

# Diagnóstico de enfermedades virales en cultivos tropicales: Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), Palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

Francisco J. Morales, Ivan Lozano, Ana K. Martínez, Cristian Olaya, Mauricio Castaño, Natalia Villareal, Maritza Cuervo, Lee Calvert y José Arroyave.



SEMINARIO INTERNACIONAL PARA TERCEROS PAISES  
“CARACTERIZACIÓN, DIAGNÓSTICO, EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO  
DE ENFERMEDADES VIRALES Y MOLLICUTES EN PLANTAS”

1 al 5 de noviembre de 2010, Córdoba, Argentina



# Contexto General

- CIAT en el trópico



- CIAT en la región

Mora



Papaya



Musáceas



Lulo



Caña de azúcar



Maíz



Cítricos



Tomate



- Caso 1: Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)
- Caso 2: Caracterización y diagnóstico molecular del AOPRV en Palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.)
- Caso 3: Caracterización y diagnóstico del virus asociado con la enfermedad del cuero de sapo de la yuca (CFSD)

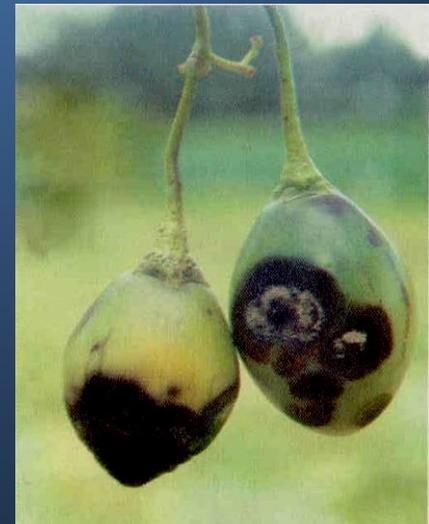
# Caso 1: Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)

## En el Mundo:

- Distribución Mundial: Nativo de los Andes, Perú, Chile, Ecuador, Bolivia, Colombia, Argentina, Brasil. Cultivado en Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico y Haití. Introducido en África oriental, Asia y la india oriental. Crece también en Australia, Nueva Zelanda y Nueva Guinea.

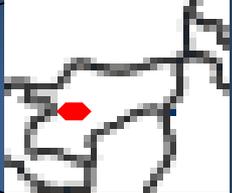
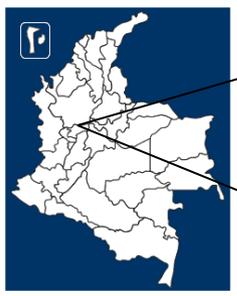
## En Colombia:

- Área sembrada c. 8000 ha
- Producción de 118.226 t. (Minagricultura, 2006),
- Enfermedades: Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y virus
- El problema de consulta:  
“Disturbio ocasionando pérdidas entre 50 y 80% del área plantada”



# Aranzazu-Caldas

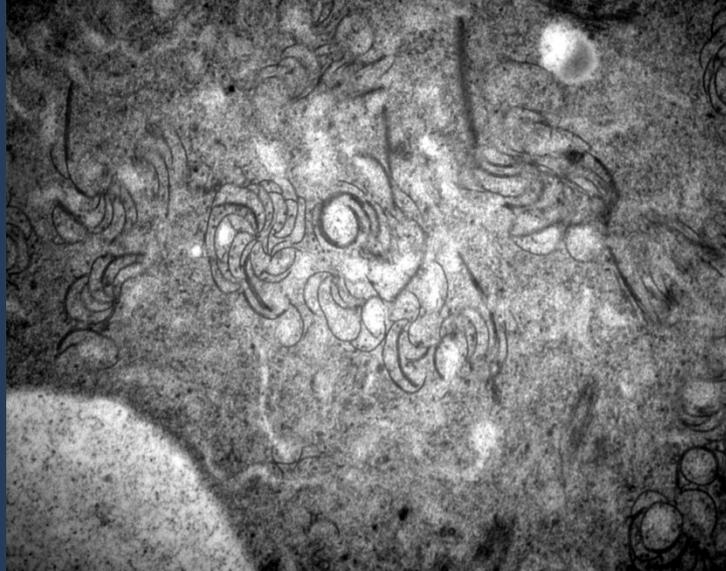
Desde 1990



Tinción  
Negativa



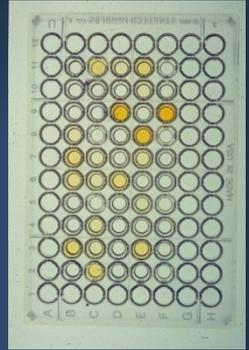
Citopatología



# Detección

## PTA-ELISA

Anticuerpo monoclonal específico para potyvirus (PTY 1 AGDIA)

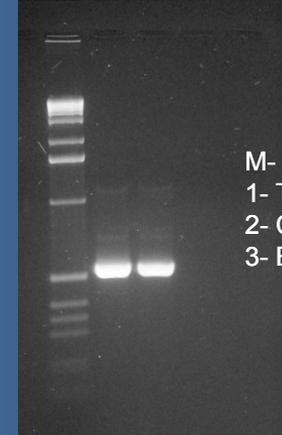


Control positivo tejido infectado con BCMV

Control negativo tejido sano

## RT-PCR

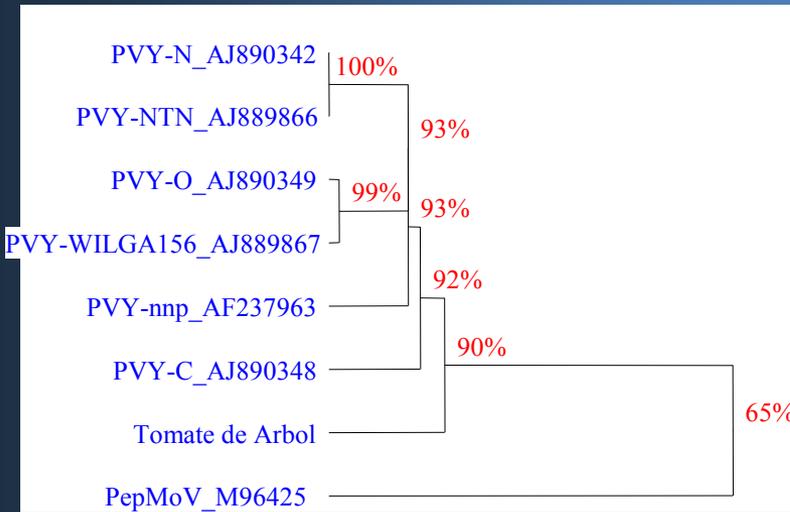
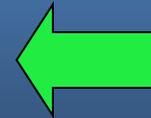
Gel de agarosa  
M 1 2 3



M- Marcador 1 Kb  
1- Tomate de árbol  
2- Control positivo  
3- Blanco de reacción

Caracterización molecular parcial:

Potyvirus: cepa del *Potato virus Y* (PVY)



Arbol de homología DNAMAN 4.13

primer degenerado U341, 5'- ATG RTI TGG TGY ATI GAI AAY GG - 3' (Langeveld et al., 1991) y el primer Oligo (dT) (Promega, WI) amplifican parte de la proteína de la cápside y la región no traducida (3'-RNT)

- La caracterización parcial de la raza del PVY asociado a la virosis del tomate de árbol en Colombia ha contribuido con el desarrollo de nuevos proyectos de investigación en diferentes instituciones nacionales.
- Búsqueda de resistencia
- Otros virus presentes
- Determinación de infecciones mixtas

# Caso 2: Caracterización y diagnóstico molecular del AOPRSV en Palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.)

- Malasia e Indonesia son los principales productores mundiales
- Colombia es líder en Latinoamérica con 170.000 ha. Ecuador (130.000) Brazil (56.000) Costa Rica (52.000), Venezuela, Surinam, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua.
- Provee cerca del 30% de aceite vegetal
- Fuente de biocombustibles.



# Enfermedades virales de la palma africana

- Solo se reconocen dos enfermedades virales de la palma de aceite en el mundo
- La 'mancha anular' fue la primera enfermedad viral reconocida en Perú, en 1969. Esta es una enfermedad letal de palmas jóvenes.
- El 'anillo clorótico' se observó por primera vez en Ecuador, en 1995. Esta enfermedad no es letal para la palma de aceite, pero las plantas sintomáticas se eliminan de todas formas.

# “La Mancha Anular”

- Esta enfermedad apareció por primera vez en 1969, en la provincia de Tocache, departamento de San Martín, Perú.



