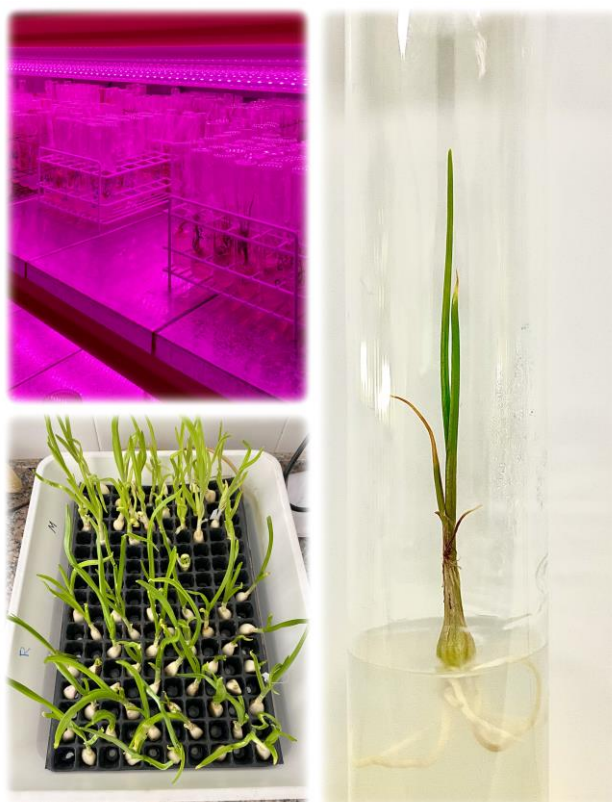


DICIEMBRE 2024 N°19

BOLETÍN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

ISSN: 2618-1932

DISEÑO DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN Y
DETECCIÓN DE VIRUS POR RT-PCR EN HOJAS Y BULBILLOS DE
AJO (*Allium sativum* L.)



DISEÑO DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN Y DETECCIÓN DE VIRUS POR RT-PCR EN HOJAS Y BULBILLOS DE AJO (*Allium sativum* L.)

Barontini J.M.^{1,2,3,4}, Guzmán E.¹, García Lampasona S.^{1,2}
Capítulo Cuyo

1. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Cuyo (FCA - UNCuyo). Almirante Brown 500. Chacras de Coria.
2. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mendoza - INTA). San Martín 3853. Luján de Cuyo.
3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
4. Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM- CONICET). Almirante Brown 500. Chacras de Coria.

Contacto: jbarontini@fca.uncu.edu.ar

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es un cultivo de importancia a nivel mundial, siendo relevante en la provincia de Mendoza. El cultivo es afectado por un complejo viral que incluye Potyvirus (*Onion yellow dwarf virus* - OYDV y *Leek yellow stripe virus* - LYSV), Carlavirus (*Shallot latent virus* - SLV) y *Garlic common latent virus* - GCLV) y Alexivirus (*Garlic virus A, B, C, D, E y X* - GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, GarVE y GarVX) que impacta en su calidad y rendimiento. Tradicionalmente la detección viral, tanto en la producción de ajo semilla saneada de virus como en cultivos comerciales, se realiza mediante la técnica serológica ELISA, pero se ha avanzado hacia técnicas moleculares más sensibles como la RT-PCR. Este trabajo tiene por objetivo desarrollar protocolos de detección de virus mediante RT-PCR a partir de hojas y dientes de ajo. Para ello se compararon diferentes métodos de extracción de ARN, se evaluó la calidad del ARN obtenido, el tratamiento con DNasas, la síntesis de ADNc y se ajustaron las RT-PCR para los diferentes cebadores utilizados. Se ajustaron tres métodos de extracción de ARN, se logró la obtención de ADNc y se detectó la presencia de virus en el cultivo a través de RT-PCR, posibilitando realizar diagnósticos virales más precisos, que contribuyen al desarrollo de una cadena productiva de ajo semilla de sanidad controlada.

