

Artículo científico

Ajuste de técnicas moleculares basadas en RT-PCR para la detección de virus en plantas de frutilla

Adjustment of RT-PCR-based molecular techniques for virus detection in strawberry plants

Valentina C. Henzelmann¹; Gustavo M. Martínez Zamora¹; Gustavo G. Martos¹; Silvia M. Perato¹; Karen Y. Zurita¹; Cecilia E. Luciani²; Juan C. Díaz Ricci¹; Carlos F. Grellet Bournonville^{1*}

¹ Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET- UNT, e Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj”, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Chacabuco 461, San Miguel de Tucumán (T4000ILI), Tucumán, Argentina.

² Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola (UFyMA), INTA-CONICET, e Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), INTA, Camino 60 Cuadras Km 51/2 (X5020ICA), Córdoba, Argentina.

*Correo electrónico: carlosgrellet@gmail.com

Resumen

La frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch.), una de las frutas finas más consumidas a nivel mundial, posee una gran relevancia socioeconómica en los países productores. Las enfermedades virales afectan significativamente el rendimiento y la calidad de los cultivos de frutilla. En Argentina, los virus predominantes que afectan este cultivo son: Strawberry Crinkle Virus (SCV), Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV), Strawberry Mottle Virus (SMoV), y Strawberry Polerovirus 1 (SPV1). Tucumán, una provincia clave en la producción de frutilla en Argentina, presenta una alta incidencia de enfermedades virales. Por lo tanto, es esencial implementar métodos de diagnóstico altamente sensibles para un monitoreo fitosanitario eficaz y un manejo adecuado del cultivo. En el presente trabajo se ajustaron técnicas de biología molecular para la detección de los cuatro virus reportados en el cultivo de frutilla en Argentina. Se detalla un método confiable para obtener ARN mensajero de alta calidad a partir de hojas de frutilla. Además, se diseñaron cebadores específicos nuevos y se optimizaron las condiciones de RT-PCR para la detección de SCV, SMYEV, SMoV y SPV1. Mientras que SPV1 fue detectado únicamente en el control positivo (enviado por IPAVE), SCV, SMYEV y SMoV fueron identificados en plantas de un lote comercial. Ninguno de los virus fue detectado en plantas provenientes de cultivo *in vitro* de tejidos de frutilla. El protocolo propuesto contribuye al desarrollo de herramientas para el monitoreo de la sanidad de plantas frutilla.

Palabras clave: Diagnóstico; Fresa; Monitoreo; Virosis.

Abstract

Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.), a globally consumed berry, holds major socio-economic significance in producing countries. Viral diseases significantly impact strawberry yield and quality. In Argentina, the predominant viruses affecting strawberry crops are: Strawberry Crinkle Virus (SCV), Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV), Strawberry Mottle Virus (SMoV), and Strawberry Polerovirus 1 (SPV1). Tucumán, a key strawberry-producing province in Argentina, faces high viral disease incidence. Implementing highly sensitive diagnostic methods is therefore essential for effective phytosanitary monitoring and crop management. This study adapted molecular techniques for the concurrent detection of these four viruses in Argentina strawberries. We detail a reliable method for high-quality mRNA from strawberry leaves. Furthermore, novel specific primers were designed and RT-PCR conditions optimized for SCV, SMYEV, SMoV, and SPV1 detection. While SPV1 was detected solely in the positive control (submitted by IPAVE), SCV, SMYEV, and SMoV were identified in plants from a commercial field. None of the viruses were detected in plants from *in vitro* strawberry tissue culture. The established protocol provides a valuable tool for enhancing strawberry plant health surveillance programs.

Keywords: Diagnosis; Phytosanitary Monitoring; Strawberry; Viral Disease.

Introducción

La frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) se cultiva en muchos países con distintos perfiles climáticos, pero es más abundante su producción en aquellas zonas de clima templado (Newerli-Guz *et al.*, 2023). En Argentina, es una de las “berries” más importantes tanto en la producción del fruto como de plantines (Conci *et al.*, 2017). Nuestro país cuenta con 1500-1700 ha plantadas de frutilla aproximadamente, con una producción de 45-50 mil tn de fruta anuales (SAGyP, 2023). Tucumán es la segunda provincia con mayor superficie plantada (530 ha) luego de Buenos Aires con 550 ha (SAGyP, 2023). Sin embargo recientes informes posicionaron a Tucumán como la provincia con mayor superficie plantada (567 ha) de las cuales el 84 % se encuentra en el departamento de Lules, según datos recolectados por el INTA y RIDES de la Secretaría de Producción (<https://producciontucuman.gob.ar/el-area-de-produccion-de-frutilla-en-la-provincia-crecio-a-567-hectareas/>). En dicho artículo detallan que la variedad San Andreas es la más plantada en Tucumán (34 %) debido a que produce fruta primicia, seguida por Fronteras (23 %), Camino Real (10 %), Benicia (9 %), Rábida (8 %) y Rociera (6 %).