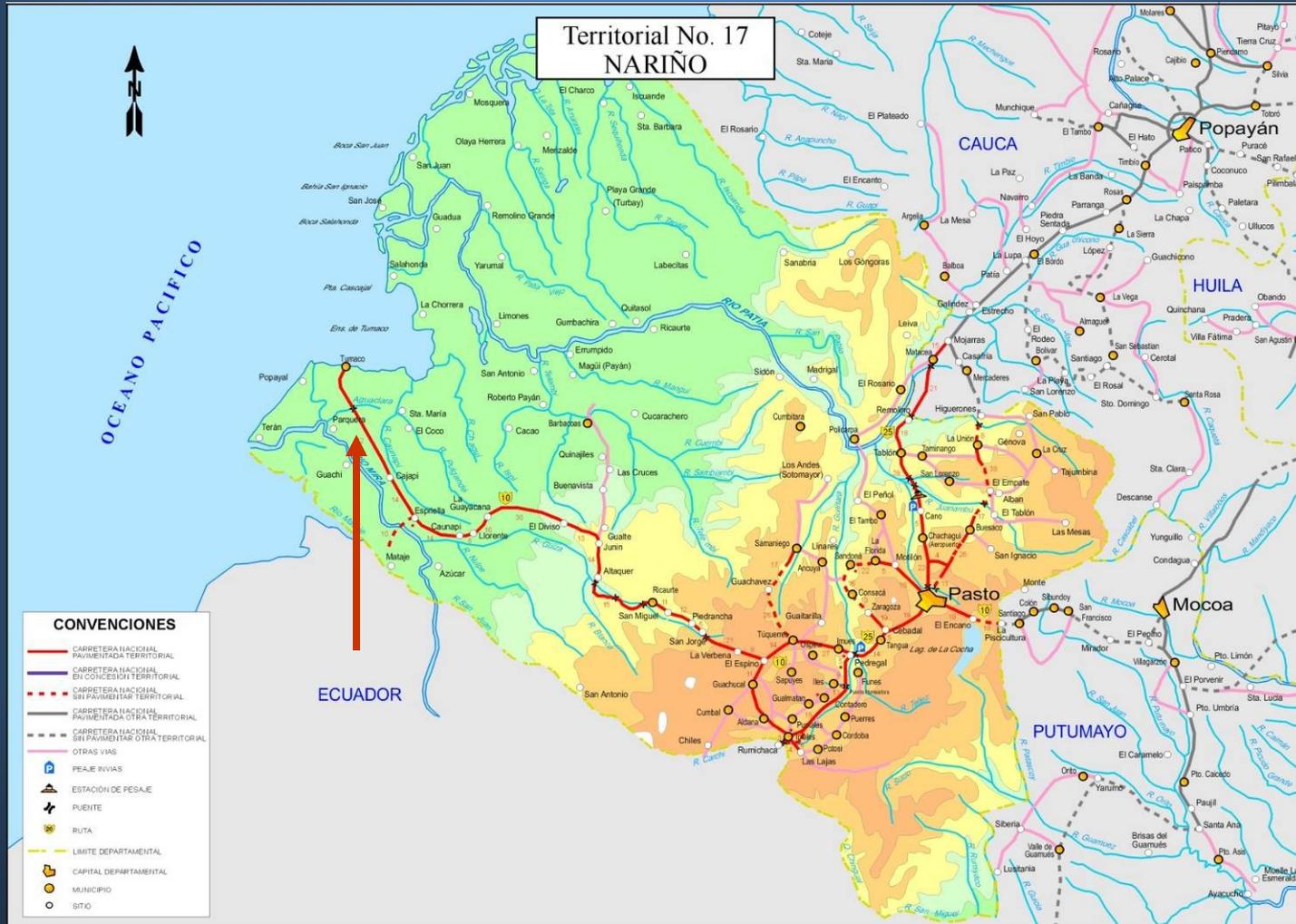
Departamento de San Martín

En 1975, la ‘mancha anular’ apareció en el Ecuador, cantón Santo Domingo de los Colorados, donde se la llamó “amarillamiento letal” o “moteado de las hojas del cogollo”.



Mapa de Ecuador

# En 1985, 'La mancha anular fue observada e el municipio de Tumaco, Nariño, Colombia



# Sintomatología

Palmas jóvenes



# Sintomatología



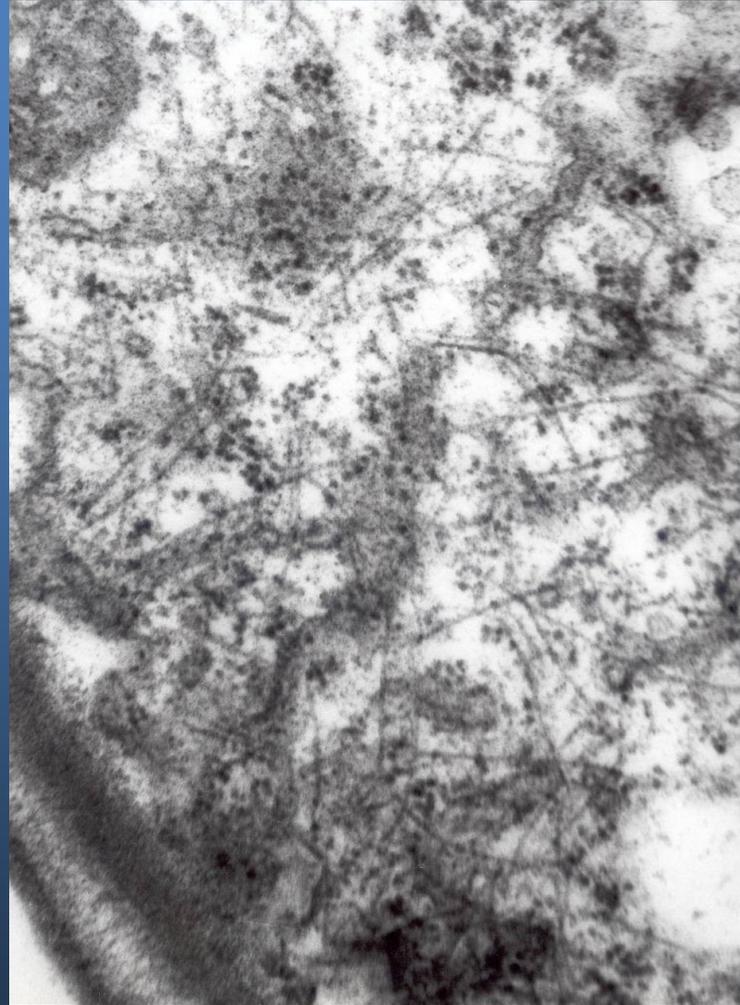
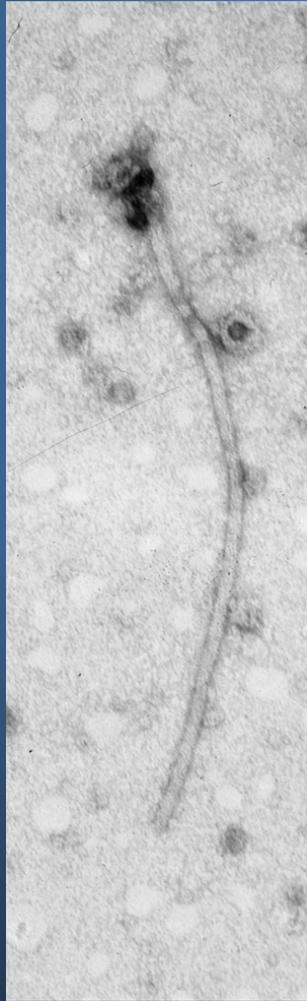
# Pudrición Hoja Flecha