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es un cultivo de importancia mundial con 30,7 M de toneladas producidas en 1,6 M de hectáreas cosechadas (FAO, 2022). Los principales productores son China, India y Bangladesh, mientras que Argentina ocupa el tercer lugar como exportador. La provincia de Mendoza es la principal productora de ajo de Argentina con 13.841 ha cultivadas durante 2023/24, incrementándose la superficie 4% respecto a la campaña

precedente (IDR, 2024). De la producción nacional aproximadamente el 70% se exporta, 20% se consume en fresco en el mercado interno, 3% se industrializa y el resto se usa como semilla (MAGyP, 2021). Además, el cultivo es un importante generador de empleo ya que se requieren de 140 a 160 jornales por hectárea durante el ciclo del cultivo (MAGyP, 2021).



El ajo es una especie de ciclo invernal que se planta en otoño y se cosecha a principios del verano, realizándose su siembra mediante “bulbillos” o “dientes” (Portela, 2007). Esta forma de reproducción limita su mejoramiento genético solo a la selección aquellos genotipos más productivos (López Frasca et al., 1997) y debido a esto, los virus que infectan al cultivo se perpetúan a través de generaciones en los bulbillos. Generalmente, las plantas de ajo se encuentran infectadas por un complejo viral que normalmente incluye Potyvirus (*Onion yellow dwarf virus* - OYDV y *Leek yellow stripe virus* - LYSV), Carlavirus (*Shallot latent virus* - SLV) y *Garlic common latent virus* - GCLV) y Allexivirus (*Garlic virus A, B, C, D, E y X* - GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, GarVE y GarVX), que si bien no matan a la planta, la infectan en forma sistémica y crónica, y en el caso de los cultivos comerciales, provocan grandes pérdidas de rendimiento que pueden superar el 50% (Atif et al., 2020; García Lampasona et al., 2018). *Iris yellow spot virus* (IYSV), perteneciente a la familia Tospoviridae, es una plaga cuarentenaria para Argentina. Aunque aún no se ha detectado en el país, se encuentra presente en diversas

MATERIALES Y MÉTODOS

Se acondicionaron dientes de ajo de las variedades Castaño INTA, Morado INTA y Rubí INTA obtenidos en parcelas cultivadas en la EEA La Consulta – INTA (Mendoza, Argentina) y se dejaron brotar en condiciones

regiones del mundo, así como en países limítrofes como Brasil, Uruguay y Chile (Colnago et al., 2010; Nagata et al., 1999; Pappu et al., 2006; Rosales et al., 2005).

Tradicionalmente se abordó la detección de presencia de virus, tanto en la producción de ajo semilla saneada de virus como en cultivos comerciales, mediante la técnica serológica ELISA (Conci et al., 2005), pero esto ha cambiado desde que es posible emplear la metodología de RT-PCR, la cual es mucho más sensible. Si bien la detección mediante técnicas moleculares es más costosa, el nivel de sensibilidad justifica su empleo, sobre todo en sistemas de producción de material libre de virus a través del cultivo *in vitro* (Aguilar Rocha, 2019).

Ajustar las técnicas de detección viral y desarrollar protocolos mediante técnicas moleculares de alta sensibilidad adaptadas al sistema productivo de la región, posibilitará detectar virus en concentraciones menores a los de las técnicas utilizadas actualmente en el país y contribuir al desarrollo de una cadena productiva de ajo-semilla de sanidad controlada. El objetivo de este trabajo fue desarrollar protocolos de detección de virus de ajo a través de la puesta a punto y validación de técnicas de RT-PCR.

controladas. Se recolectaron hojas durante el estadio de crecimiento vegetativo inicial, se desinfectaron y se molieron utilizando nitrógeno líquido; el tejido vegetal se conservó a - 80 °C hasta su utilización (Figura 1).



Figura 1. Hojas de planta de ajo utilizadas en diferentes métodos de extracción de ARN.