Las plantas de frutilla utilizadas en los campos argentinos provienen de viveros certificados de Estados Unidos y Europa donde se generan a partir de cultivo *in vitro* de tejido meristemático (Conci *et al.*, 2017). El material vegetal ingresado al país pasa posteriormente por dos ciclos de multiplicación en viveros nacionales licenciados, bajo condiciones sanitarias controladas, para obtener plantas de calidad certificada. Sin embargo, existe siempre el riesgo de ingresar patógenos sistémicos y de latencia prolongada en el hospedero, como virus y fitoplasmas, así como su propagación entre especies nativas/silvestres de frutillas en Argentina (Conci *et al.*, 2017) e incluso entre plantas de diferentes géneros (Bonneau *et al.*, 2019). En general los virus pueden transmitirse entre plantas por reproducción sexual y asexual (vía estolones en frutilla), por insectos vectores y por uso de herramientas agrícolas contaminadas (Dughetti *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2020).

Las enfermedades virales son una de las principales causas de reducción del rendimiento y la calidad del cultivo de frutilla (Dughetti *et al.*,

2017; Luciani *et al.*, 2018). Dichos patógenos pueden producir infecciones individuales (presentes de manera singular), pero son más frecuentes en infecciones mixtas o múltiples (Luciani *et al.*, 2018). La sintomatología en plantas es variada siendo característico el enanismo, clorosis, moteado y deformaciones foliares, desarrollo anormal de frutos y pérdida de las funciones reproductivas (Luciani *et al.*, 2018; Mehetre *et al.*, 2021). Según estudios previos (Conci *et al.*, 2017; Dughetti *et al.*, 2017; Luciani *et al.*, 2018) los virus encontrados con mayor frecuencia en Argentina son: Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV), Strawberry Mottle Virus (SMoV), Strawberry Crinkle Virus (SCV), y Strawberry Polerovirus 1 (SPV1). En todos los casos su material genético es ARN. De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas (SINAVIMO) de Argentina, SMYEV es el más extendido en frutilla cultivada y causa la enfermedad “amarillamiento leve de los márgenes foliares” (Maeso, 2003). SMoV es causante del “moteado de la frutilla” con clorosis de las nervaduras de las hojas y/o necrosis, y enrojecimiento de hojas viejas, reduciendo un 20-30 % el rendimiento del cultivo (Maeso, 2003). SCV es comúnmente llamado “virus del arrugamiento de la frutilla” y es considerado como uno de los virus más dañinos que afecta al cultivo de frutilla. Se citó en nuestro país por primera vez en el departamento de Lules (Tucumán) en el año 2014 (Perotto *et al.*, 2014). Además del arrugamiento foliar, es típica la clorosis y el enanismo de la planta infectada (Maeso, 2003). SPV1 fue detectado por primera vez en nuestro país por Luciani *et al.* (2016), produce síntomas de enanismo, deformación, clorosis y mosaico en hojas, disminución del tamaño, calidad y cantidad de fruta.

En la actualidad existen diferentes técnicas disponibles para la detección de virus en plantas de frutilla. El monitoreo visual de la sintomatología suele advertir una virosis sin embargo muchas veces se asemejan a fenotipos producidos en respuesta a cambios ambientales, hormonales y nutricionales (Wu *et al.*, 2020). También se utiliza el método de injertos sobre plantas indicadoras sensibles a virus como *F. vesca* ‘UC-4’, ‘UC-5’ y ‘Alpina’ (Conci *et al.*, 2017). Actualmente se emplean técnicas serológicas como ELISA con el uso de anticuerpos mono o policlonales

(Mehetre *et al.*, 2021), por ejemplo la técnica de doble sándwich ELISA (DAS-ELISA) usada para la detección de SMYEV (Conci *et al.*, 2017). El diagnóstico con anticuerpos tiene la ventaja de detectar patógenos aún en plantas asintomáticas pero con mucha menor sensibilidad que las técnicas moleculares. Por tal motivo, los métodos preferentemente empleados se basan en técnicas de biología molecular (principalmente PCR y sus variantes) y las ómicas que involucran las tecnologías de *Next Generation Sequencing* (Conci *et al.*, 2017; Mehetre *et al.*, 2021). Uno de los factores más importantes para el diagnóstico molecular de las enfermedades virales en frutilla es la difícil extracción de ácidos nucleicos de calidad adecuada. En general la extracción de ARN de frutilla con pureza adecuada para uso en biología molecular presenta dificultades debido principalmente al gran contenido de polisacáridos y polifenoles en sus tejidos. Estos compuestos incrementan la viscosidad y coloración parda de las muestras, e inhiben las reacciones enzimáticas (retrotranscripción, PCR, clivaje sitio-específico) empleadas para la detección de virus (Ferriol-Marchena *et al.*, 2015). Tales limitaciones evidencian la necesidad de optimizar técnicas moleculares para un adecuado y certero diagnóstico molecular de virosis en frutilla. Previamente en nuestro laboratorio se realizaron ensayos para la detección de virus en frutilla por PCR usando diferentes cebadores diseñados por otros autores, pero no se obtuvieron los resultados esperados, lo que nos indujo a diseñar nuestros propios cebadores para tener resultados certeros.

Uno de los métodos más utilizados para el saneamiento de los germoplasmas vegetales, manteniendo la identidad genética de cada uno, es el cultivo *in vitro* de tejidos para generar nuevas poblaciones/clones de plantas (Banerjee *et al.*, 2023). En nuestro país existen distintas instituciones que ofrecen el servicio de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, por ejemplo el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales (LCTV) del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de Tucumán (UNT), que se dedica a la micropropagación *in vitro* de especies vegetales, principalmente de *Fragaria* × *ananassa*. Las plantas se obtienen a partir de la implantación de meristemas de estolones de frutilla en medios de

cultivo, los cuales luego de completar las etapas de iniciación, multiplicación, enraizamiento y rusticación generan plantas adultas que son destinadas a la comercialización o con fines de investigación.

