

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE ARN SATÉLITES DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (CMV-ARNsat) EN MARACUYÁ (*Passiflora edulis*) EN EJE CAFETERO Y NORTE DEL VALLE

Rios Marin, Johan Mateo<sup>1</sup> & Rincón López, Juan Diego<sup>2</sup>

## RESUMEN

El Virus del Mosaico del Pepino (*Cucumber mosaic virus*) es un agente viral ampliamente distribuido en diferentes cultivos y plantas silvestres del mundo, siendo un fitopatógeno de alta importancia agrícola, ya que ocasiona grandes pérdidas en la producción a nivel mundial de hortalizas, legumbres y frutas. El CMV puede estar acompañado de un ARN satélite, el cual es una molécula no codificante que puede atenuar o inducir a una súper expresión de los síntomas en las plantas, llegando a aniquilar en cuestión de semanas las plantaciones. Diversas epidemias atribuidas a este virus reportado a nivel mundial, se han asociado a la presencia de ARNsats-CMV. Una identificación oportuna es vital para el control de este patógeno y la estructuración de planes de manejo. Este trabajo está dirigido a detectar, identificar y caracterizar poblaciones de ARN satélites en cultivos de Maracuyá (*Passiflora edulis*) en diferentes zonas productivas del Norte del valle y del Eje cafetero. Se tomaron muestras de ocho fincas, se caracterizaron los síntomas y se utilizó la prueba de hibridación por dot-blot con sondas marcadas con digoxigenina para su detección y los resultados se reconfirmaron por RT-PCR con cebadores específicos para el CMV y los ARNsats. Se espera analizar los niveles de incidencia y secuenciar los resultados para realizar su caracterización genética, detectando la presencia del satélite, y esperando detectar los niveles de incidencia en las zonas estudiadas analizando filogenéticamente las muestras para determinar la existencia de la variabilidad genética de este virus entre los reportes positivos, los ARNsats y entre las regiones estudiadas.

**Palabras claves:** *Cucumber mosaic virus*, ARN satélite, *Passiflora edulis*, hibridación, RT-PCR.

## INTRODUCCIÓN

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*-CMV) es uno de los patógenos de plantas más importantes en el sector agrícola a nivel mundial, el cual cuenta con gran cantidad de hospedantes, alta variabilidad genética y amplia gama de mecanismos de diseminación, haciendo de este agente viral una amenaza para los sectores hortofrutícolas de Colombia y el mundo (Kouadio et al., 2013).

1. Estudiante del programa de Biología de IX semestre Unisarc. Semillero de Microbiología, johanmateorios@hotmail.es

2. Profesor de Unisarc. Director del trabajo, Ingeniero agrónomo Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. juand.rincon@unisarc.edu.co

Este patógeno se caracteriza por tener un genoma dividido en tres o tripartito, con ARNs de cadena simple en sentido positivo, los cuales están involucrados en la síntesis de la proteína de la capsida, la replicasa e intervienen con el movimiento viral (Du et al., 2008). De igual manera, el CMV puede presentar en su genoma un cuarto segmento, denominado ARN satélites (ARNsats), los cuales dependen del virus auxiliar para la replicación y la infección de las células hospedantes. Estas partículas subvirales modulan los síntomas inducidos por el virus del mosaico del pepino ocasionando atenuación o superexpresión de estos, causando clorosis, necrosis sistémica, e inclusive la muerte de la planta (Kaper *et al.*, 1976; Mossop y Francki, 1977; Gonsalves *et al.*, 1982; Jacquemond y Leroux, 1982; Roossinck *et al.*, 1992; Escriu et al., 2000.; Hu, 2009; Hull, 2009).

A nivel mundial, el CMV ha ocasionado importantes epidemias en diversos cultivos, los cuales se han caracterizado por la presencia de ARN satélites en las diferentes cepas virales. En Colombia, diversos autores han manifestado la gran variación en cuanto a la intensidad de los síntomas ocasionados por este agente patógeno, lo cual puede estar relacionado con la presencia de estas partículas subvirales en el genoma de este Cucumovirus. (Reichel *et al.*, 1996, Martínez *et al.*, 2002, Morales *et al.*, 2009).

Este trabajo de investigación es de importancia, ya que en las zonas productoras de maracuyá de nuestro país, no hay reportes claros sobre la presencia del ARN satélite en el genoma del virus del mosaico del pepino (CMV) y de igual manera, los niveles de incidencia tanto de la partícula subviral como del virus auxiliar son una incógnita.

Por eso nace la pregunta ¿Cómo se encuentra la población y la densidad del ARN satélite-CMV dentro del cultivo de Maracuyá en el eje cafetero y Norte del Valle del Cauca y su incidencia presente en el mismo sector productivo dentro de la región de estudio? La cual pretende solucionar este trabajo en curso.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus-CMV*) es uno de los virus más importantes en la agricultura y considerado uno de los principales problemas fitosanitarios en la producción de hortalizas y frutales, llegando a ocasionar pérdidas cuantiosas alrededor del mundo (Kouadio *et al.*, 2013). Este agente viral afecta cerca de 1200 especies vegetales distribuidas en 100 familias botánicas, puede ser diseminado fácilmente, siendo transmitido por semilla, de forma mecánica y por cerca de 80 especies de pulgones (Hemiptera-Aphididae) de forma no persistente, destacándose las especies *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* (Edwardson y Christie, 1991; Palukaitis y García-Arenal, 2003).

