100 µl por celdilla de P-nitrofenilfosfato a razón de 0,8 mg/ml de tampón sustrato. Mantener la placa en oscuridad y efectuar lecturas a intervalos de 15 min.

Double Antibody Sandwich- ELISA (DAS-ELISA) para SPVG

1. Sensibilizar la placa con 100 µl por celdilla con IgG diluida 1/1000 en tampón *Coating*. Incubar a 37 °C por 4 h.
2. Lavar la placa con tampón lavado (PBS 1X + Tween 20), dejar reposar 3 min. Repetir este procedimiento tres veces.
3. Colocar 100 µl por celdilla de hojas maceradas en tampón de extracción. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
4. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
5. Agregar 100 µl del conjugado enzimático diluido 1/500 (IgG-enzima) diluida en tampón enzima. Incubar a 37 °C por 4 h.
6. Lavar la placa de la manera ya descrita en el paso 2.
7. Adicionar 100 µl por celdilla de P-nitrofenilfosfato a razón de 0,8 mg/ml de tampón sustrato. Mantener la placa en oscuridad y efectuar lecturas a intervalos de 15 min.

TAMPONES:

PBS 10 X pH 6,8 (1litro)

ClNa: 80 g.

PO₄H₂K: 2 g.

PO₄HNa₂. 12 H₂O: 29 g.

ClK: 2 g.

NaN₃: 2 g.

Tampón *Coating* (pH 9,6)

CO₃Na₂: 1,59 g.

CO₃HNa: 2,93 g.

NaN₃: 0,20 g.

H₂O destilada: 800 ml.

Medir pH y llevar a 1 litro con agua destilada.

Tampón Extracción (pH 6,8)

PBS: 1000 ml.

Tween 20 (0,05%): 0,5 ml.

PVP (2%): 20 g.

Leche descremada (2%): 2 g.

SO₃Na₂ (0,2%): 0,2 g.

Tampón Enzima (pH 6,8)

PBS: 1000 ml.

Tween 20 (0,05%): 0,5 ml.

PVP (2%): 20 g.

Leche descremada 2%: 20 g.

Tampón Sustrato (pH 9,8)

Dietanolamina: 97 ml.

NaN₃: 0,20 g.

H₂O destilada: 800 ml.

Medir pH y llevar a 1 litro con agua destilada.

PROTOCOLO N°4: Dip

1. Transferir una pequeña gota (30-50 μ l) del virus purificado o jugo de planta enferma al parafilm.
2. Colocar la rejilla sobre la gota con la superficie que contiene la película en contacto con el líquido, dejar 3-5 min. para que el material en suspensión se adsorba a la película.
3. Lavar con agua destilada (10 gotas de pipeta Pasteur) para eliminar el exceso de buffer.
4. Colocar una gota de contrastante al 2% acetato de uranilo sobre el parafilm y flotar la rejilla con la muestra con el lado de la película hacia la gota por 2-3 min.
5. Eliminar el exceso de líquido con papel de filtro.
6. Dejar secar la rejilla y observar al MET.