Existe una imperiosa necesidad de contar con protocolos eficaces y confiables para la detección de virus con elevada sensibilidad aplicable al monitoreo de plantas de frutilla en campos y viveros para un correcto manejo fitosanitario, y para asegurar la sanidad de plantas provenientes del cultivo *in vitro* de tejidos.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar las técnicas de biología molecular para un adecuado y certero diagnóstico molecular de virosis en frutilla que podría ser aplicable al monitoreo sanitario de plantas de frutilla.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon plantas de frutilla (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) del cultivar San Andreas. Se recolectaron tres plantas (V1, V2 y V3) con síntomas característicos de infecciones por virus (clorosis, enrojecimiento y/o amarillamiento de las hojas, necrosis y/o arrugamiento foliar, y plantas enanas) de un lote comercial del departamento de Lules, provincia de Tucumán (26°54'27.8"S 65°20'32.6"O). Por otro lado, se recolectaron al azar tres plantas asintomáticas (A1, A2 y A3) del LCTV (INSIBIO, CONICET-UNT) obtenidas a partir de cultivo *in vitro* del meristema apical de estolones.

Extracción de ARN total a partir de hojas de frutilla

La purificación de ARN total de frutilla se realizó utilizando el kit comercial RNAqueous Phenol-free total RNA Isolation Kit (AM1912, Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se colectaron 90 mg de hojas frescas de una planta de frutilla asintomática proveniente del LCTV e inmediatamente se molieron utilizando un mortero y nitrógeno líquido. Paralelamente, se colectaron 90 mg de hojas frescas de la misma planta que fueron inmediatamente congeladas y almacenadas a -70 °C (sin moler en nitrógeno líquido) y finalmente 90 mg de hojas frescas sin congelar. Se colectaron 3 réplicas independientes de cada

una de dichas muestras. Se utilizaron reactivos y materiales libres de ARNsas y guantes durante todo el proceso. Las superficies de trabajo se limpiaron con etanol 70 % seguido de cloroformo o con el inhibidor de ARNsas RNazap (Sigma-Aldrich). Una vez finalizadas las extracciones, se precipitó el ARN total de cada muestra en una mezcla de acetato de sodio (0,3 M; pH=5,5) y etanol (71,4 %) frío para su almacenamiento a -70 °C hasta continuar con el paso de cuantificación.

Cuantificación, evaluación de la pureza y la integridad de las muestras de ARN

La concentración y pureza del ARN total obtenido de cada muestra se evaluó mediante espectrofotometría UV midiendo absorbancia a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm, empleando el equipo NanoDrop (DeNovix DS-11) de la Cátedra de Anatomía de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. La integridad se analizó mediante electroforesis no desnaturizante en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X según Armstrong y Schulz (2015), tiñendo posteriormente con Gel-Red y visualizando los resultados en un transiluminador UV.

Retrotranscripción del ARN obtenido

Las reacciones se realizaron según el protocolo de la enzima retrotranscriptasa Transcripta® (Productos Bio-Lógicos) con algunas modificaciones. Una de ellas fue el calentamiento del ARN a retrotranscribir (1-2 µg) a 65 °C durante 5 minutos con el objetivo de deshacer las estructuras secundarias del ARN, luego se incubó en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadió al ARN el mix de reacción (1X RT buffer 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 20 U inhibidor de ARNsa, 100 µM de random hexamers y 100 U de transcriptasa reversa M-MLV). Cada mezcla de reacción fue incubada a 25 °C por 10 minutos, luego a 37 °C durante 50 minutos y finalmente a 95 °C durante 10 minutos.

Control interno y prueba de inhibición de la PCR

Para asegurar una correcta retrotranscripción y la ausencia de posibles inhibidores enzimáticos en cada muestra, se realizó un control interno en cada una amplificando por reacción de

PCR una secuencia de un gen específico de frutilla usando los siguientes cebadores: sentido CTTGTCATGGATGATAATGG; antisentido ACACTCCTCATTTTATCAAC. El gen usado como control interno codifica para un receptor de etileno y posee expresión constitutiva (*ETRI*, GENBANK AJ297511). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo según el protocolo incluido en el kit de la enzima TAQ Pegasus (Productos Bio-Lógicos, PB-L): 1 pg - 1 µg de ADNc, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs y 1 U de Taq ADN polimerasa. El programa de PCR usado para dicho par de cebadores fue: desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de: 94 °C por 30 s, 49 °C durante 40 s y 72 °C por un minuto, y la extensión final es a 72 °C por 10 minutos. El tamaño del producto de amplificación esperado es de 330 pb, el cual fue separado y visualizado por electroforesis en gel de agarosa como se describe a continuación. El control interno permite descartar resultados falsos negativos en el diagnóstico molecular de patógenos, como consecuencia de la degradación de los ácidos nucleicos durante el procesamiento de la muestra, de errores en la reacción de PCR o por la presencia de inhibidores.