Se compararon los métodos de extracción de ARN: TRIzol-reagent® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Singh et al., 2020), kit comercial Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) (Xiao et al., 2015) y CTAB (Chang et al., 1993). Luego de realizada la extracción, se evaluó por espectrofotometría la concentración y pureza del ARN obtenido mediante un espectrofotómetro DeNovix DS-11FX, obteniendo las relaciones 260/280 y 260/230 nm para medir la contaminación con polifenoles-carbohidratos y con proteínas, respectivamente. Su



integridad se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1,3% teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador de luz UV Biorad Universal Hood II Gel Doc.

Por otro lado, a partir de dientes obtenidos como se indicó precedentemente, se extrajo la hoja de brotación y se molió en una solución tampón con sorbitol (100 mM Tris – HCL pH 8; 0.35 M Sorbitol; 5 mM EDTA pH 8; 1% w/v PVP 40) (Figura 2). Posteriormente prosiguió la extracción de ARN con TRIzol-reagent® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Figura 2. Hoja de brotación utilizada en diferentes métodos de extracción de ARN.

El ARN obtenido se trató con DNasas utilizando RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA), con inhibidor de ribonucleasas RNasin® Ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) y se realizó la síntesis del ADNc empleando N6 Random Primers y M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ARN tratado con las DNasas fue purificado en columnas de limpieza NucleoSpin® (Macherey – Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el protocolo suministrado por el proveedor. El ADNc se obtuvo con EasyScript® Reverse Transcriptase, Anchored Oligo (dT)18 y Ribonuclease Inhibitor (TransGen Biotech Co., Beijing, China) siguiendo las especificaciones del fabricante.

El éxito de la reacción de retrotranscripción se corroboró mediante la amplificación de un gen constitutivo, utilizando como molde el ADNc. Se realizó la reacción de PCR en un termociclador Mastercycler Nexus GX2 (Eppendorf) para estimar la expresión del gen actina con los cebadores AsActin_Fw y AsActin_Rv.

AsActin_Rv

5'AGCACAGCCTGGATAGCAACATAC3'. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,3%, en solución tampón TBE (1x), previa tinción con bromuro de etidio, se visualizaron en fotodocumentador de luz UV Biorad Universal Hood II Gel Doc y se corroboraron por amplificación de un fragmento de 190 pb aproximadamente, estimado con el programa AmplifX 2.1.1 (AmplifX, 2021). El tamaño molecular de los mismos fue constatado utilizando el marcador de 1Kb Ladder (Promega Corporation). El ADNc de las diferentes muestras se analizó con iniciadores específicos para cada virus estudiado (Tabla 1) siguiendo las condiciones establecidas para cada juego de iniciadores (Haque et al., 2017; Nam et al., 2015). Los productos de PCR fueron revelados de la manera descrita anteriormente y se corroboró la amplificación de una banda de 182 - 185 pb para GarV, 290 pb para OYDV, 190 pb para LYSV, 170 pb para SLV (Haque et al., 2017) y 480 pb para GCLV (Nam et al., 2015).



Tabla 1: Virus más importantes en ajo y cebadores específicos para detección mediante RT-PCR.

Especie	Cebador	Secuencia	Referencia
<i>Leek yellow stripe virus</i> (LYSV)	LYSV81-410F LYSV81-535R	5'-AAGAACACCAGTTAGAGCGCG-3' 5'-TGCCTCTCCGTGTCCTCATC-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
<i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV)	OYDV81F OYDV81R	5'-TTTAGCACGTTACGCATTCTGA-3' 5'-TTACCATCCAGGCCAAACAA-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
<i>Shallot latent virus</i> (SLV/GLV)	s-GLV-F s-GLV-R	5'-TGAAGATTTGGAGGTGGGTTT-3' 5'-CGGGTAATAAGCAACGGAGA-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
<i>Garlic common latent virus</i> (GCLV)	GCLV2F GCLV1R	5'-CGACCACCTGCTGGTTGG-3' 5'-TCAAGTGGCTGCACACAAGC-3'	Nam <i>et al.</i> , 2015
GarVA	GarV-A-F GarV-A-R	5'-CCCAAGCTTACTGGGGTGAATTAGAT-3' 5'-CCCAAGCTTAGGATAAAGTCTTGAGG-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
GarVB	GarV-B-F GarV-B-R	5'-CCAAGCTTTTAATACACTGGCTTAGA-3' 5'-CCAAGCTTTATGCTTCTGGGTCAAGA-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
GarVC	GarV-C-F GarV-C-R	5'-CCCAAGCTTCATCAACAACAAAGGCG-3' 5'-CCCAAGCTTATAATGCATGATTGTGG-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
GarVD	GarV-D-F GarV-D-R	5'-CCAAGCTTAAGCATGAAGAGTGTAAG-3' 5'-CCAAGCTTTTGGGAGGAGGTTGAGA-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017
GarVX	GarV-X-F GarV-X-R	5'-GCGGTAATATCTGACACGCTCCA-3' 5'-ACGTTAGCTTCACTGGGGTAGAATAT-3'	Haque <i>et al.</i> , 2017