El ARN viral del CMV está compuesto por tres unidades que se encapsidan en partículas isométricas independientes (Schwinghamer y Symons, 1975), además es virus auxiliar de ARN satélites (García-Arenal y Palukaitis, 1999). Los ARNsats afectan la acumulación, transmisión y modifican los síntomas de CMV en una interacción que depende del aislamiento del virus y el hospedante (Kaper *et al.*, 1976; Mossop y Francki, 1977; Gonsalves *et al.*, 1982; Jacquemond y Leroux, 1982; Escriu *et al.*, 2000).

Históricamente el CMV ha ocasionado epidemias en países como Francia (Marrou *et al.*, 1973), Italia (Gallitelli *et al.*, 1988), Japón (Kosaka *et al.*, 1989) y España (Jordá *et al.*, 1992), en las cuales el agente viral se encontraba asociado con ARN satélites, ocasionando síntomas mucho más intensos de lo normal, llegando a aniquilar en cuestión de días las plantaciones (Jordá *et al.*, 1992). Según Jacquemond y Lot (1982) los ARNsats pueden llegar a ser muy infecciosos y destructivos.

El virus del mosaico del pepino (CMV) en Colombia ha sido reportado en diferentes hospedantes, tales como: plátano (*Musa sp.*) (Alarcón *et al.*, 2006; López, 2009; Becerra *et al.*, 2011), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Morales *et al.*, 2009), frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Morales *et al.*, 2008), gulupa, maracuyá (*Passiflora edulis*) (Camelo, 2010; Carmona *et al.*, 2011), pimentón (*Capsicum annuum* L.) (Carmona *et al.*, 2011), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) (Jaramillo *et al.*, 2011) entre otros. La mayoría de los reportes de este virus en nuestro país, describen una gran variabilidad de síntomas y diferencias en la expresión de los mismos entre plantas u hospedantes (Reichel *et al.*, 1996, Martínez *et al.*, 2002, Morales *et al.*, 2009), lo cual podría estar asociados a la presencia de ARNsats en las poblaciones de CMV.

En Colombia, trabajos preliminares de Becerra *et al.*, (2011), describen la presencia de ARNsats en plantaciones de plátano detectadas mediante hibridación molecular, de igual manera, Carmona *et al.*, (2011), describe la presencia de estas partículas subvirales en cultivos de tomate, fríjol, maracuyá, pimentón y plátano. Sin embargo, no se conocen los aspectos relacionados con su epidemiología, virulencia, hospedantes susceptibles, vectores, síntomas y distribución en las poblaciones de CMV, ni mucho menos, se tiene conocimiento de la variabilidad genética de estos asociados al cultivo de maracuyá en las zonas productoras del eje cafetero y norte del Valle del Cauca.

Para establecer estrategias de prevención y control adecuadas para el CMV (*Cucumber mosaic virus*) es fundamental conocer la capacidad de variación y de evolución de las poblaciones virales y de los factores genéticos y ecológicos implicados en la interacción entre los virus, el hospedante y sus vectores.

## JUSTIFICACIÓN

El Virus del Mosaico del Pepino (CMV) infecta a 1200 especies de plantas, entre las ellas: Tomate, Ahuyama, Plátano, Pepino, Curuba, Granadilla, Habichuela, Repollo, Papa, Tomate de Árbol, Pimentón, Frijol y Maracuyá, esta última, diagnosticada recientemente como hospedante del CMV y su ARN satélite. (Carmona, 2011). El *Cucumber mosaic virus* ha sido asociado a importantes epidemias a nivel mundial, en donde el genoma viral se encontraba asociado a ARN satélites, intensificando los síntomas, llegando a destruir plantaciones enteras.

Además el CMV es altamente contagioso por su modo de transmisión mecánica (herramientas contaminadas) y biológica (Semillas y Áfidos) siendo este último un visitante esporádico y las medidas de control existentes son ineficaces. Y, en los últimos años se han identificado más de 100 variantes del ARNsats algunos silenciosos, otros solo afectan el crecimiento y algunos lleva una necrosis vascular (Muerte masiva de la planta y en el peor de los casos cultivos). Que a nivel mundial se han presentado casos del epidemias por CMV y ARNsats-CMV; como las ocurridas en los principios de setenta y ochenta en España donde el CMV expreso altos niveles de necrosis en las plantaciones de tomate, en 1992 en España necrosis en los cultivos de pepino causando pérdidas superiores a 200 millones € y asilando los productos agrícola Españoles.