Diseño de cebadores para la detección de virus en frutilla

Los pares de cebadores para la detección de cada virus por PCR se diseñaron a partir de las secuencias genómicas específicas disponibles en GenBank: SMYEV (LC515236.1) (Takamura *et al.*, 2020), SPV1 (KR094960.1) (Luciani *et al.*, 2016), SCV (MZ962213.1) (Schoen *et al.*, 2003) y SMoV (KU177218.1) (Bhagwat *et al.*, 2016). Se usó la herramienta bioinformática PrimerQuest Tool (IDT) definiendo el siguiente rango para cada parámetro: temperatura de melting (T_m) entre 50 y 55 °C, %GC 40-50 %, tamaño de cebadores entre 17 y 23 pb. Se diseñaron cinco pares de cebadores para cada virus pero se seleccionó solo un par para cada virus cuya T_m sea similar entre los cuatro virus.

Análisis bioinformático de los cebadores específicos sintetizados

Con el propósito de analizar la especificidad de los cebadores diseñados en el presente trabajo, se realizaron alineamientos de cada uno con las

secuencias genómicas de cada uno de los virus (Tabla 1). En todos los casos se obtuvieron valores de identidad bajos, solo se alcanzaron valores de 100 % al alinear cada cebador de un determinado virus con su correspondiente secuencia genómica. El mismo análisis bioinformático se realizó con cebadores específicos publicados por otros autores, obteniendo valores de identidad comparables a los obtenidos con los cebadores diseñados en el presente trabajo. Estos resultados sugieren que no habría reacciones cruzadas entre cebadores y ADNc de virus diferentes.

Condiciones de PCR para la detección de virus en frutilla

Cada reacción de PCR fue repetida al menos 3 veces, y fueron llevadas a cabo según el protocolo incluido en el kit de la enzima TAQ Pegasus (Productos Bio-Lógicos, PB-L). Se empleó la siguiente mezcla de reacción: 1 pg - 1 µg de ADNc, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 0,2 mM de dNTPs y 1 U de Taq ADN polimerasa. El programa de PCR utilizado fue: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 40 s de unión de cebadores y 72 °C durante 1 minuto, y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Las temperaturas de unión de los cebadores para cada virus fueron 48 °C para SPV1, 54 °C para SMoV, 57 °C para SCV y 60 °C para SMYEV. Los productos de amplificación esperados (amplicones en la Tabla 2) fueron separados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente. Como testigo positivo

se usó una muestra de ADNc de frutilla que contenía los cuatro virus mencionados, enviada por la Dra. Cecilia Elizabeth Luciani del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la provincia de Córdoba (Argentina), referentes en el diagnóstico de enfermedades vegetales.

Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones por PCR

Se procedió según Armstrong y Schulz (2015). Se usó buffer TBE 0,5X y geles de agarosa al 1,5 %, aplicando un voltaje de 10 V/cm de gel. El buffer de carga usado fue Green GoTaq (PROMEGA) y se sembró paralelamente el marcador de peso molecular 100 pb Plus II DNA Ladder (TransGen). Al finalizar la separación electroforética, se visualizaron los resultados en transiluminador UV los geles teñidos con Gel-Red.

Resultados

Estudio comparativo de diferentes condiciones de procesamiento de muestras para una mejor eficiencia en la extracción de ARN total de plantas de frutilla

La correcta detección molecular de virus en frutilla requiere la obtención de ARN cuya calidad y cantidad sean adecuadas para los posteriores análisis. Sin embargo eficiencia en la extracción de ARN se ve reducida por el alto contenido de

Tabla 1. Porcentajes de identidad correspondientes a alineamientos de cada cebador diseñado con cada secuencia genómica específica de cada virus.

Cebadores	Secuencias genómicas			
	SMoV	SPV1	SMYEV	SCV
	% de identidad			
SMoV sentido	100,00	65,00	55,00	55,00
SMoV antisentido	100,00	50,00	60,00	65,00
SPV1 sentido	57,14	100,00	61,90	61,90
SPV1 antisentido	57,14	100,00	57,14	66,67
SMYEV sentido	61,11	61,11	100,00	66,67
SMYEV antisentido	61,90	57,14	100,00	61,90
SCV sentido	57,14	61,90	61,90	100,00
SCV antisentido	55,00	60,00	65,00	100,00

Tabla 2. Cebadores diseñados para la detección de virus en frutilla por RT-PCR.

Patógeno	Cebadores	Secuencia nucleotídica	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
SPV1	sentido	TACCTCGTTCCTACCCTATTC	60,1	821
	antisentido	CGGACTTATGTGGTGGTTTAT	60,1	
SMYEV	sentido	CGAATGCTCTGGGTGTTT	60,0	529
	antisentido	GTCTGGATGGCGTTAGAATAG	60,0	
SCV	sentido	CAGAATCACCAAGGAGGTATG	60,0	498
	antisentido	GAGGATGGCCACAAGATAAG	59,9	
SMoV	sentido	CTCTGTTGGCCGTGTATATC	59,8	717
	antisentido	CAGGCAGTCCCATTCTTATC	59,9	

otros metabolitos en las hojas de frutilla (Ferriol-Marchena *et al.*, 2015). En el presente trabajo, se comparó la calidad y cantidad de ARN total extraído a partir de muestras de hojas de frutilla mantenidas a tres diferentes condiciones: molidas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C, solo conservadas a -70 °C, y frescas. Para comparar la integridad del ARN extraído se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en condiciones no desnaturalizantes de cada muestra, y se evaluó la pureza del ARN de cada muestra por espectrofotometría. Se obtuvo mayor integridad del ARN obtenido cuando la muestra de hojas de frutilla fue molida en nitrógeno líquido y conservada a -70 °C, respecto a las otras dos condiciones, evidenciado por la mayor intensidad y definición de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S de ARN ribosómico (Figura 1).