RESULTADOS

De los tres métodos de extracción utilizados, se destacaron TRIzol-reagent® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) modificado (Singh *et al.*, 2020) y kit comercial Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) (Xiao *et al.*, 2015) sobre CTAB (Chang *et al.*, 1993), por el menor tiempo empleado para la obtención del ARN, insumiendo los dos primeros aproximadamente 3 horas mientras que para el último se requirieron 12 horas. Además, resultó exitosa la extracción de ARN a partir de la hoja de brotación de dientes de ajo.

En todas las muestras, los tratamientos con DNasas e inhibidores de ribonucleasas, seguidos o no de purificación en columnas de limpieza, disminuyeron la

cantidad de ARN obtenido, pero elevaron su calidad, por lo que, para los objetivos perseguidos en este trabajo, se puede optar por cualquiera de las opciones descriptas.

Los cebadores utilizados para amplificar el segmento del gen actina mostraron alta especificidad, indicando que el ARN total obtenido es de buena calidad para este tipo de gen constitutivo con un tamaño de banda de 190 pb aproximadamente.

Se llevó a cabo la técnica de PCR para los diferentes virus evaluados, logrando identificar su presencia en las muestras evaluadas a través de la amplificación de bandas de tamaño esperado para cada virus (Figura 3 y 4).