Siendo la agricultura un renglón importante en la economía de Caldas, Risaralda y el Norte del Valle y donde en las últimas dos décadas las plantaciones de Maracuyá han ocupado un puesto importante dentro de las importaciones al resto del país y donde este fruto ha ocupado un mayor interés en el sector frutícola; es de vital importancia clasificar las patologías de estas plantaciones dentro de un entorno local. De allí radica este estudio, pretendiendo caracterizar las poblaciones de CMV y dentro de estas identificar la presencia del CMV-ARN; y al estar presente el ARN no codificante asociado a CMV se genera el primer reporte en los departamentos de estudio, permitiendo encender las alarmas y enfocar los esfuerzos para emprender programas de generación de variedades resistentes a las cepas de CMV y CMV-ARNsats en las universidades de estos departamentos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar molecularmente poblaciones de ARN satélites (CMV-ARNsat) en poblaciones del Virus del Mosaico del Pepino (*Cucumber Mosaic Virus - CMV*) presentes en áreas cultivadas de *Passiflora edulis* en el Eje cafetero y Norte del Valle.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Detectar el virus del mosaico del pepino (CMV) y su ARN satélite (ARNsat) en *Passiflora edulis* mediante hibridación molecular y RT-PCR
- Cuantificar los niveles de incidencia del ARN satélite y su virus auxiliar en zonas productivas del eje cafetero y norte del valle
- Caracterizar la diversidad genética del *Cucumber mosaic virus* y su ARNsats de acuerdo a los diferentes aislados de las diferentes zonas evaluadas

## **REFERENTE TEORICO**

En momentos en que para el Eje Cafetero y el Norte del Valle la producción y comercialización de frutas está adquiriendo gran importancia, no solo por las ventajas

comparativas y competitivas que la región tiene para la implementación de proyectos integrales en especies frutales, sino por las tendencias mundiales que muestran incrementos considerables en el consumo de frutas. La maracuyá es una fruta donde sus cultivos están expandiendo sus números representando un importante renglón en el sector frutícola.

Se considera originaria de la región amazónica, aunque crece de forma silvestre en un área que abarca principalmente desde Colombia hasta el norte de Chile, Argentina, Uruguay y Paraguay (Taborda, 2013), ahora es cultivada en Hawái, Australia y otras islas del pacífico sur. Es trepadora y puede alcanzar 9 m de longitud en condiciones climáticas favorables, aunque su periodo de vida no supera la década. Su tallo es rígido y leñoso, presenta hojas alternas de gran tamaño, perennes, lisas y de color verde oscuro. Una misma planta puede presentar hojas no lobuladas cuando se empieza a desarrollar y luego hojas trilobuladas, raíces superficiales, y se adhiere por medio de zarcillos con flores perfectas y de gran vistosidad, solitarias (Ligia *et al*, 2010).

Presenta gran vulnerabilidad por agentes virales, entre ellos se destacan *Passiflora ringspor virus* (PRV) (DE Wijs, 1974); *Passion fruit mottle virus* (PaMV) (Wyle & Jones, 2011); *Passiflora virus* (PaVY) (Maciel *et al*, 2009); *Soybean mosaic virus* (SMV) (Jiang *et al*, 2017); *East Asian Passiflora virus* (EAPV) (Chiaki *et al*, 2016); *Passiflora latent virus* (PLV) (Rodríguez *et al*, 2016); *Passion fruit yellow mosaic virus* (paYMV) (Swamy *et al*, 2016); *Purple granadilla mosaic virus* (PGMV) (Rodríguez *et al*, 2016); *Maracuja mosaic virus* (MarMV) (Rodríguez *et al*, 2016) y el más peligroso e importante es el *Cucumber mosaic virus* (CMV) (De La Torre- Almaraz *et al*, 2016); el cual presenta un genoma de cadena simple de ARN en sentido positivo, segmentado en tres partes o tripartito, denominados ARN-1, ARN-2 y ARN-3; aunque adicionalmente presenta un cuarto segmento subgenómico (Dandlen, 2016). La proteína 1ª es traducida por ARN-1 y colabora con el complejo de la replicasa del virus. . En ARN-2, con un componente subgenómico (ARN-4A), codifica las proteínas 2a y 2b multifuncionales, que junto con la proteína 1a, forman la replicasa viral; hacen parte también de la inducción de síntomas, movimiento viral y de la supresión del ARN de interferencia emitido por la planta como mecanismo de defensa. El ARN-3 codifica dos proteínas: la 3a que es la proteína del movimiento y la 3b que es la proteína de la cápside, que se traduce a partir del ARN-4 subgenómico (Gonzales, 2016)