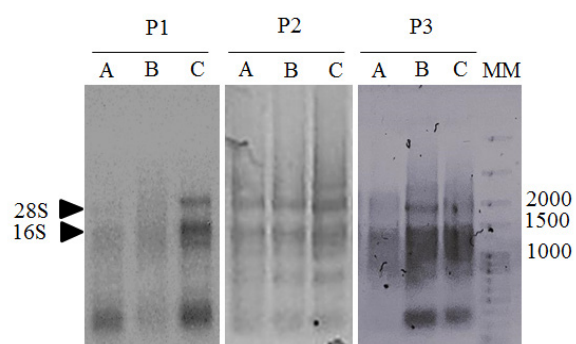


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) en condiciones no desnaturalizantes del ARN total extraído a partir de muestras de hojas de frutilla a diferentes condiciones de conservación. (A) ARN de hojas frescas; (B) ARN de hojas congeladas a -70 °C; (C) ARN de hojas molidas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C. El ensayo fue repetido tres veces en plantas asintomáticas independientes (P1, P2 y P3). (MM) marcador de peso molecular 100 pb. Se indican las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S de ARN ribosómico (flechas) y sus correspondientes tamaños.

Respecto a análisis de pureza y rendimiento por espectrofotometría UV (Tabla 3), se obtuvo mayor concentración de ARN en la muestra de hojas de frutilla molidas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C. El rendimiento fue 5,1 veces menor al extraer directamente de tejido fresco y 3,4 veces menor al extraer de muestras que solo fueron conservadas a -70 °C. Respecto a la pureza del ARN, todas las muestras presentaron valores de A260/A230 y A260/A280 comprendidos dentro de los rangos aceptables para RT-PCR, excepto para tejido molido en nitrógeno líquido cuya relación A260/A230 es levemente inferior al valor de referencia de 2.

Estos resultados sugieren que no es conveniente prescindir del uso de nitrógeno líquido para la disrupción de las muestras de hojas de frutilla, ya que afecta el rendimiento e integridad del ARN extraído.

Detección de virus en plantas de frutilla mediante reacción de PCR con cebadores específicos

Una vez definido el protocolo de extracción de ARN a partir de hojas de frutilla, se realizó la purificación de ARN total a partir de plantas del cultivar San Andreas: 3 plantas de frutilla colectadas de campo con síntomas característicos de virosis, y 3 plantas de frutilla generadas por cultivo *in vitro* de tejidos en nuestro laboratorio sin síntomas de enfermedades. Y posteriormente se generó ADNc a partir de los ARNm presentes en cada muestra por retrotranscripción.

Para asegurar una correcta retrotranscripción y la ausencia de posibles inhibidores enzimáticos en cada muestra, se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores de control interno que amplifican una región codificante específica del

Tabla 3. Mediciones de concentración y pureza por espectrofotometría UV de ARN total extraído de muestras de hojas de frutilla sometidas a diferentes condiciones. A260, A230 y A280 corresponden a valores de absorbancia a las longitudes de onda 260, 230 y 280 nm, respectivamente.

Condiciones de la muestra	Concentración de ARN (ng/μl)	A260	A260/A230	A260/A280
Tejido fresco	211,26 ± 3,8	5,28 ± 0,09	2,55	2,01
Tejido congelado	323,42 ± 5,4	8,15 ± 0,13	2,43	2,06
Tejido molido en N2 líquido	1093,12 ± 7,11	27,76 ± 0,18	1,82	1,91

gen de frutilla *ETRI*. Una vez obtenido el producto de amplificación esperado en cada muestra (banda de 330 pb observable en un gel de agarosa al 1,5 %) se procedió a la detección de los virus.

La detección se realizó mediante reacciones de PCR a partir de las muestras de ARN total de cada planta, sometidas a retrotranscripción y posterior amplificación del control interno. Los resultados se muestran en la Figura 2.

La presencia de una banda del tamaño esperado para cada virus se consideró como detección positiva. SMoV fue detectado en las 3 plantas de campo (V1, V2 y V3) debido a la presencia de una banda de 717 pb. SCV fue detectado en 2 de plantas de campo (V1 y V2) debido a la presencia de una banda de 498 pb. SMYEV también fue detectado en 2 plantas de campo (V1 y V3) debido a la presencia de un producto de amplificación de 529 pb. SPV1 no se detectó en ninguna de las plantas evaluadas. Ninguno de los virus fue detectado en las 3 plantas asintomáticas de frutilla provenientes

del LCTV (A1, A2 y A3). Las bandas de tamaño esperado para los 4 virus, incluyendo SPV1 (821 pb), fueron observadas en la muestra incluida como testigo positivo de los 4 virus procedente del IPAVE-INTA, validando los resultados obtenidos.