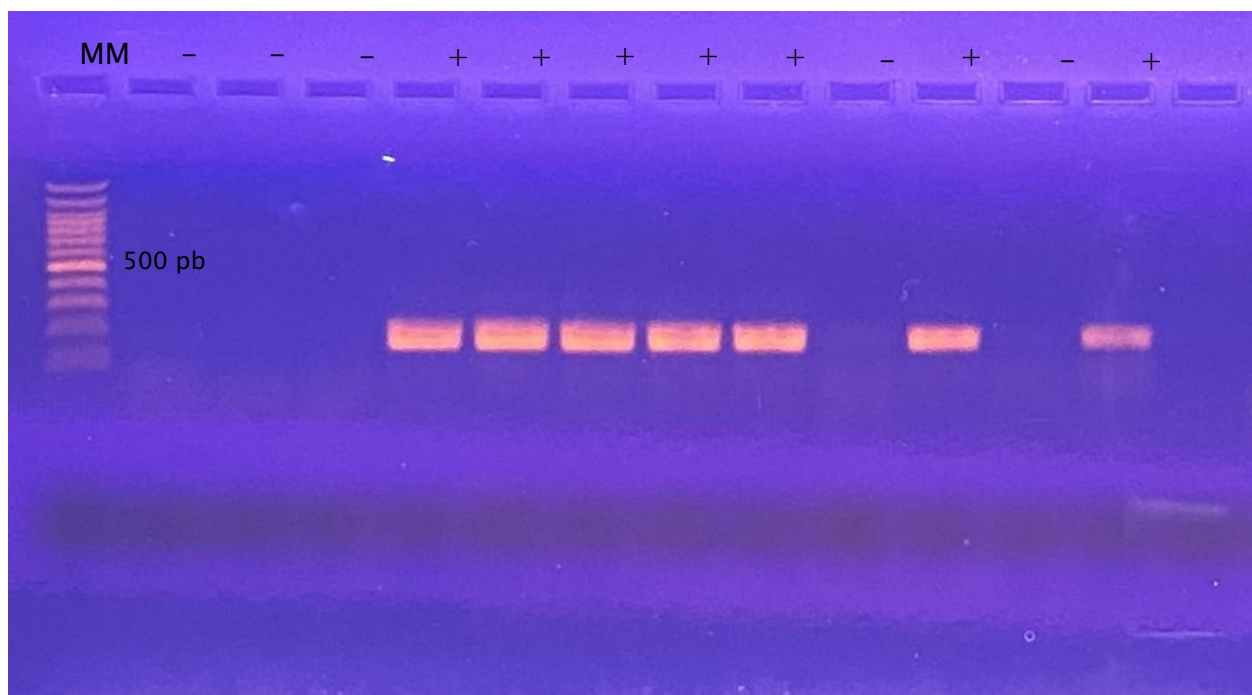


Figura 3 (LYSV). Electroforesis en gel de agarosa al 1,3% de los productos de RT-PCR con iniciadores para *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (190 pb). De izquierda a derecha: Calle 1 (MM): marcador 1Kb Ladder (Promega Corporation); calles 2, 3, 4, 10 y 12: control negativo (-); calles 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 13: muestras positivas (+).

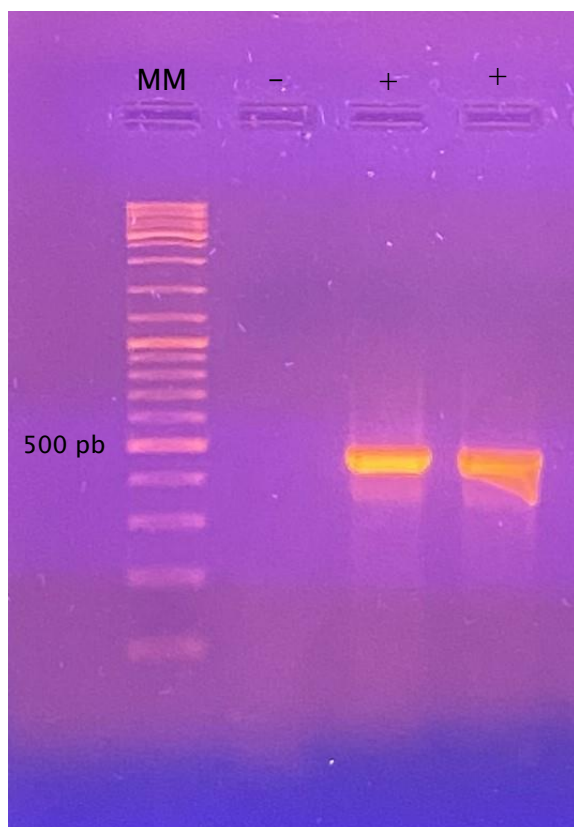


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,3% de los productos de RT-PCR con iniciadores para *Garlic common latent virus* (GCLV) (480 pb). De izquierda a derecha: Calle 1 (MM): marcador 1Kb Ladder (Promega Corporation); calle 2: control negativo; calles 3 y 4: muestras positivas.