Éste tipo de genoma, puede conducir a que se presenten múltiples recombinaciones si se da la presencia de otra cepa de CMV infectando una misma célula (Roossinck, 2002). Adicional a éste mecanismo, se ha encontrado que el CMV a través de su proteína 2b, puede recombinarse con el Virus de la Aspermy del Tomate (Tomato Aspermy Virus), que pertenece al mismo género (Cucumovirus). Esta condición hace que el virus presente alta variabilidad genética, con numerosas recombinaciones posibles. Aunque ésta condición no se presenta frecuentemente en poblaciones naturales, respecto a éste tema se han planteado dos hipótesis: una primera que declara que éste intercambio genético puede hacer contrapeso a las pérdidas de viabilidad del virus, dada la acumulación de mutaciones deletéreas a través de un efecto llamado “trinquete de Müller” dado por errores en la replicación del ARN. La segunda hipótesis plantea que la rápida tasa de replicación

presentada en pequeñas partículas de ARN comparada con un hipotético genoma no dividido, puede resultar en la selección intracelular de pequeños ARNs y llevar a la evolución de un multipartitismo (Fraile *et al*, 1997; Carmona Y Betancourt, 2013).

Los ARNsat de CMV son moléculas de ARN lineales, monocatenarias y no codificantes que dependen de CMV para su replicación, encapsidación y transmisión. De acuerdo a su tamaño se puede clasificar en dos grupos; los de 332 a 342 nucleótidos los cuales se han descrito en todo el mundo y los de 368 a 405 procedentes de Italia, Japón y China (García-Arenal y Palukaitis, 1999). El empaquetamiento del satélite es mediado por la proteína de la cápside del virus, y se encapsida junto con el genoma de CMV, lo cual favorece la transmisión mediada por los mismos áfidos que transmiten el CMV (Yeturu *et al*, 2016)

En éste sentido, la estructura secundaria es muy importante para determinar la funcionalidad biológica de las moléculas de ARN, por cual, la estructura secundaria más que la primaria, es la responsable de los diferentes fenotipos sintomáticos (Yeturu *et al*, 2016). El CMV-ARNsat, puede modular los síntomas causados por el virus auxiliar; ésta modulación puede ir desde la atenuación hasta la exacerbación, por ejemplo se han reportado necrosis en tomate (Jordá *et al*, 1992) y clorosis en pimentón (Seung- Kook *et al.*, 2011), como producto de la presencia de CMV-ARNsat en infecciones por CMV. Dada ésta condición, diferentes investigadores han planteado la posibilidad de usar los satélites que atenúan los síntomas como herramienta para el control de los daños causados por síntomas severos de CMV.

La agricultura se enfrenta continuamente a problemas fitosanitarios y con esto, a la variación de los agentes que los producen. La capacidad de variación y evolución de estos puede comprometer seriamente la eficacia de las estrategias diseñadas para su control. En el caso de las enfermedades producidas por virus, los métodos de control más frecuentes son el uso de medidas preventivas destinadas a reducir las fuentes de inóculo, el desarrollo de resistencia y disminución de la infección (Moriones y Luis, 1996; Escriu P, 2000; Moriones y Luis, 1996; Escriu P, 2000).

Las plantas pueden resultar resistentes frente a las infecciones por virus cuando se han introducido en su genoma genes de resistencia procedentes de otros genotipos o especies mediante técnicas de mejora convencional como lo descrito por Fraser en 1998, o secuencias derivadas del virus mediante técnicas de ingeniería genética (resistencia derivada del patógeno) (Baulcombe, 1996; Escriu P, 2000). Además las plantas pueden adquirir resistencia a un virus al ser inoculadas con cepas atenuadas de éste (protección cruzada) (Fraser, 1998; Lecoq, 1998). La capacidad de variación y evolución de los virus y de sus vectores puede limitar en gran medida la eficacia de estas estrategias de control. Es frecuente, por ejemplo, que los vectores puedan desarrollar resistencia a la acción de los productos fitosanitarios (May, 1993; McKenzie y Batterham, 1994), y que aparezcan nuevas cepas del virus de mayor virulencia capaces de superar la protección conferida a la planta por los genes de resistencia (Harrison *et al.*, 1987).

Los virus son económicamente importantes cuando producen reducciones significativas en la producción o en la calidad de los productos de las plantas (Beorlegui, 1992). En la

industria de la agricultura, el Virus de la familia del Mosaico (Mosaic Virus – MV), es importante, ya que está ampliamente distribuido en diferentes regiones del mundo, afectando platas cultivadas y silvestres (Carmona, 2013). Se tienen reporte de 1200 especies pertenecientes a 100 familias taxonómicas y los números pueden aumentar a medida que se conoce más sobre ellos (Palukaitis y García-Arenal, 2003.) entre las familias se destacan Asteraceae, Brassicaceae, Solanaceae y Cucurbitaceae (Conti y et al., 2000, Francki 1980 y Habili, 1987). Alrededor del mundo se han reportado importantes epidemias de CMV en países como Costa Rica afectando cultivos de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), Melón (*Cucumis melo* L.), Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), Ahuyama (*Cucurbita máxima Duchense* in Lam.), Petunia (*Petunia axillaris* Lam.), Calabacín (*Cucurbita pepo* L.), Plátano (*Musa spp.* L.), entre otros (Hord y col, 2001); en España afectando Melón, Tomate, Pimiento y Calabacín (Luis-Arteaga y col, 1998 y Alonso-Prados, 1998); en Italia afectando Tomate, Tabaco y otras plantas silvestres (Grieco, Lavave y Gallitelli, 1997); y en India en plantas silvestres (*Amaranthus tricolor* L., *Datura innoxia* Mill. e *Hyoscyamus muticus* L.) (Srivastava y Raj, 2004). Además es un virus que se disemina por semilla y por transmisión mecánica en algunos huéspedes; pero de manera más eficiente por aproximadamente 80 especies de áfidos, de forma no persistente (Palukaitis y García-Arenal, 2003.)