# Síntomas en el estipe



# Microscopía Electrónica

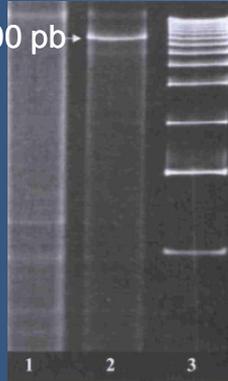


# Clonación y caracterización del *Virus de la mancha anular de la palma de aceite* en Colombia



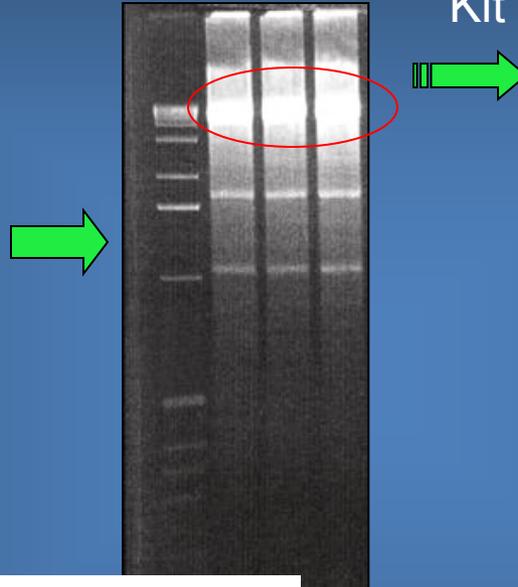
8000 A 9000 pb

ARN cd



dc ARN en Gel de agarosa  
bajo punto de fusión

Rneasy  
Kit

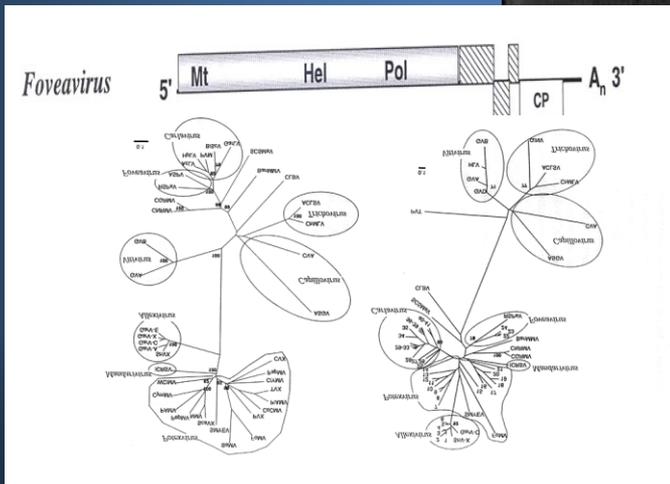


Síntesis de cDNA

Clonacion

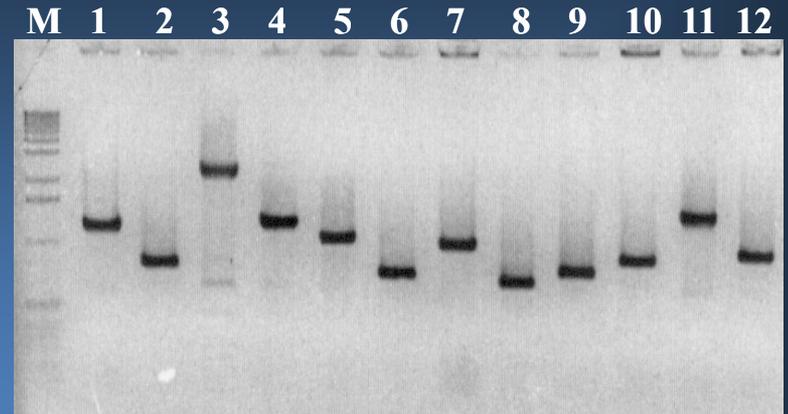
Secuenciacion

Flexiviridae



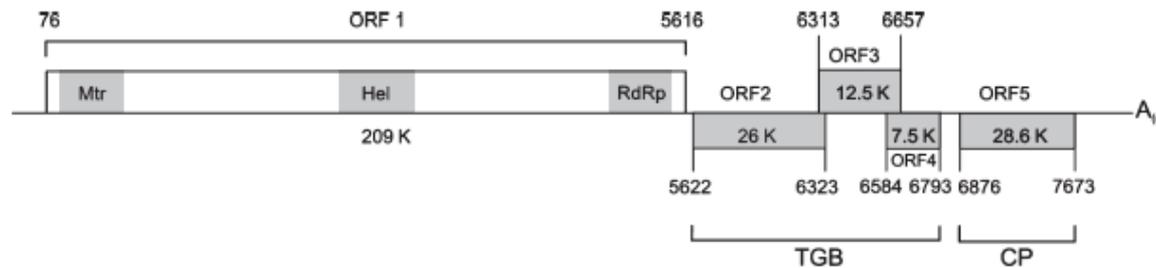
## Clonación

## Síntesis de cDNA

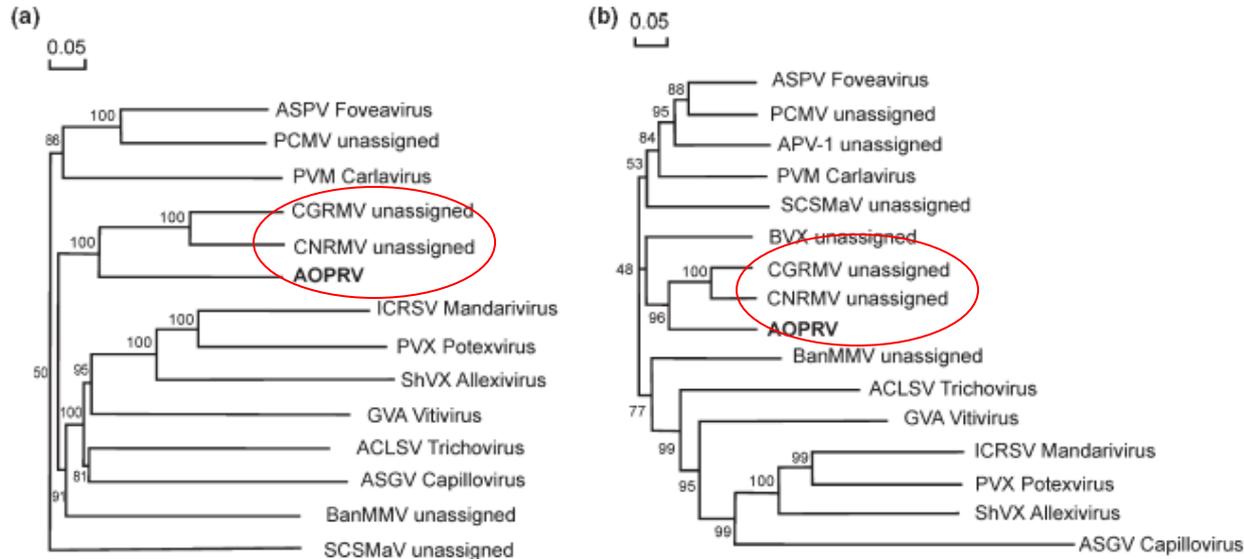


## Secuenciación

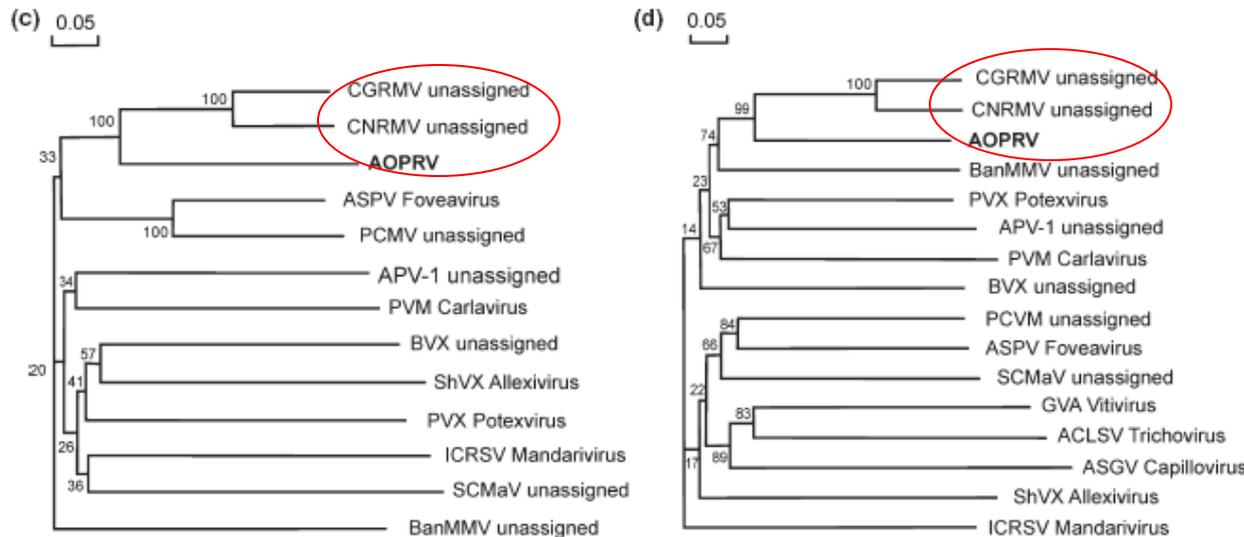
Genoma de 7759 pb, 5 ORF



RdRp



Proteínas asociadas a la replicación



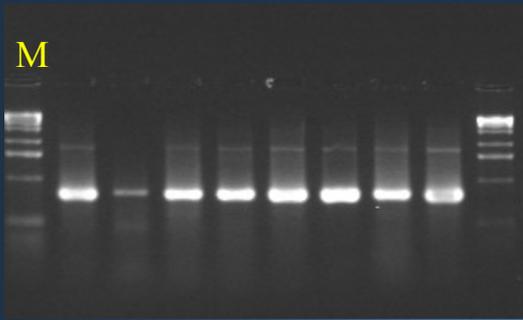
TGBp1

CP

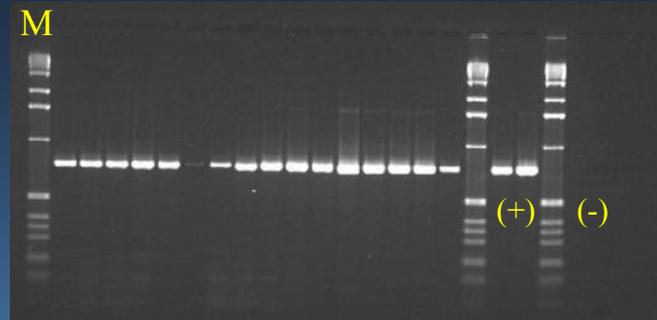
Arboles filogenéticos de AOPRV en relación con especies de la familia Flexiviridae (Betaflexiviridae). Basados el la identidad de aa de las proteínas codificadas por los ORF

# RT-PCR detección de AOPRV.

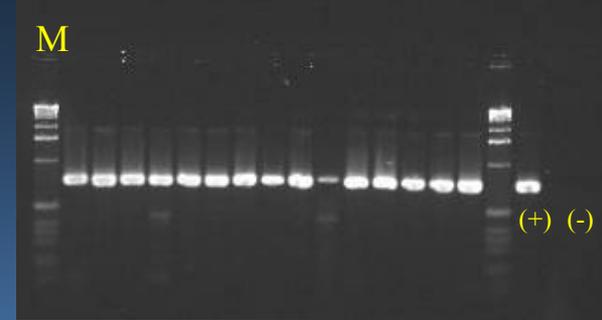
- Los iniciadores para fueron diseñados para amplificar una región de 875 pb de la region dependiente de la ARN polimerasa encontrada en el marco abierto de lectura 1 de AOPRV.
- Los ensayos RT-PCR se desarrollaron con ARN total extraído de hojas con síntomas usando el kit “ SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA)”.
- La síntesis de la primera cadena de cDNA se lleva acabo usando el iniciador forward FW165 5' CCTTTGACTCTAGCCAAGA 3', y el iniciador reverse Rev936 5' GCAAATGAAACTCTTCCC 3'.
- Los productos de PCR se secuenciaron directamente.



Consecutivo 01246



Consecutivo 01252



Consecutivo 01254

Sequences producing significant alignments:

- [gb|AAL68924.1](#) replicase [African oil palm ringspot virus]
- [ref|NP\\_047278.1](#) RNA-dependent RNA polymerase [Cherry green r...]
- [emb|CAG18739.1](#) putative RNA polymerase RNA dependant [Cherry...]
- [ref|NP\\_059937.1](#) replicase [cherry necrotic rusty mottle viru...]