Finalmente, considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo se resumen las consideraciones a tener en cuenta para realizar una correcta extracción de ARN total de hojas de frutilla con rendimiento, pureza e integridad aceptable para el diagnóstico de virus mediante PCR convencional. La disruptción de la muestra con nitrógeno líquido es imprescindible para una correcta extracción de ARN. Luego, de la retrotranscripción de los ARNm de cada muestra utilizando cebadores *random hexamers*, se debe realizar el control interno de cada muestra de ADNc mediante una reacción de PCR con cebadores específicos para un gen de *Fragaria* × *ananassa*. Solo en aquellas muestras positivas para control interno se procederá a la detección

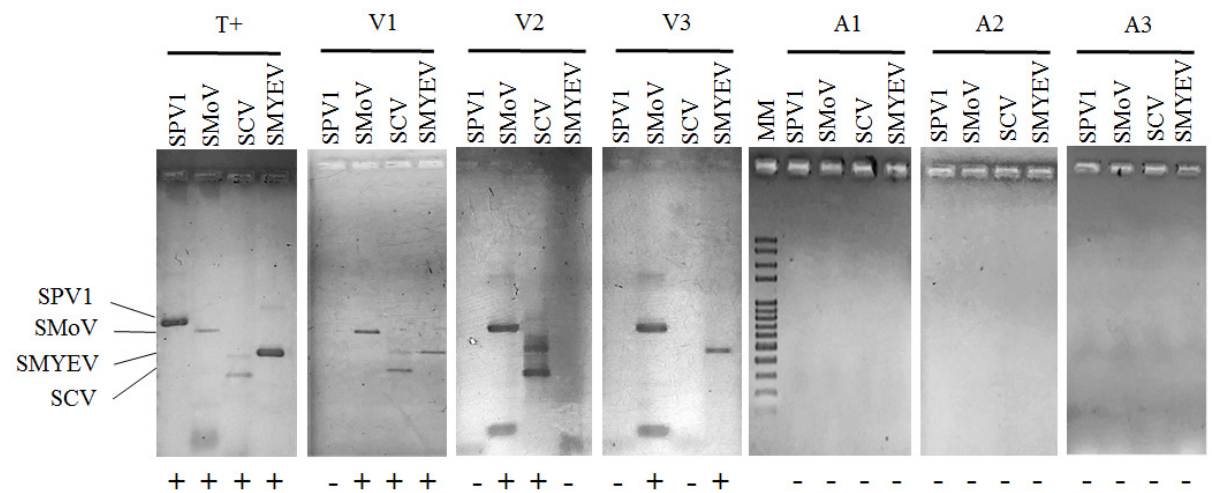


Figura 2. Detección de virus en muestras de plantas de frutilla mediante reacciones de PCR usando cebadores específicos. Las bandas esperadas para cada virus fueron: 821 pb para SPV1, 717 pb para SMoV, 498 pb para SCV y 529 pb para SMYEV. Se evaluaron tres plantas de campo (V1, V2 y V3) y tres plantas asintomáticas provenientes del LCTV (A1, A2 y A3). T+, testigo positivo para los cuatro virus proveniente de IPAVE-INTA. Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5 % y teñidos con Gel-Red. La presencia (+) o ausencia (-) de la correspondiente banda de tamaño esperado para cada virus se consideró como detección positiva o negativa para dicho patógeno, respectivamente. MM, marcador de peso molecular de 100 pb.

individual de los virus SPV1, SMoV, SMYEV y SCV por reacciones de PCR con cebadores específicos diseñados en el presente trabajo. Tanto para la reacción del control interno como para las reacciones de detección de virus deben incluirse sus respectivos controles positivos.

Discusión

Extracción de ARN de frutilla con rendimiento y pureza adecuados para la detección de virus

La extracción de ARN de cualquier organismo requiere recaudos especiales debido principalmente a la elevada probabilidad de contaminaciones con ARNasas exógenas que rápidamente degradan la muestra. En el caso de detección de patógenos cuyo material genético es ARN es imprescindible optimizar el proceso de extracción de los ácidos ribonucleicos para evitar obtener falsos negativos debido a la degradación de los mismos (NIMF 27). Además se debe considerar que la deficiente calidad del ARN obtenido a partir de hojas de frutilla está asociada principalmente al gran contenido de hidratos de carbono y de compuestos fenólicos en los tejidos. Tales metabolitos interfieren e inhiben las posteriores reacciones enzimáticas, retrotranscripción y PCR, usadas para el diagnóstico de virus. Por tales motivos normalmente no se utilizan para muestras de frutilla protocolos estándares de extracción de ácidos nucleicos (Rapley y Heptinstall, 1998; Yu *et al.*, 2012; Ferriol-Marchena *et al.*, 2015). Previamente en nuestro laboratorio se compararon las eficiencias de extracción de ARN de frutilla utilizando diferentes kits comerciales, obteniendo excelentes resultados con el kit indicado en la sección Materiales y Métodos.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, la extracción de ARN a partir de hojas de plantas de frutilla molidas en nitrógeno líquido permite obtener mejor rendimiento respecto al obtenido a partir de tejido fresco y de hojas congeladas a -70 °C.