En el Eje Cafetero no existen registros de la presencia de asociación entre CMV y CMV ARNsats en poblaciones de Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims). Además los agentes causales de las enfermedades en Maracuyá son limitados a nivel internacional. En Colombia se ha identificado y descrito la sintomatología de CMV (Reichel *et al*, 1996; Martínez *et al*, 2002; Morales *et al*, 2009; Camelo, 2010) pero no existen registros de la asociación entre CMV y ARNsats-CMV en poblaciones naturales, por lo cual su estudio se orienta a partir de los hallazgos en enfermedades de otras especies, como los trabajos preliminares de Becerra *et al*, 2011; donde se describe la presencia de ARNsats- ARN en plátano, el cual fue detectado por hibridación molecular. Sin embargo, se desconoce la distribución de estas poblaciones, sus síntomas, su incidencia, ni se tiene conocimiento de la variabilidad genética de estos. De allí radica la importancia de este estudio, donde se pretende caracterizar la variabilidad genética de poblaciones ARNsats-CMV en cultivos de Maracuyá en el eje cafetero.

## METODOLOGÍA

Se recolectó muestras en diferentes regiones de los departamentos Caldas (Palestina y Viterbo), Risaralda (Belén de Umbría y Dosquebradas) y Norte del Valle del Cauca (El Toro y Bolívar) destinadas al cultivo de maracuyá de las cuales se tomó tejido foliar de plantas tanto asintomáticas como sintomáticas de forma sistemática en varios niveles (inferior, medio y superior) en los brotes, al azar, abarcando el 1 y 5% de la población total de individuos en el cultivo. Se rotularon y marcaron con datos de la localidad donde fueron tomadas la muestra y se almacenó en condiciones de baja temperatura para ser trasladadas al campus universitario de Santa Rosa de Cabal (Unisarc).

Las muestras se procesaron en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales de la Corporación Universitaria de Santa Rosa de Cabal, sede el Jazmín en el kilómetro 4 vía Santa Rosa de Cabal – Chinchiná. Las muestras recolectadas se mantuvieron en frío (4°C) antes de ser procesadas. Para la obtención de los ácidos se usó el protocolo descrito por Hafnery (Hafner *et al*, 1995; Chingandu *et al*, 2017) (tabla 1), el cual fue previamente estandarizado como el método más eficiente para la extracción a partir de tejidos vegetales (Ycketeng *et al*, 2011; Gomez y Betancourt, 2012; Carmona y Betancourt, 2013).

**Tabla 1. Protocolo de extracción**

<b>Hafner <i>et al</i>, 1995</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 gr de tejido vegetal triturarlos en presencia de Nitrógeno líquido</li> <li>• Agregar Sodio Dodecil Sulfato</li> <li>• SDS, al 1% en proporción 1:1 con relación al tejido vegetal</li> <li>• Agregar Fenol (1:1)</li> <li>• Adicionar cloroformo (1:1)</li> <li>• Mezclar vigorosamente</li> <li>• Centrifugar a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 15´</li> <li>• Recoger el sobrenadante</li> <li>• Re-extraer con un volumen igual de cloroformo</li> <li>• Mezclar vigorosamente</li> <li>• Centrifugar a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 15´</li> <li>• Recoger el sobrenadante</li> <li>• Precipitar los ácidos nucleicos totales con Isopropanol en una relación (1:0,25)</li> <li>• Precipitar por centrifugación a máxima velocidad (13.000 a 14.000 rpm) por 10´</li> <li>• Secar el precipitado por 5 minutos a temperatura ambiente</li> <li>• Resuspender con H2O bidestilada estéril</li> </ul>

**Detección del CMV y su ARN satélite.** La detección del virus y los ARNsats se realizó a través de la técnica de hibridación molecular con sondas marcadas con digoxigenina, utilizando el protocolo descrito por Roche Diagnostic Cat No. 11 363 514 910. Esta técnica se basa en la detección inmunoenzimática con anti-digoxigenina en la cual, fragmentos de Fab conjugados con la fosfatasa alcalina son visualizados con quimioluminiscencia a través de un substrato de revelado, CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan}-4-yl) phenyl phosphate). La desfosforilación del CSPD por la fosfatasa alcalina lleva a la emisión de luz la cual puede ser recuperada en películas de rayos X. Las muestras positivas son aquellas que producen una señal oscura y dos veces más intensa que la señal de los controles negativos (plantas sanas no infectadas).