CONCLUSIÓN

Se ajustaron exitosamente diferentes técnicas de extracción de ARN, purificación, obtención de ADNc y verificación de la retrotranscripción, permitiendo detectar, a través de las diferentes reacciones de RT-PCR, los virus OYDV, LYSV, SLV, GCLV y GarV a partir de hojas y bulbillos de ajo de las variedades Castaño INTA, Morado INTA y Rubí INTA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AmplifX 2.1.1 by Nicolas Jullien; Aix-Marseille Univ, CNRS, INP, Inst Neuropsychiopathol, Marseille, France <https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr>"
- Aguilar Rocha, A.E. 2019. Identificación e incidencia de virus patógenos en el cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.) en Aramberi, Nuevo León. Disponible en <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/18574>
- Atif, M.J.; Amin B.; Ghani, M.I.; Ali M. and Cheng, Z. 2020. Variation in morphological and quality parameters in garlic (*Allium sativum* L.) bulb influenced by different photoperiod, temperature, sowing and harvesting time. *Plants* 9 (2): 155. <https://doi.org/10.3390/plants9020155>
- Chang, S.; Puryear, J. and Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2): 113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Colnago, P.; Achigar, R.; González, P.H.; Peluffo, S.; González Idiarte, H.; Pianzola, M.J. and Galván, G.A. 2010. First Report of *Iris yellow spot virus* on *Onion* in Uruguay. *Plant Disease* 94 (6): 786–786. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0786A>
- Conci, V.C.; Perotto, M.C.; Cafrune, E. and Lunello, P. 2005. Program for intensive production of virus-free garlic plants. *Acta Horticulturae* 688: 195–200. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.688.25>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2022. FAOSTAT. Available at <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- García Lampasona, S.; Conci, V.; Merino, M.C.; Giménez, M.; Celli, M. y Strumia, G. 2018. Evaluación y caracterización de genes involucrados en la interacción de cultivares tolerantes y/o susceptibles de ajo (*Allium sativum* L.) a *Allexivirus Garv-A* p 53-54. En A.M. Gochez (Ed.) *Defensa en plantas contra fitopatógenos*. Ediciones INTA.
- Haque, M. and Hattori, K. 2017. Detection of viruses of Bangladeshi and Japanese garlic and their elimination through root meristem culture. *Progressive Agriculture* 28 (2): 55–63. <https://doi.org/10.3329/pa.v28i2.33465>
- IDR. Instituto de Desarrollo Rural de Mendoza. 2024. Disponible en https://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2024/01/Cultivo_Ajo_2023.pdf
- López Frasca, A.; Silvestri, V. y Rigoni, C. 1997. Métodos convencionales en el mejoramiento genético del ajo p. 32-48. En J. L. Burba (Ed.) 50 temas sobre producción de ajo. Volumen 2: Cultivares y producción de semillas. Ediciones INTA.
- MAGyP. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. 2021. La Producción de Ajo en la Argentina. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/la-produccion-de-ajo-en-la-argentina-noviembre-2021-magyp.pdf>
- Nagata, T.; Almeida, A.C.L.; Resende, R.O. and Ávila, A.C. 1999. The Identification of the vector species of *Iris yellow spot tospovirus* occurring on onion in Brazil. *Plant Disease* 83 (4): 399. PMID: 30845603. doi: <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.4.399a>
- Nam, M.; Lee, Y.H.; Park, C.Y.; Lee, M.A.; Bae, Y.S.; Lim, S.; Lee, J.H.; Moon, S.J. and Lee S.H. 2015. Development of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. *Plant Pathology Journal* 31 (1): 90-96. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.10.2014.0114>
- Pappu, H.R.; du Toit, L.J.; Schwartz, H.F. and Mohan, S.K. 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris Yellow Spot Virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Arch Virology* 151 (5): 1015-23. Epub 2005 Nov 30. PMID: 16320007. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0681-z>
- Portela, J.A. 2007. Ajo argentino. Pautas de cultivo para la Región Andina Central Argentina. 1° Ed. Ediciones INTA. 88 p.
- Rosales, M.; Pappu, H.R.; López, L.; Mora, R. and Aljaro, A. 2005. *Iris yellow spot virus* in onion in Chile. *Plant Disease* 89 (11): 1245. PMID: 30786464. <https://doi.org/10.1094/pd-89-1245c>
- Singh, J.; Sing, M.K.; Ranjan, K.; Kumar, A.; Kumar, P.; Sirohi, A. and Baranwal V.K. 2020. First complete genome sequence of *garlic virus X* infecting *Allium sativum* - G282 from India. *Genomics* 112 (2): 1861–1865. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.020>
- Xiao, H.; Kim, W.S. and Meng, B. 201. A highly effective and versatile technology for the isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. *Virology Journal* 12 (1): 171. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0376-3>