Score (Bits)	E Value
526	8e-148
235	3e-60
233	1e-59
228	4e-58

M = Marcador de peso molecular  
 (+) = Control Positivo (AOPRV)  
 (-) = Control de palma sana

[gb|AAL68924.1](#) replicase [African oil palm ringspot virus]

Length=1128

Score = 526 bits (1354), Expect = 8e-148

Identities = 266/266 (100%), Positives = 266/266 (100%), Gaps = 0/266 (0%)

Frame = -2

Query 799 NGCVIRAI AEFLNQKPAKVLSVISKECSKELVEDIMSG LGVQPVHLKELFSFFDIAAEVR 620

NGCVIRAI AEFLNQKPAKVLSVISKECSKELVEDIMSG LGVQPVHLKELFSFFDIAAEVR

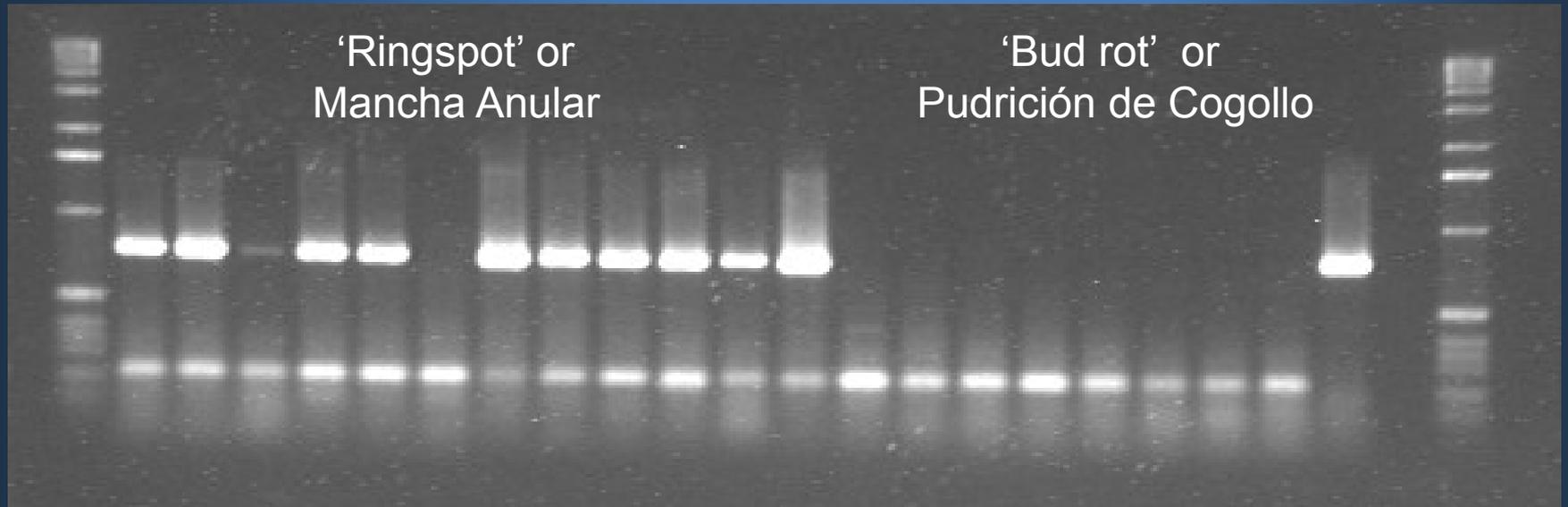
Sbjct 863 NGCVIRAI AEFLNQKPAKVLSVISKECSKELVEDIMSG LGVQPVHLKELFSFFDIAAEVR 922

Query 619 ENGNSRLINAKGSR SATFQISDDHMTFLCSGRSSACGSLSLQPRIVSMGPEADYESFTKE 440

ENGNSRLINAKGSR SATFQISDDHMTFLCSGRSSACGSLSLQPRIVSMGPEADYESFTKE

Sbjct 923 ENGNSRLINAKGSR SATFQISDDHMTFLCSGRSSACGSLSLQPRIVSMGPEADYESFTKE 982

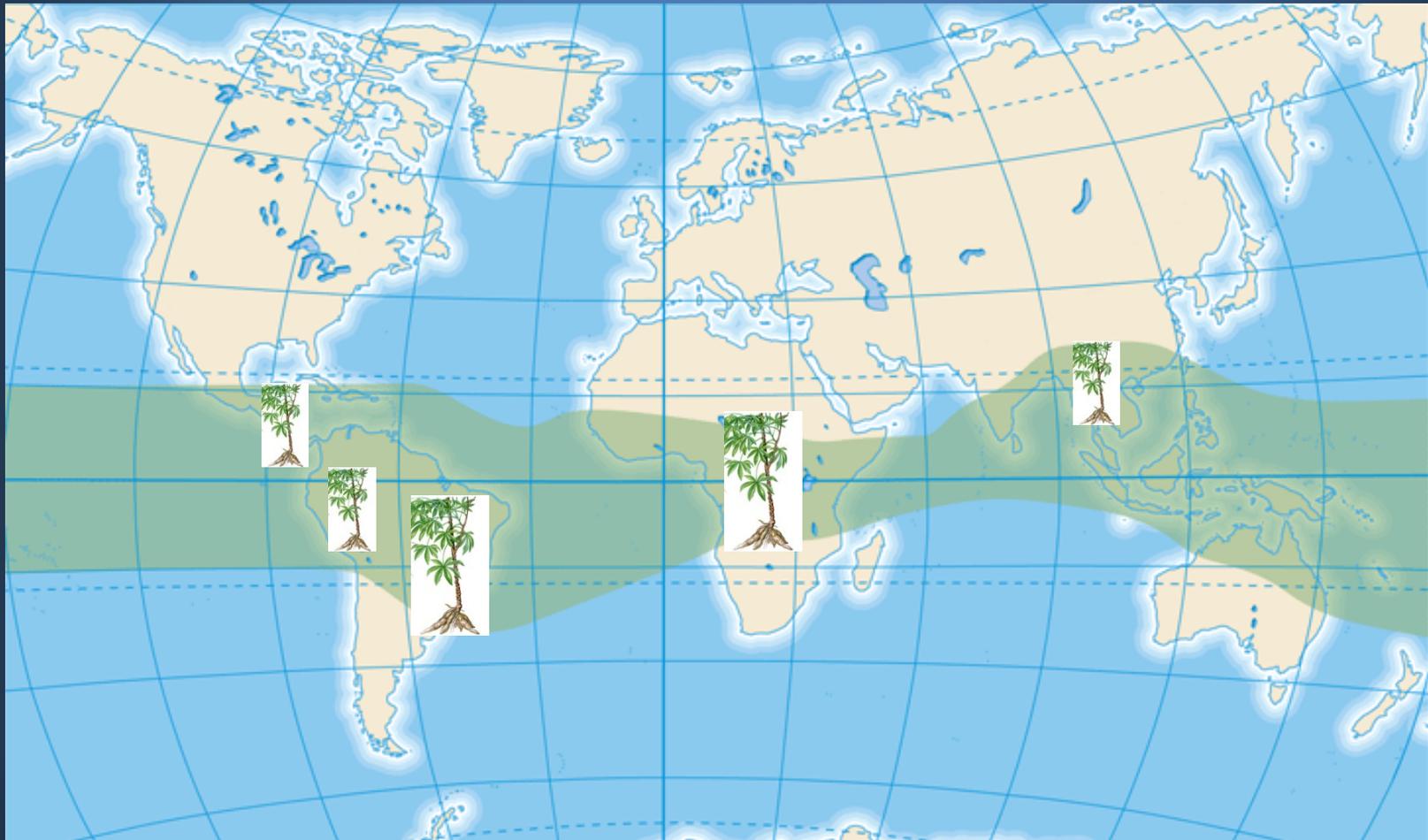
# Mancha anular es diferente a la pudrición de cogollo



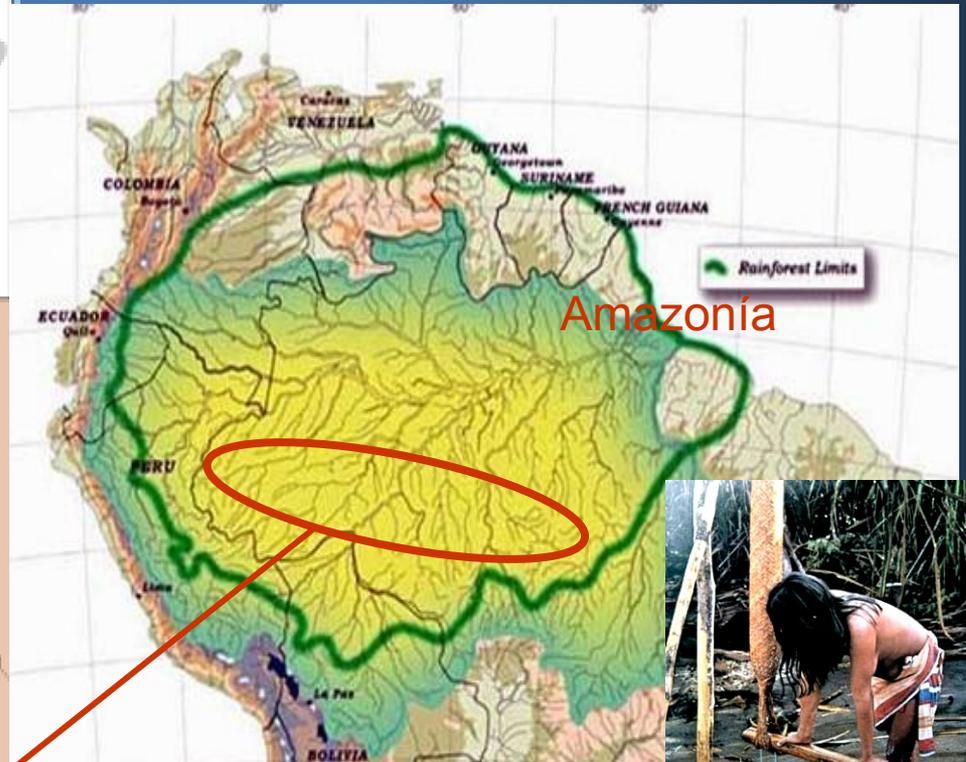
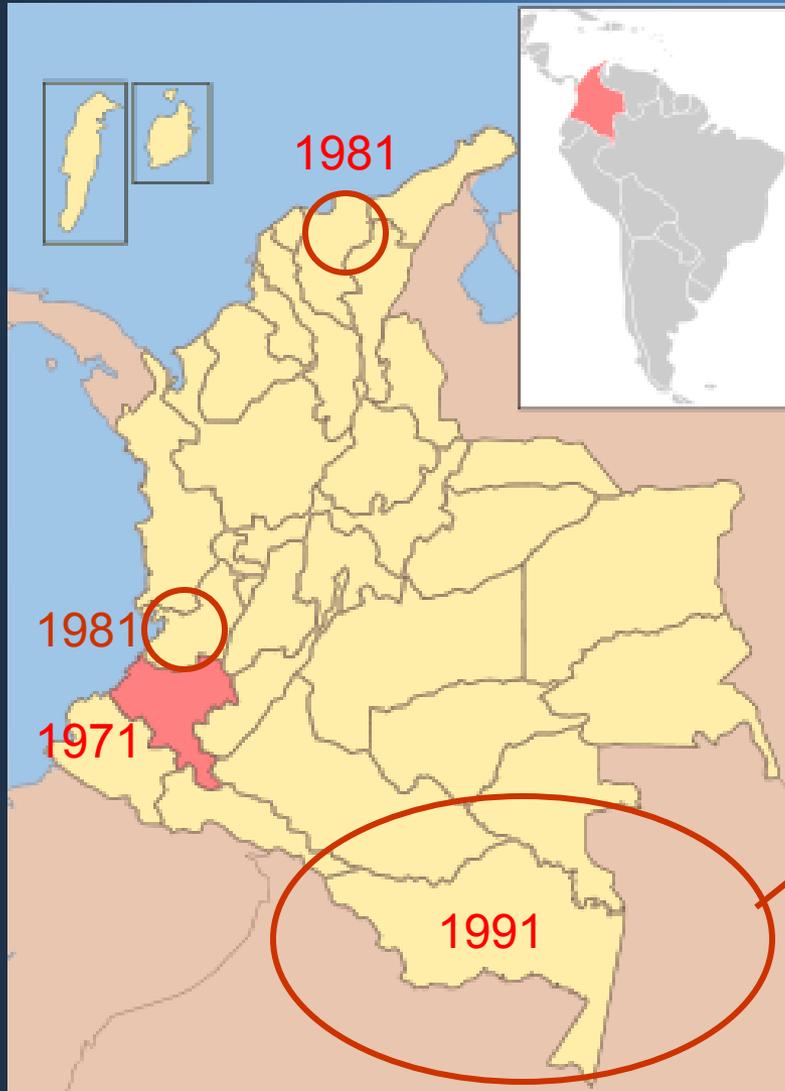
## *¿Cómo se transmite ?*