Para el virus del Mosaico del Pepino-CMV, se utilizará una sonda de ARN marcada con digoxigenina cedida por el laboratorio de virus de las plantas del centro de Biotecnología y genómica de plantas, CBGP –Universidad Politécnica de Madrid, la cual es complementaria a los nucleótidos 1933 a 2215 del ARN 3 de CMV-Fny (Acc. No. D10538), que hibrida con el extremo 3´ no codificante de los tres ARNs genómicos de CMV-Fny.

El mismo procedimiento descrito en el apartado anterior se utilizará para detectar la presencia de ARN satélite, utilizando una sonda de ARN complementaria a la longitud total del ARN satélite B2 (Acc. No. M16587) (Bernal y García-Arenal, 1994). Una vez detectado el virus y su ARN satélite en cada especie vegetal evaluada, se cuantificará la incidencia o prevalencia de las diferentes zonas productivas, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{INCIDENCIA: } \frac{\text{PE} - \text{PA}}{\text{PE}} \times 100$$

PE

En donde:

**PE:** Plantas evaluadas

**PA:** Plantas afectadas con CMV y ARNsats.

**Amplificación por RT-PCR.** A partir de los resultados obtenidos en la hibridación, se tomarán las muestras positivas para ARNsats y se amplificarán por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) con el kit de transcriptasa reversa marca Bioline®. Se utilizarán diferentes cebadores para los ciclos de amplificación en la RT y en la PCR.

#### Cebadores utilizados

Nombre	Secuencia	Temperatura de anillamiento	Posición de Nucleótidos	Autor / Tamaño de fragmento
Sat c	5'-ACAAGCTTGGGTCCTGYAGAGGAAT-3'	69°C	1 – 22 *WL3-satellite	Gafny, <i>et al.</i> ,1996
Sat d	5'-GACGAATTCGTTTTGTTTGTATWTRGAGAATT-3'	70°C	324 – 340 WL3-satellite	340 nucleótidos
CM53	5'-GGAATCCCGGGTCCTG-3'	65,4°C	1 – 22 *WL3-satellite	Escriu <i>et al.</i> ,2000
CM5	5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGTTTTGTTTG-3'	67,8°C	324 – 340 WL3-satellite	340 nucleótidos

Una alícuota de 5 µl de la reacción obtenida, se transfiere a otra reacción de PCR en presencia de los cebadores y de la ADN polimerasa. Una vez amplificados, los productos de PCR se separarán por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris, Ácido acético, EDTA) 1%, teñidas con bromuro de etidio. Los geles se observarán en un fotodocumentador marca BioRad® y las bandas que posean el tamaño correspondiente al de las secuencias de ARNsats, serán cortadas y preparadas para su purificación.

**Purificación de las muestras.** Una vez amplificado, el virus es purificado a partir del gel de agarosa. El proceso de elución se llevará a cabo por medio del kit de purificación Quiagen, Ref, QIAquick® Spin Handbook (2008).

**Secuenciación.** Los productos eluidos serán enviados directamente a MACROGEN (Seul, Corea del Sur), donde las procesarán para entregarnos los respectivos cromatogramas. Las secuencias se limpiarán de indeterminaciones con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, 1997, posteriormente serán comparadas en el GenBank, utilizando el software BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool - Altschul *et al.*, 1990) para encontrar similitudes. Posteriormente las secuencias se alinearán utilizando CLUSTALX

(Thompson *et al.*, 1998). Para los análisis filogenéticos y evolutivos se utilizará el programa MEGA, versión 5.1 beta, usando el algoritmo de máxima parsimonia con bootstrap de 1000 réplicas, las distancias evolutivas se evaluarán por el método de parámetros Kimura-2 (Tamura *et al.*, 2011).

## RESULTADOS OBTENIDOS

**Detección del CMV y ARNsats.** A partir de muestras de campo se identificaron síntomas de clorosis, encrespamiento de las hojas y disminución en la formación del área foliar. Al tomar las muestras y observarlas a contra luz, se observaron puntos cloróticos, típicos del virus del mosaico del pepino (CMV).