La comparación de pureza y rendimiento del ARN total extraído muestra mayor concentración de ARN cuando las hojas de frutilla son molidas en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C. Respecto a la pureza del ARN, todas las muestras presentaron valores de A260/A230 y A260/A280 comprendidos dentro de los rangos aceptables para RT-PCR. La primera relación indica si la muestra está contaminada con polisacáridos y

otras sustancias (Ferriol-Marchena *et al.*, 2015). A pesar de que el valor de A260/A230 es levemente inferior a 2 para la muestra molida en nitrógeno líquido, consideramos que es aceptable para las posteriores aplicaciones, considerando las dificultades que presenta la purificación de ácidos nucleicos a partir de frutilla (Ferriol-Marchena *et al.*, 2015). Cabe agregar que la precipitación con acetato de sodio y etanol usado en el presente trabajo es un método fácil recomendado para la purificación y concentración de ARN (Walker y Lorsch, 2013; Green y Sambrook, 2020), y sumado a los posteriores lavados con etanol 70 % y etanol absoluto permitieron reducir el contenido de contaminaciones en las muestras aumentando el valor de la relación de absorbancias 260/230 nm. Las mismas consideraciones pueden aplicarse a la relación A260/280 que considera la contaminación con proteínas.

Por otra parte, el empleo de un par de cebadores para la identificación del gen *ETRI* de frutilla como control interno de PCR, fue eficaz para confirmar la eficiencia de la retrotranscripción de las muestras de ARN a ADNc y por lo tanto ser aptas para ser utilizadas en la detección de virus por PCR convencional, ya que en todos los casos hubo amplificación del fragmento de 330 pb correspondiente para este gen. El control interno es un paso imprescindible para descartar la posibilidad de falsos negativos debido a un bajo rendimiento y/o la degradación de los ARNm, y/o a la presencia de inhibidores sobre las reacciones de RT-PCR (NIMF 27).

Diagnóstico molecular de virus en frutilla usando cebadores diseñados en el presente trabajo

Previamente en nuestro grupo de trabajo se realizaron ensayos de detección de virus en frutilla usando cebadores diseñados por otros autores (incluso variando distintos factores como la concentración de ADNc molde, de cebadores y de dNTPs, temperaturas de anillado) pero no se obtuvieron resultados confiables y reproducibles. Por tal motivo se diseñaron nuevos cebadores seleccionando aquellos con Tm similar.

La obtención de productos de amplificación con los tamaños correspondientes para los virus analizados en este trabajo sugiere la presencia de estos patógenos en las plantas analizadas. En las muestras de plantas colectadas a campo (V1, V2 y V3) pudieron detectarse tres de los cuatro

virus reportados en Argentina (SMoV, SMYEV y SCV). La presencia de una banda de tamaño esperado para SPV1 en la muestra testigo positivo proveniente de IPAVE-INTA demuestra que los cebadores diseñados en el presente ensayo para SPV1 son adecuados para la detección de dicho virus. Por lo tanto SPV1 no estaría presente en las plantas de campo sintomáticas ni en las plantas asintomáticas del LCTV analizadas. Luciani *et al.* (2018) estudiaron la incidencia y prevalencia de SPV1, SMoV, SCV y SMYEV en cultivos de frutilla de 3 diferentes regiones de Argentina. Luego de SCV, SPV1 es el virus de menor incidencia y prevalencia en Argentina, detectado principalmente en Coronda (Santa Fé) y Mar del Plata (Buenos Aires) en comparación a Lules (Tucumán). Dicha distribución de SPV1 estaría positivamente relacionada a las precipitaciones de la región. Estas correlaciones descriptas por Luciani *et al.* (2018) explicarían porque no pudo detectarse SPV1 en las plantas de campo colectadas en el presente ensayo.

Un valor de identidad del 100 % entre cada cebador diseñado en el presente trabajo y la correspondiente secuencia genómica del patógeno, los bajos valores de porcentaje de identidad de cada cebador y la secuencia genómica del resto de los patógenos (detallado en Materiales y Métodos), sumado a la visualización de bandas de tamaño esperado para cada patógeno, denotan una elevada especificidad de cada cebador para la detección de cada uno de los virus prevalentes en nuestro país. La presencia de productos de amplificación de diferente tamaño al esperado en las plantas positivas para SCV no serían producto de hibridación cruzada con el genoma de los otros virus estudiados de acuerdo al análisis bioinformático homología de secuencias, tampoco sería producto de la hibridación de los cebadores con secuencias propias de frutilla ya que no se observó amplificación alguna en las plantas asintomáticas. Según nuestro criterio, solo la presencia de una banda de 498 pb usando los cebadores para SCV indicaría la detección positiva de dicho virus en la muestra analizada.

Conclusiones

Se optimizó la extracción de ARN a partir de hojas de frutilla alcanzando rendimientos y purezas adecuados para el diagnóstico molecular de virus.

Se optimizó la detección molecular de los cuatro virus relevantes en Argentina (SPV1, SMoV, SCV y SMYEV) a partir de hojas de frutilla, mediante RT-PCR, usando cebadores diseñados en el presente plan de trabajo.

En plantas sintomáticas que provenían del campo logró detectarse SMoV, SCV y SMYEV, mientras que la detección de SPV1 fue positiva solo en la muestra testigo positivo proveniente de IPAVE-INTA.

Análisis bioinformáticos permitieron inferir una elevada especificidad de los cebadores para los correspondientes patógenos.

Agradecimientos

Agradecemos al INSIBIO (CONICET-UNT), a la Secretaria de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la UNT (SCAIT) y al Comité Editor RANAR. El presente trabajo se realizó con financiamiento de PICT-2020-3544, PIP3236CO, PIUNT-D722, PICT-2021-00029.