- Estos virus infectan frutales de clima templado, casi exclusivamente a través de injertos y tal vez podas.
- No se conocen vectores biológicos
- No se hacen podas ni injertos en palmas jóvenes

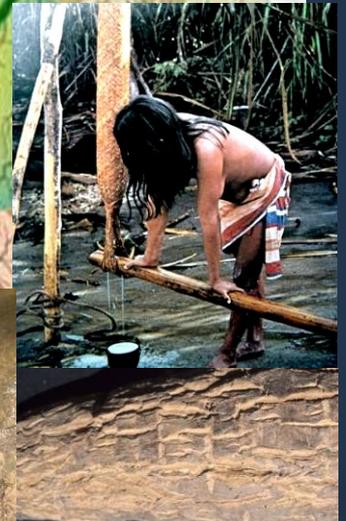
# Caso 3: Caracterización y diagnóstico del virus asociado con la enfermedad del cuero de sapo de la yuca (CFSD)



# Primeros informes sobre el 'Cuero de Sapo' de la yuca



Jacaré



# Distribución geográfica actual del Cuero de Sapo de la yuca



# El 'Cuero de Sapo' de la Yuca



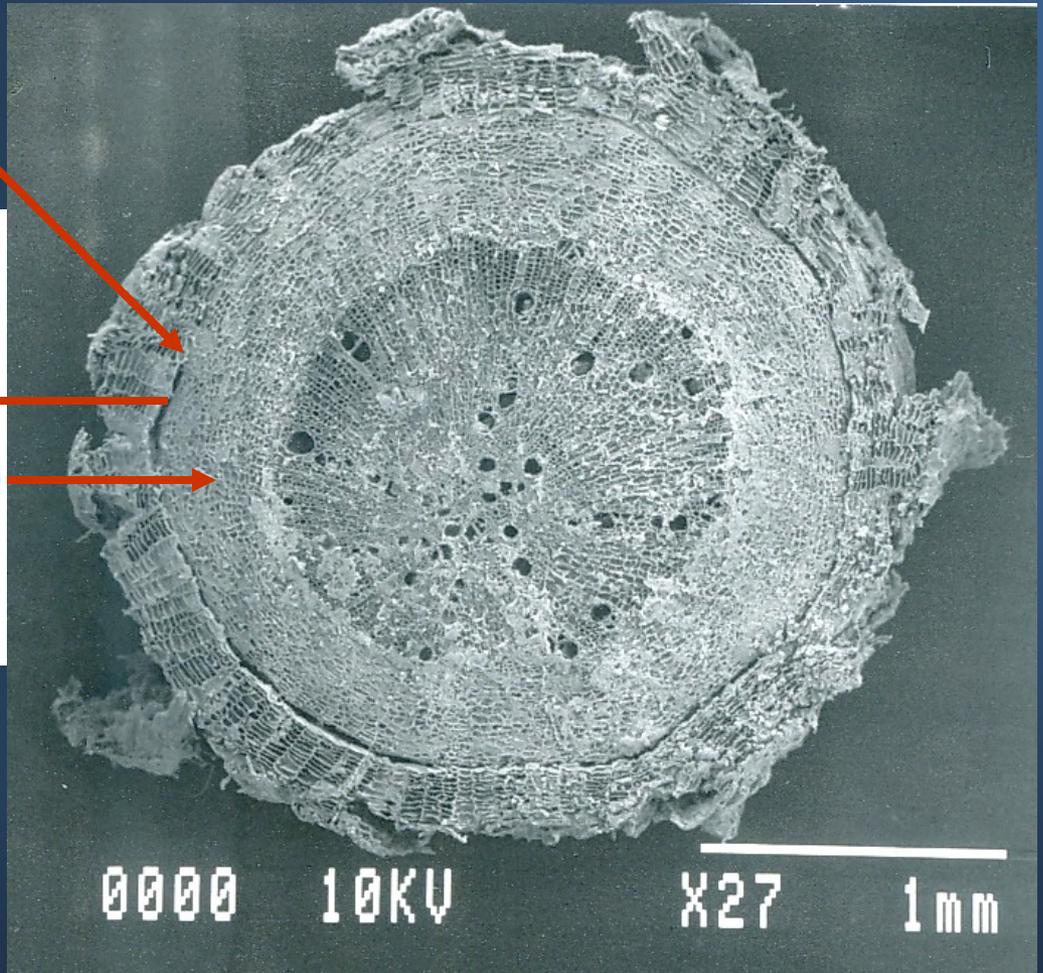
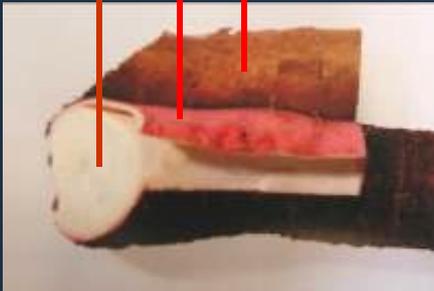
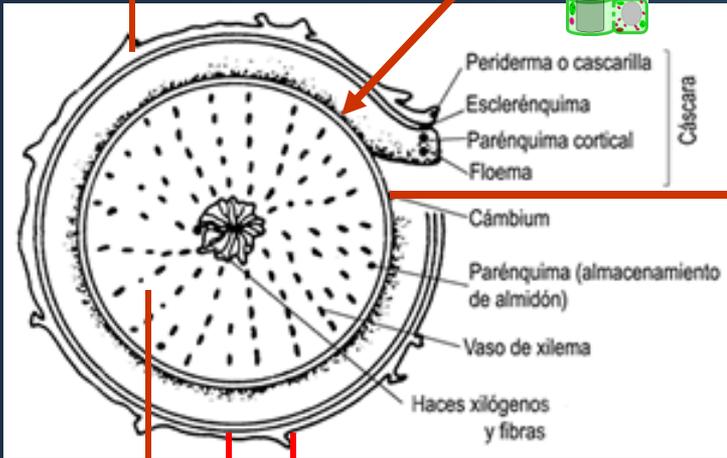
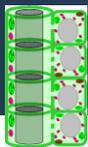
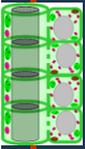
ESCALA DE DAÑO



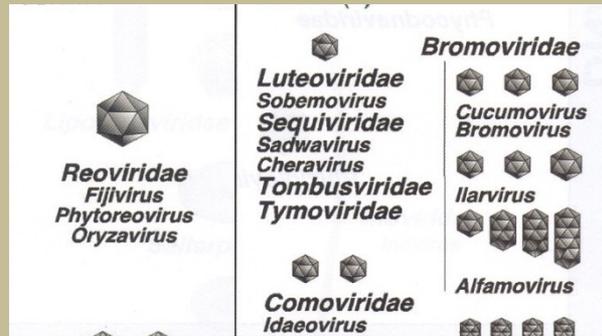
# Raíz reservante de yuca afectada por 'Cuero de Sapo'