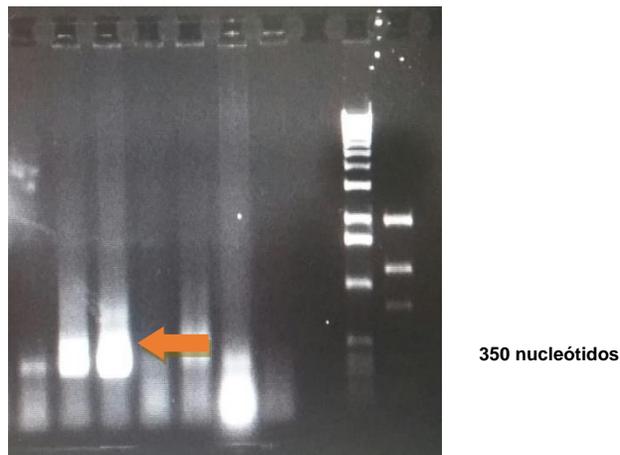
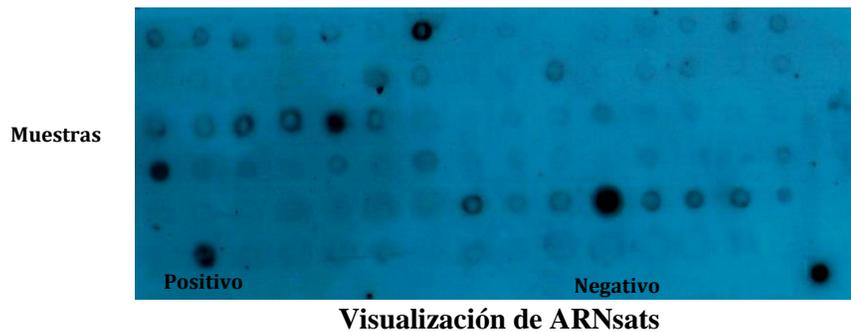
### Síntomas del *Cucumber mosaic virus* en campo



Posterior a al reconocimiento de síntomas en campo y la posterior extracción de material genético (Ácidos nucleicos totales) mediante el protocolo de Hafner *et al.*, 1995, se detectó mediante hibridación molecular el CMV y su ARN satélite, obteniendo como resultado puntos oscuros en la membrana de nitrocelulosa para muestras infectadas con el virus y su ARNsats, lo contrario a muestras sanas, la cual no expresaron ningún patrón.

A partir de la reacción de RT-PCR, se encontró mediante la electroforesis y visualización al fotodocumentador, bandas de 350 nucleótidos, las cuales corresponden a la presencia de ARN satélites del virus del mosaico del pepino.

### Hibridación sonda CMV y ARNsat marcada con digoxigenina



### RESULTADOS ESPERADOS

- Cuantificación de los niveles de incidencia del CMV y su ARN satélite en las diferentes zonas productivas.
- Las muestras positivas al virus y su ARNsat cuantificadas mediante hibridación molecular y RT-PCR, serán enviadas a secuenciar a Korea y se realizarán posteriores análisis filogenéticos.
- Se compararán los ARN satélites encontrados con otros citados en la base de datos del NCBI, para determinar su cercanía a aislados Europeos y Asiáticos, estimando la posible presencia de partículas subvirales que puedan provocar posibles epidemias en América latina.

### CONCLUSIONES

Se detectó mediante hibridación molecular y RT-PCR el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*) y su ARN satélite.

Se espera mandar a secuenciar aislados de las diferentes zonas productoras del eje cafetero y norte del Valle del Cauca.

### IMPACTO SOCIAL

El Virus del Mosaico del Pepino al ser un virus muy contagioso y peligroso para los cultivos de la región representa un factor de pérdidas económicas en el sector agrícola; el cual numerosas familias dependen de su finca y la presencia de este patógeno representa una vulnerabilidad a la seguridad alimentaria de nuestros hogares campesinos y el abastecimiento de productos agrícolas al sector urbano. Además, el conocimiento de los agentes causales de las enfermedades en maracuyá es limitado a nivel nacional por lo cual su estudio y manejo se da por modelos foráneos a Colombia, por eso este trabajo tiene la función de dar a conocer al agricultor de los riesgos del CMV y tomar medidas preventivas, ya que las estrategias de control de las enfermedades virales involucran erradicación o disminución de cultivos, cuando ya se ha sobre expresado el patógeno, siendo otro aporte de este estudio la identificación y diagnóstico temprano de la enfermedad para tomar la medida apropiada para el control y conocer dentro de la zona de estudio su área de distribución para tomar las medidas de prevención.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bernal, J. J., and García-Arenal, F. (1994). Analysis of the determinants of the satellite RNA of Cucumber mosaic cucumovirus for high accumulation in squash. *Virology*, 205: 262 – 268.
- Betancourt, M., Carmona, s.l., Gómez, l., Zuleta, c., Fraile, a., y García-arenal, f. (2011). Estandarización de la técnica de hibridación con sondas de RNA viral marcado con digoxigenina para el diagnóstico de virus de plantas. *Hechos Microbiológicos (1):2 Suplemento 1. Memorias IV Simposio Nacional de Virología*. Pag 56., No.1. 2011.
- Carmona Gutiérrez, S. L., & Betancourt Vásquez, M. (2013). Caracterización molecular de poblaciones de ARN satélites (CMV-RNAsats) del virus del mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus) en diferentes cultivos en Colombia (Doctoral dissertation).
- Chiaki, Y., Fukumoto, T., Nakamura, M., & Iwai, H. (2016). Population genetics analysis of East Asian Passiflora virus on Amami Oshima Island. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 109-120.
- Chingandu, N., Sreenivasan, T. N., Surujdeo-Maharaj, S., Umaharan, P., Gutierrez, O. A., & Brown, J. K. (2017). Molecular characterization of previously elusive badnaviruses associated with symptomatic cacao in the New World. *Archives of Virology*, 1-9.
- Dandlen, S. A. (2016). Aplicações biotecnológicas do supressor de silenciamento de cucumber mosaic virus.
- De La Torre-Almaráz, R., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. A. (2016). First Report of Cucumber mosaic virus (CMV) and CARNA-5 in Carnation in Mexico. *Plant Disease*, 100(7), 1509-1509.
- De Wijs, J. J. (1974). A virus causing ringspot of *Passiflora edulis* in the Ivory Coast. *Annals of applied Biology*, 77(1), 33-40.
- García-Arenal, F. y Palukaitis, P. (1999). Structure and functional relationships of satellite RNAs of Cucumber Mosaic Virus. *Currents Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 39: Satellites and defective virals RNAs. 1999, p. 37-63. P.K. Vogt and A.O. Jackson, eds. Springer-Verlag, Berli
- García-Castro, A., Volder, A., Restrepo-Díaz, H., Starman, T. W., & Lombardini, L. (2017). Evaluation of Different Drought Stress Regimens on Growth, Leaf Gas Exchange Properties, and Carboxylation Activity in Purple Passionflower Plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(1), 57-64.
- González Martín, I. (2016). Localización subcelular e interacciones moleculares de la proteína 2b del virus del mosaico del pepino: su relevancia en la función supresora de silenciamiento génico (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