Referencias bibliográficas

- Armstrong J.A., Schulz J.R. (2015). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 10:7.2.1-7.2.22. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0702s10>
- Banerjee D., Singh V., Thakur R. (2023). Micro propagation on Strawberry: a review. En: *E3S Web of Conferences* 453, 01019. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202345301019>
- Bhagwat B., Dickison V., Ding X., Walker M., Bernardy M., Bouthillier M., Sanfaçon, H. (2016). Genome sequence analysis of five Canadian isolates of strawberry mottle virus reveals extensive intra-species diversity and a longer RNA2 with increased coding capacity compared to a previously characterized European isolate. *Archives of virology* 161 (6): 1657-1663. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2799-6>
- Bonneau P., Hogue R., Tellier S., Fournier V. (2019). Evaluation of various sources of viral infection in strawberry fields of Quebec, Canada. *Journal of Economic Entomology* 112 (6): 2577-2583. <https://doi.org/10.1093/jee/toz205>
- Conci V., Luciani C., Merino M., Celli M., Perotto M., Torrico A., Pozzi E., Strumia G., Dughetti A., Asinari F., Conci L., Fernández F., Salazar S., Meneguzzi N., Kirschbaum D. (2017). Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. *Acta Horticulturae* 1156: 801-810. <https://doi.org/10.17660/>

- ActaHortic.2017.1156.118
- Dughetti A.C., Conci V.C., Kirshbaum D. (2017). Áfidos transmisores de virus detectados en cultivos de frutilla en Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 43: 36-50.
- Ferriol-Marchena X.R., Luis-Pantoja M., Ruiz Y., Hernández-Rodríguez L., Pérez-Castro J. M. (2015). Comparación de métodos de extracción de ARN y ADN de hojas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa CitriFrut 32: (1): 24-30.
- Green M.R., Sambrook J. (2020). Precipitation of RNA with Ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols* 2020 (3): 101717. doi:10.1101/pdb.prot101717
- Luciani, C.E., Celli, M.G., Merino, M.C., Perotto, M.C., Pozzi, E., Conci, V.C. (2016). First report of Strawberry polerovirus 1 in Argentina. *Plant Disease* 100 (7): 1510.
- Luciani C., Celli M.G., Torrico A.K., Asinari F., Pozzi E., Peña Malavera A., Kirschbaum D., Perotto M., Conci V.C. (2018). Incidence and prevalence of aphid-borne viruses infecting strawberry in Argentina. *Annals of Applied Biology* 173 (1): 80-91. <https://doi.org/10.1111/aab.12437>
- Maeso D. (2003). Enfermedades causadas por virus y organismos afines. *INIA Boletín de Divulgación* 82: 43-50.
- Mehetre G.T., Leo V.V., Singh G., Sorokan A.V., Максимов И.Б., Yadav M., Upadhyaya K., Hashem A., Alsaleh A.N., Dawoud T.M., Almaary K.S., Singh B.P. (2021). Current Developments and Challenges in Plant Viral Diagnostics: A Systematic review. *Viruses* 13 (3): 412. <https://doi.org/10.3390/v13030412>
- Newerli-Guz J., Śmiechowska M., Drzewiecka A., Tylingo R. (2023). Bioactive Ingredients with Health-Promoting Properties of Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual* 28 (6): 2711. <https://doi.org/10.3390/molecules28062711>
- NIMF 27. Anexo 12 (2016). Fitoplasmas. Roma, CIPE, FAO.
- Perotto M., Luciani C., Celli M., Torrico A., Conci, V. (2014). First report of Strawberry crinkle virus in Argentina. *New Disease Reports* 30 (1): 5. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.005>
- Rapley R., Heptinstall J. (1998). UV spectrophotometric analysis of ribonucleic acids. En: *RNA Isolation and Characterization Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Rapley R., Manning D.L. (Eds). Humana Press. EEUU. Pp. 65-68. <https://doi.org/10.1385/0-89603-494-1:65>
- Schoen C.D., Limpens W., Moller I., Groeneveld L., Klerks M.A., Lindner J.L. (2003). The complete genomic sequence of Strawberry crinkle virus, a member of the Rhabdoviridae. *Acta Horticulturae* 656: 45-50. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.656.5>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP). (2023). Producción de frutilla en Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-informe-produccion-frutilla-enero-2023.pdf>
- Singh S., Awasthi L., Jangre A. (2020). Transmission of plant viruses in fields through various vectors. En: *Applied Plant Virology*. Awasthi L.P. (Ed). Academic Press. EEUU. Pp. 313-334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00024-4>.
- Takamura Y., Yamaryo S., Wang W.Q., Neriya Y., Suzuki E., Namai K., Natsuaki T. (2020). First report of the complete genomic sequences of strawberry mild yellow edge virus and strawberry vein banding virus isolated in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 86 (6): 503-506. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00947-x>
- Walker S.E., Lorsch J. (2013). Chapter Nineteen - RNA Purification – Precipitation Methods. En: *Methods in enzymology*. Lorsch J. (Ed). Academic Press. EEUU. Pp. 337-343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00019-1>.
- Wu Q., Habili N., Constable F., Rwahnih M.A., Goszczynski D.E., Wang Y., Pagay V. (2020). Virus Pathogens in Australian Vineyards with an Emphasis on Shiraz Disease. *Viruses* 12 (8): 818. <https://doi.org/10.3390/v12080818>.
- Yu D., Tang H., Zhang Y., Du Z., Yu H., Chen Q. (2012). Comparison and Improvement of Different Methods of RNA Isolation from Strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agricultural Science* 4 (7): 51-56.