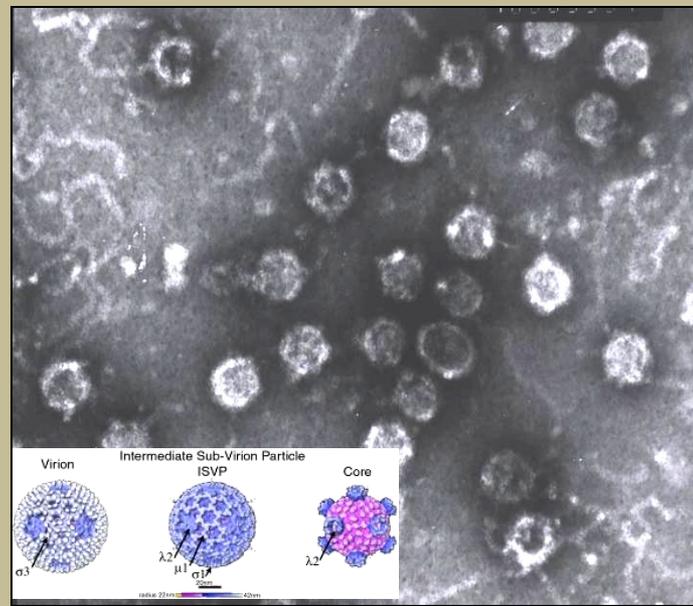
$(C_6H_{10}O_5)_n$



# Microscopia Electrónica

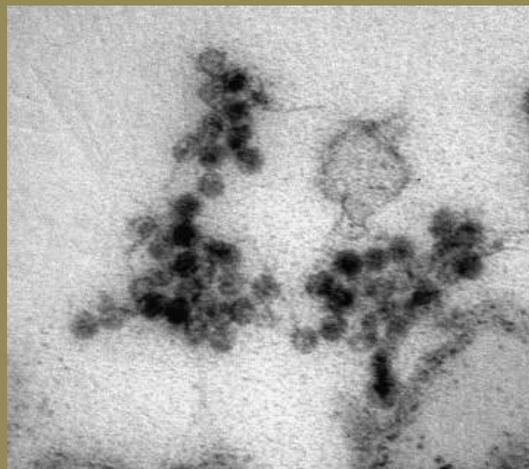
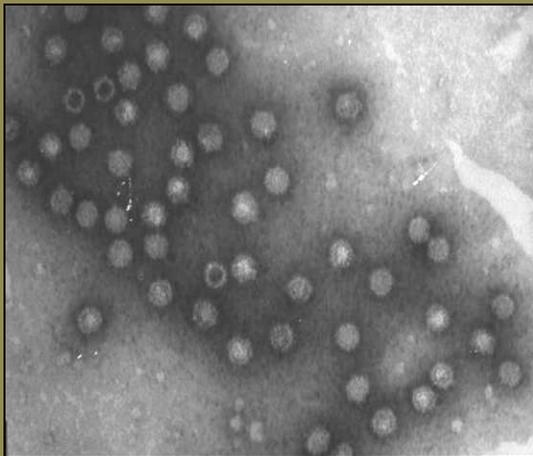
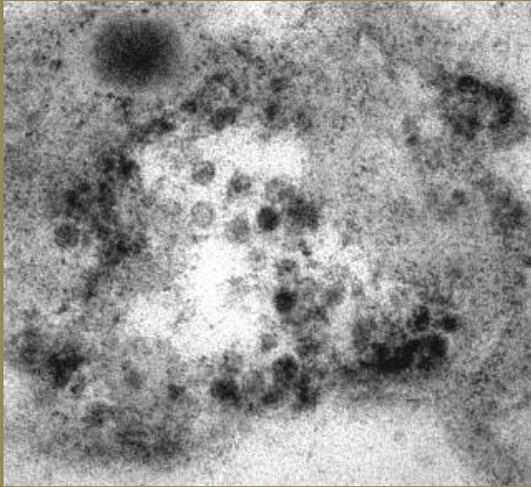


Partículas observadas en corte de tejido foliar



Partículas observadas durante el proceso de purificación

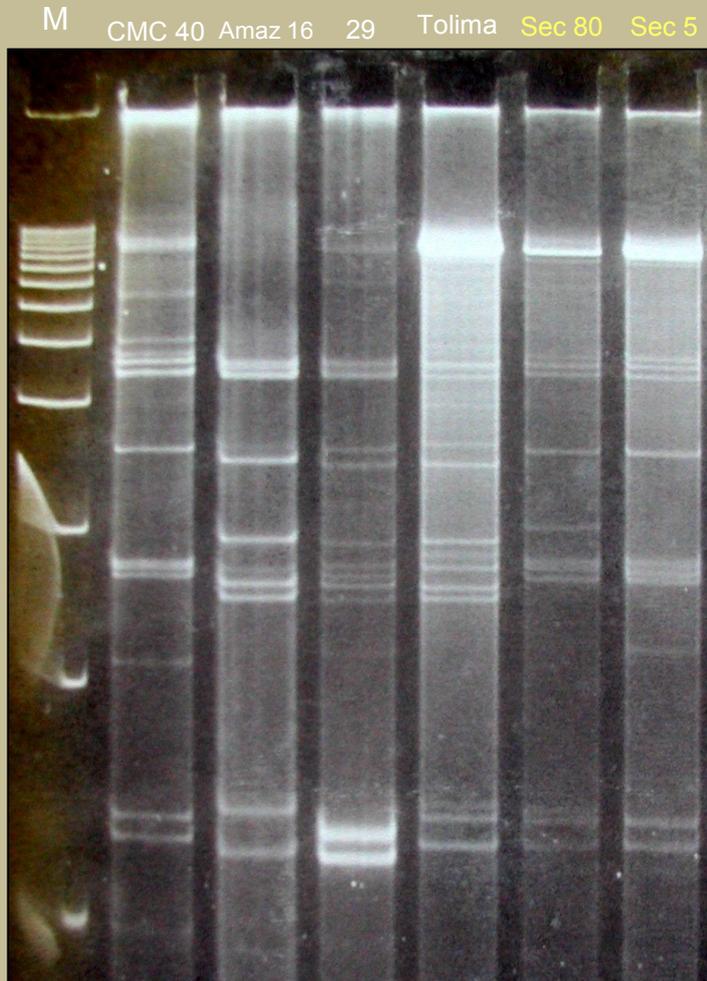
# Partículas del VCSY en tejido de yuca afectado por 'Cuero de Sapo'



# Detección de ácidos ribonucleicos\* de doble cadena (ARN-dc) asociados a enfermedades virales en yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

Maritza Cuervo, Barry Nolt, Benjamín Pineda, Ana Cecilia Velasco, 1989

## Aislamientos VCSY



Componente	Reovirus vegetales (pb)	ARNcd CSY (pb)
S1	3849	4000
S2	3810	3700
S3	3669	3900
S4	3823	2600
S5	2682	1800
S6	2157	1750
S7	1938	1700
S8	1814	1100
S9	1132	1000
S10	1162	

# Aislamiento y caracterización de ARN viral a partir de **ARN total** extraído de plantas de yuca afectadas por **Cuero de Sapo**

Clón CFSV-S5-351

351 nucleótidos

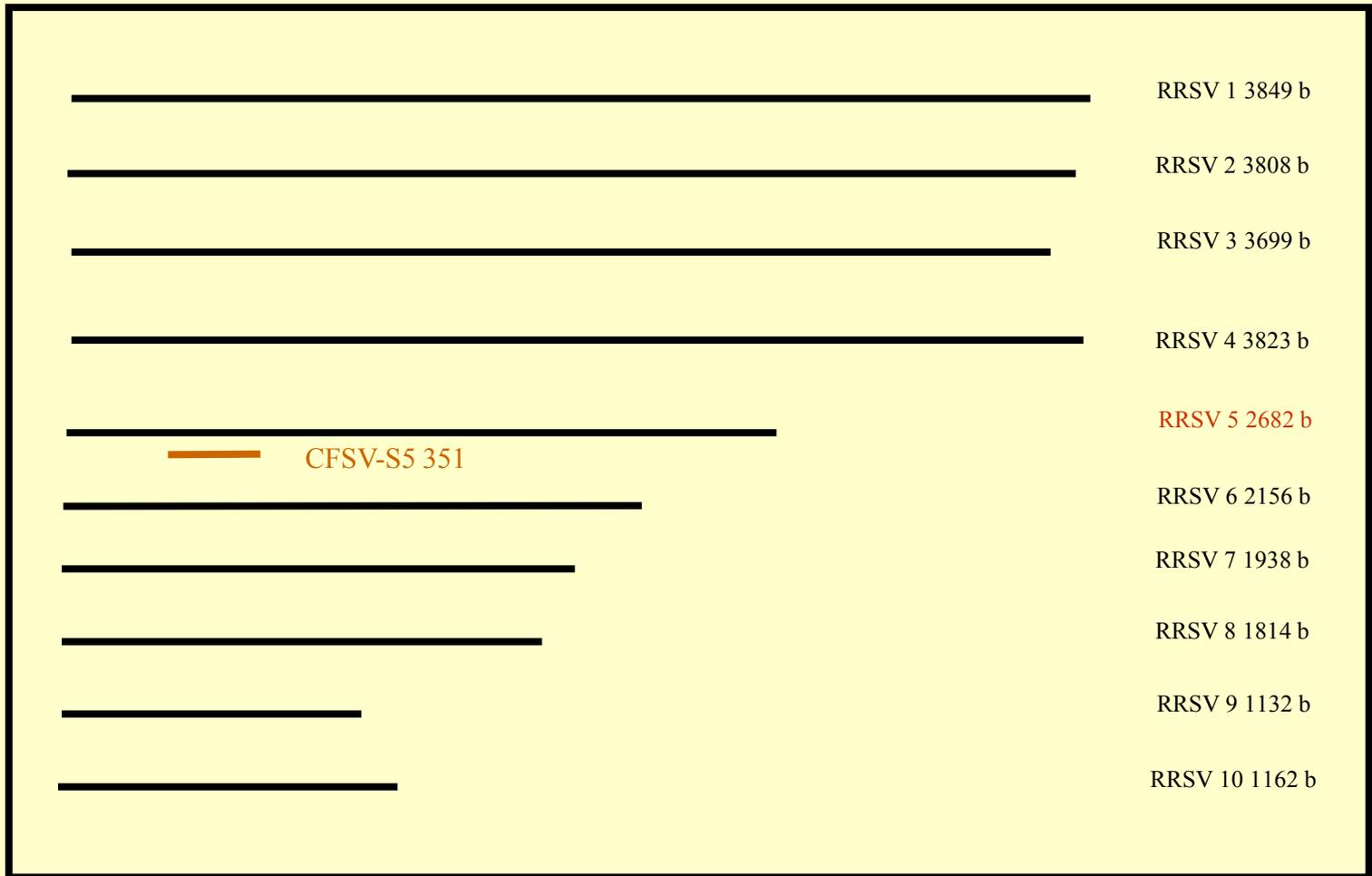
Similitud del 54% con la proteína P5 del

*Rice ragged stunt virus*



```
>ref|NP_620529.1| minor structural protein [Rice ragged stunt virus]
gb|AAB49578.1| minor structural protein
Length=808
GENE ID: 991201 RRSVs5gp1 | minor structural protein [Rice ragged stunt virus]
(10 or fewer PubMed links)
Score = 87.4 bits (215), Expect = 3e-16
Identities = 40/94 (42%), Positives = 59/94 (62%), Gaps = 0/94 (0%)
Frame = +1
Query 25
GMVCDLPFRFKNHVINYKKSSLKQMIGSDQAVFLPGGLMHYTRGGVVICLEVYVYKNALI 204
          G   LP R+K HVIN++K  + Q  +   +LPGGL+H T GG+VICL +
++++ +I
Sbjct 450
GKEVGLPLRYKQHVINFRKREMHQKNSNIMTGYLPGLLHDTLGGIVICLRLDIFEDTVI 509

Query 205  ATYGVWVPYKLDRLIVMICENGNANIVSRPYLLF 306
          + YG++  KL RLI MIC      NI  RPY ++
Sbjct 510  SVYGIYNGMKLIRLICMICVYSGINIPGRPYFVY 543
```