- Hafner, G. J., Harding, R. M., & Dale, J. L. (1995). Movement and transmission of banana bunchy top virus DNA component one in bananas. *Journal of General Virology*, 76(9), 2279-2285.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M.a., moriones, E. y García-arenal, F. (1992) Epidemic of Cucumber Mosaic Virus Plus Satellite RNA in Tomatoes in Eastern Spain. *Plant Disease*. Vol. 76 No. 4. 1992, p. 363-366.
- Jiang, H., Li, K., Dou, D., & Gai, J. (2017). Characterization of a soybean mosaic virus variant causing different diseases in *Glycine max* and *Nicotiana benthamiana*. *Archives of virology*, 162(2), 549-553.
- Kiranmai, G., Satyanarayana, T., & Sreenivasulu, P. (1998). Clonación molecular y detección del cucumovirus del mosaico del pepino causante de la clorosis infecciosa mediante la utilización de sondas de DNA. *Current Science*, 356(359), 74.
- Ligia, R., Lopez, L., & García, M. (2010). Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus* b.), maracuyá (*Passiflora edulis* s.), guayaba (*Psidium guajava* l.) y papayuela (*Carica cundinam*). *Alimentos hoy*, 19(21), 35-42.
- Maciel, S. D. C., Nakano, D. H., Rezende, J. A. M., & Vieira, M. L. C. (2009). Screening of *Passiflora* species for reaction to Cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. *Scientia Agricola*, 66(3), 414-418.
- Rodríguez, M. H., Niño, N. E., Cutler, J., Langer, J., Casierra-Posada, F., Miranda, D., ... & Büttner, C. (2016). Certificación de material vegetal sano en Colombia: Un análisis crítico de oportunidades y retos para controlar enfermedades ocasionadas por virus. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(1), 164-175.
- Roossinck, M. (2002). Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of Virology*. Vol.76, No.7. 2002, p. 3382-3387
- Seung-Kook, C., Yong-Woon, J., Ju-Yeon, Y., y Jang-Kyung, C. (2011). Characterisation of a satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus that Induces Chlorosis in *Capsicum annuum*. *Virus Genes*. No 43. 2011, p. 111-119
- Seung-Kook, C., Yong-Woon, J., Ju-Yeon, Y., y Jang-Kyung, C. (2011). Characterisation of a satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus that Induces Chlorosis in *Capsicum annuum*. *Virus Genes*. No 43. 2011, p. 111-119
- Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Industrial Crops and Products*, 87, 161-176.
- Taborda, Natalia. (2013). Fruto de la pasión, Maracuyá. Instituto Superior Particular Incorporado N° 4044 "SOL" Técnico Superior en Gestión Gastronómica, Seminario de Investigación
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739
- Thompson, J. R., & García-Arenal, F. (1998) The bundle sheath-phloem interface of *Cucumis sativus* is a boundary to systemic infection by tomato aspermy virus. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 11: 109 – 114
- Wylie, S. J., & Jones, M. G. (2011). The complete genome sequence of a Passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of virology*, 156(3), 479-482.
- Yeturu, S., Méndez, K., Garrido, P., Serrano, S., & Garrido, A. (2016). serological and molecular identification of cucumber mosaic virus (CMV) infecting banana crops in Ecuador. *Ecuador es Calidad-Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1).
- Yockteng, R., d'Eeckenbrugge, G. C., & Souza-Chies, T. T. (2011). *Passiflora*. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 129-171). Springer Berlin Heidelberg.