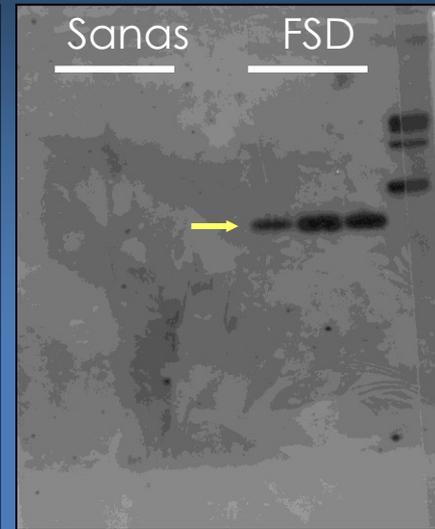
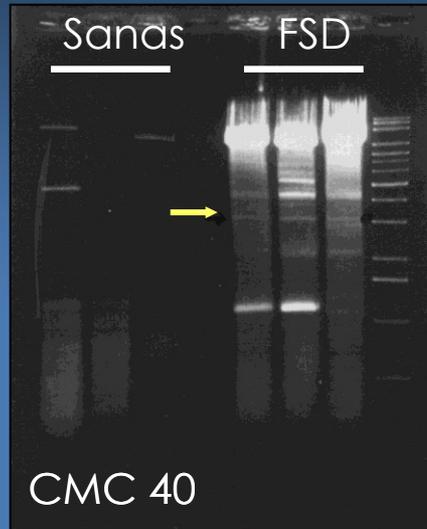


Posición del clón CFSV-S5-351 del Virus del cuero de sapo de la yuca en relación al genoma del reovirus *Rice ragged stunt virus*

# Patrones electroforéticos de los ARN-cd en yuca e hibridación con el clón VCSY-S5



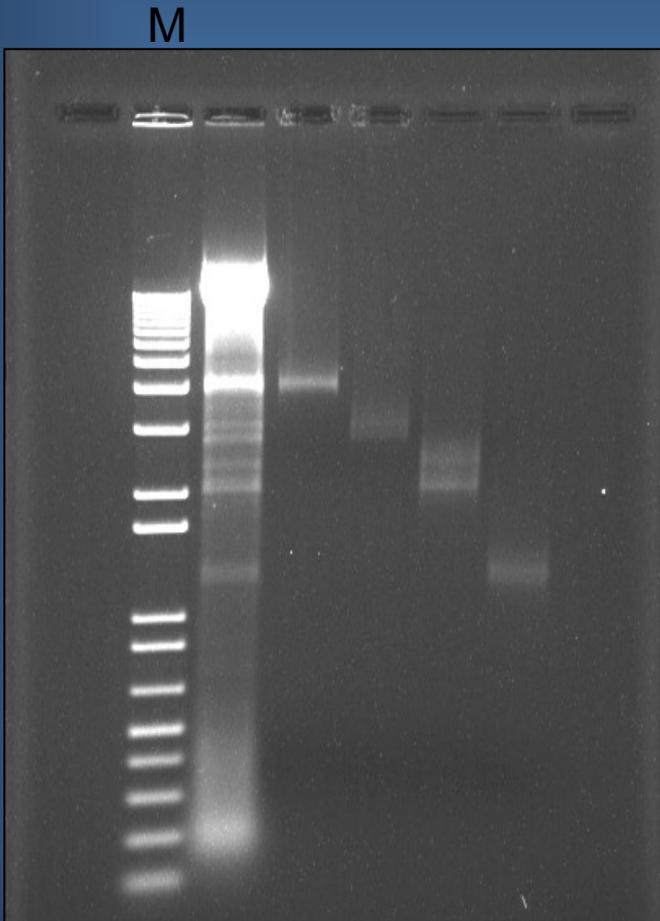
CMC40 FSD



SECUNDINA FSD



# Clonación directa de los ARNdc del Virus del cuero de sapo de la yuca



Clon FSD – **S1**, 683 nt

Clon FSD – **S2**, 434 nt

Clon FSD - **S3**, 900 nt

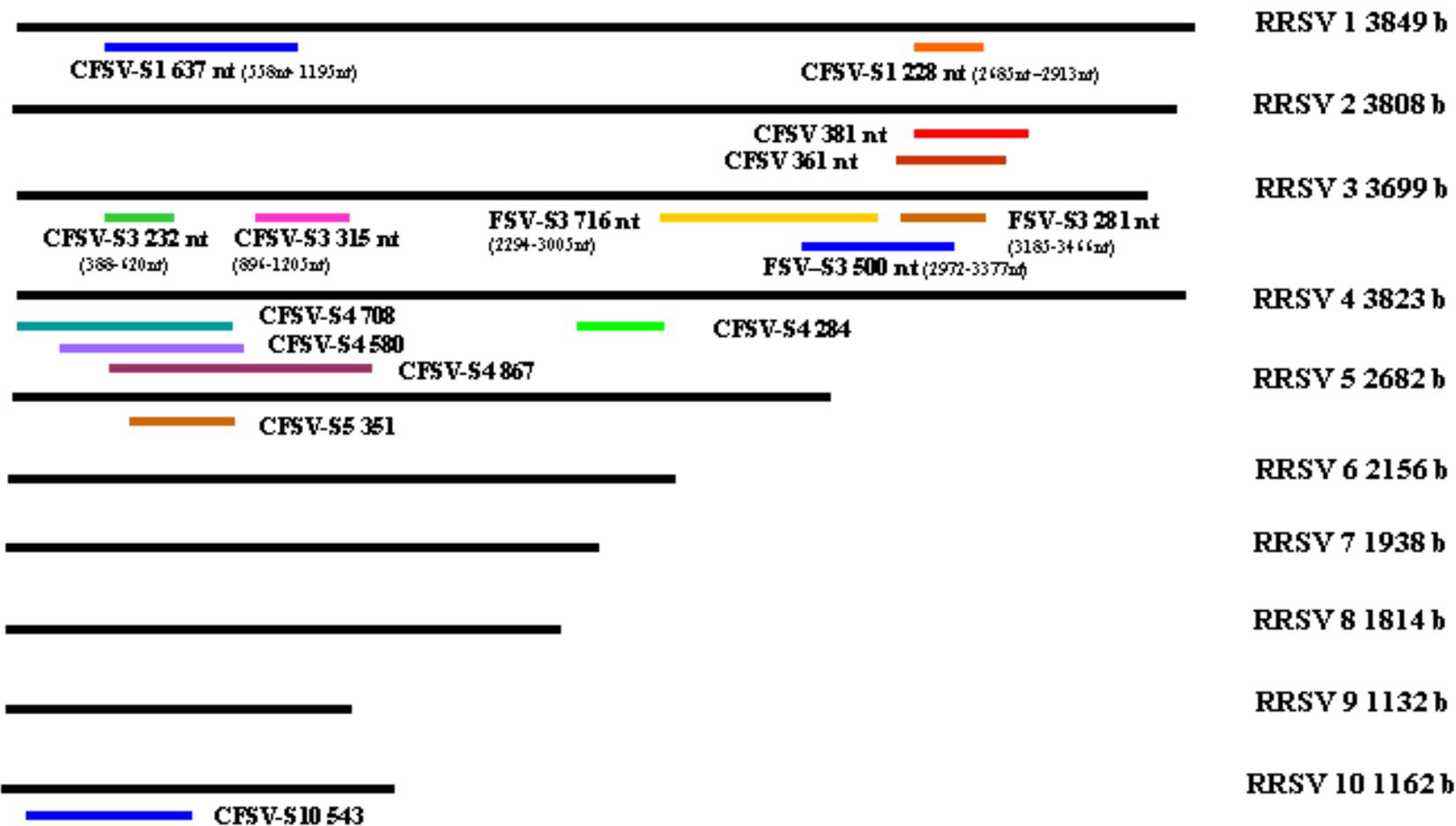
Clon FSD - S3, 400 nt

Clon FSD - **S4**, 580 nt

Clon FSD - S4, 867 nt

Clon FSD - S4, 400 nt

Clon FSD - **S10**, 640 nt



Homología del genoma parcial del Virus del cuero de sapo de la yuca en relación al genoma del reovirus *Rice ragged stunt virus*

# CÓDIGO DEL CLON

**CFSV-S1-228**



**CFSV-S3-400**



**CFSV-S3-700**



**CFSV-S4-580**

387b compartidas

**CFSV-S4-867**



**CFSV-S4-400**



PCR: 957b

**CFSV-S5-351**



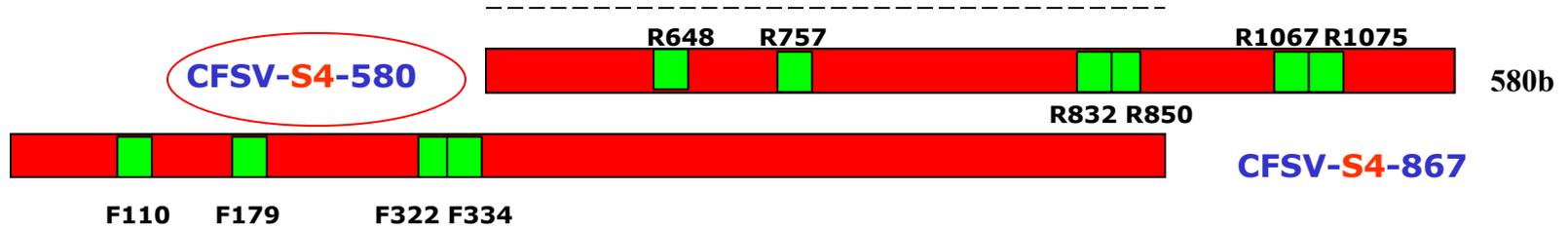
PCR: 257b

**CFSV-S10-228**



 **Primers diseñados**

387 b compartidas



<b>Comb. 1</b>	<b>F334</b>	-----	<b>R1067</b>	<b>PCR: 734</b>
<b>Comb. 2</b>	<b>F179</b>	-----	<b>R1067</b>	<b>PCR: 889</b>
<b>Comb. 3</b>	<b>F334</b>	-----	<b>R1075</b>	<b>PCR: 754</b>
<b>Comb. 4</b>	<b>F322</b>	-----	<b>R1075</b>	<b>PCR: 754</b>
<b>Comb. 5</b>	<b>F334</b>	-----	<b>R832</b>	<b>PCR: 499b</b>
<b>Comb. 6</b>	<b>F322</b>	-----	<b>R832</b>	<b>PCR: 511b</b>
<b>Comb. 7</b>	<b>F334</b>	-----	<b>R757</b>	<b>PCR: 424b</b>
<b>Comb. 8</b>	<b>F179</b>	-----	<b>R648</b>	<b>PCR: 470b</b>
<b>Comb. 9</b>	<b>F334</b>	-----	<b>R850</b>	<b>PCR: 517b</b>
<b>Comb. 10</b>	<b>F110</b>	-----	<b>R1067</b>	<b>PCR: 958b</b>

387 b compartidas

CFSV-S4-580

R1067

CFSV-S4-867

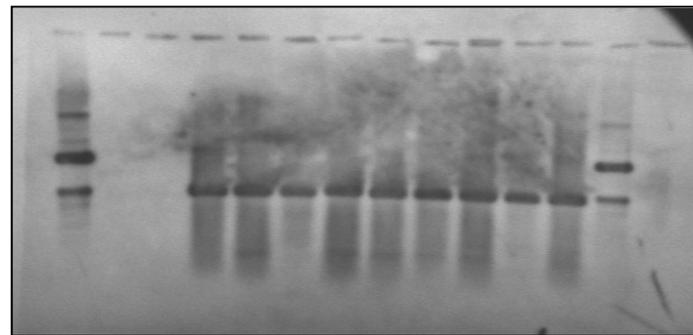
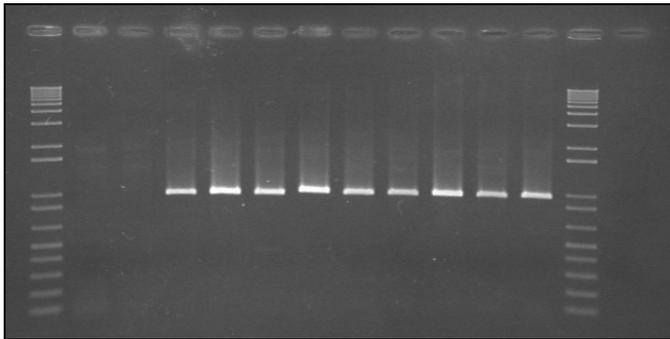
Comb. 10

F110

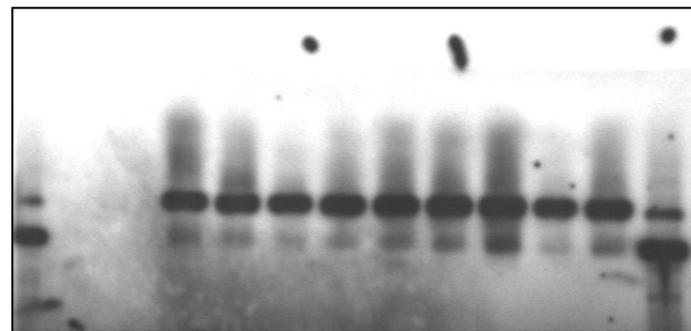
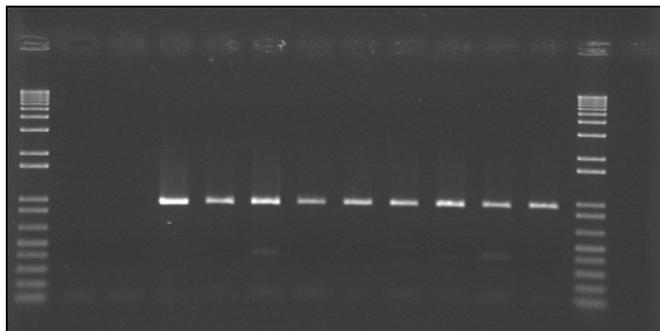
F110

R1067

PCR: 958b

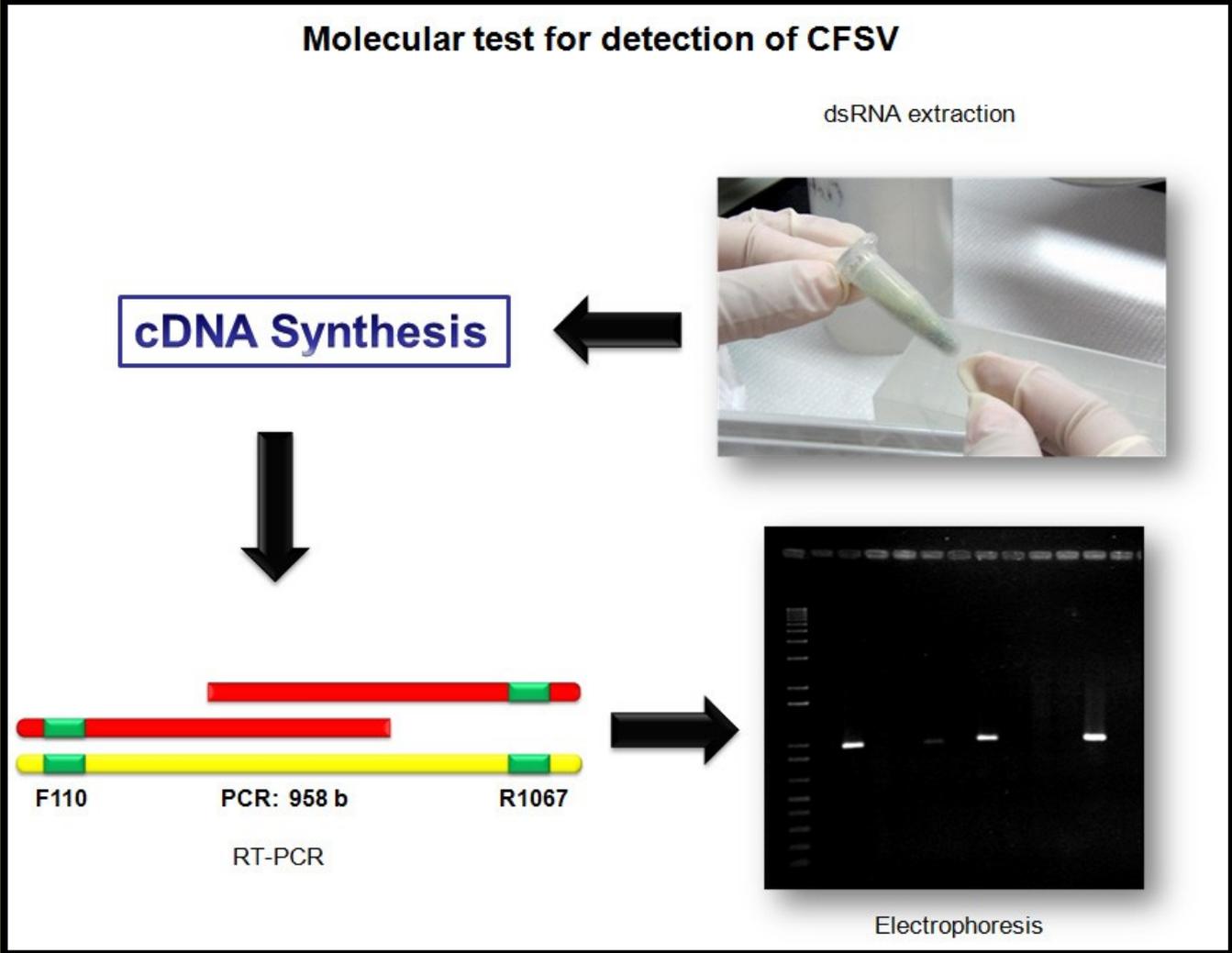


RT-PCR clón CFSV-S4 Hojas



RT-PCR clón CFSV-S4 Raíces

# Diagrama del método molecular para detección de CFSV



# Comparación de las dos metodologías disponibles para la detección del Virus del cuero de sapo de la yuca



Injerto



Tiempo:  
72  
semanas



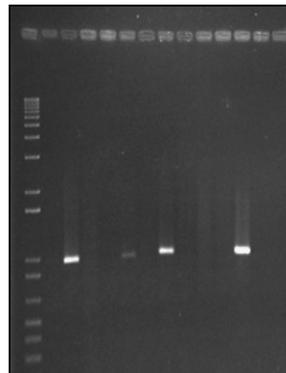
Injerto modificada



Tiempo:  
21  
semanas



RT- PCR



Tiempo:  
5 días

## VENTAJAS MÉTODO MOLECULAR

- ✓ Tiempo
- ✓ Espacio
- ✓ Poco tejido
- ✓ Confiable
- ✓ Eficiente
- ✓ Mayor rango de detección
- ✓ Diagnostico en plantas no adaptables en invernadero.
- ✓ No hay escapes ni confusión por otros efectos ambientales.

# A futuro

- Secuenciar completamente el genoma de CFSV
- Interacción con un fitoplasma posiblemente relacionado con CFSD
- Búsqueda de Vectores

# Cicadélidos y delfácidos detectados en cultivos de yuca en Colombia

Familia	Especie
Cicadellidae	<i>Agallia</i> spp.
	<i>Empoasca bispinata</i>
	<i>Hortensia similis</i>
	<i>Planicephalus flavicosta</i>
	<i>Scaphytopius</i> spp.
	<i>Stirellus bicolor</i>
	<i>Tylozygus fasciatus</i>
Delphacidae	<i>Perkinsiella saccharicida</i>
	<i>Peregrinus maidis</i>
	<i>Sogatella kolophon</i>

# Gracias

