

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/281206475>

# Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la...

Book · November 2011

CITATIONS

0

READS

580

5 authors, including:



**Jorge Evelio Ángel**

Instituto Colombiano Agropecuario

14 PUBLICATIONS 41 CITATIONS

SEE PROFILE



**Edison Chavarro Mesa**

Universidad Tecnológica de Bolívar

10 PUBLICATIONS 18 CITATIONS

SEE PROFILE



**Ida Micaela Bartolini**

Servicio Nacional de Sanidad Agraria

11 PUBLICATIONS 82 CITATIONS

SEE PROFILE



**Ciro Barrera**

Instituto Nacional de Innovación Agraria

4 PUBLICATIONS 24 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Generación de una estrategia para el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa que incluya el uso de *Trichoderma* sp. [View project](#)



Seguimiento a *Diaphorina citri* (Hemiptera : Psyllidae) como potencial vector de HLB en la citricultura de Colombia [View project](#)







*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*



PROYECTO DE COOPERACIÓN UE-CAN  
"Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio"  
FAT



**Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN**



PROYECTO DE COOPERACIÓN UE-CAN  
"Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio"  
FAT



**SENASA**  
Servicio Nacional de Sanidad Agraria  
**PERÚ**



**Autores:**

**Jorge Evelio Ángel Díaz PhD.**

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (Área de Biología Molecular). Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Km 14 vía Bogotá a Mosquera (Cundinamarca, Colombia). [jorge.angel@ica.gov.co](mailto:jorge.angel@ica.gov.co)

**Edisson Chavarro Mesa MSc.**

Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (Área de Biología Molecular). Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Km 14 vía Bogotá a Mosquera (Cundinamarca, Colombia). [echavarrom@unal.edu.co](mailto:echavarrom@unal.edu.co)

**Ida Bartolini Martínez MSc.**

Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Nacional de Sanidad Agraria- SENASA. Av. La Molina No.1915 (Lima, Perú). [ibartolini@senasa.gob.pe](mailto:ibartolini@senasa.gob.pe)

**Jorge Luis Benavides Ranilla MSc.**

Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA. Av. La Molina No. 1981 (Lima, Perú). [jbenavides@inia.gob.pe](mailto:jbenavides@inia.gob.pe)

**Ciro Barrera Rojas MSc.**

Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA. Av. La Molina No 1981 (Lima, Perú). [cbarrera@inia.gob.pe](mailto:cbarrera@inia.gob.pe)

**Entidades Participantes:**

Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Colombia)  
Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA (Perú)  
Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA (Perú)  
Secretaría General de la Comunidad Andina (SG-CAN)

**Con el apoyo de:**

Comisión Europea  
Proyecto de Cooperación UE-CAN  
Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio-FAT

© Proyecto; Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN

ISBN: 978-958-8214-82-5

Diseño, diagramación e impresión:

DESEA Ltda.

PBX: (0571) 7030015

[www.deseads.com](http://www.deseads.com)

Bogotá, D.C. Noviembre de 2011



La presente publicación ha sido elaborada en el marco del Proyecto Facilidad de Cooperación UE-CAN para la Asistencia Técnica al Comercio (FAT). Su contenido es responsabilidad exclusiva del Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Entidad líder en Colombia), Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA (Entidad socia en Perú) y el Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA (Entidad socia en Perú) y en ningún caso refleja los puntos de vista de la Comisión Europea, de la Secretaría General de la Comunidad Andina ni del Proyecto FAT.

El proyecto Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio tiene como objetivo fortalecer el proceso de integración, contribuir al desarrollo de las negociaciones entre la UE y los países de la CAN e intensificar el intercambio comercial intraregional entre la Unión Europea y la Comunidad Andina. Así mismo, apoya a las instituciones públicas y privadas involucradas con la integración regional andina y el comercio intra-regional con el bloque europeo, en la solución a sus problemas técnicos, legales y comerciales.

Proyecto: Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN.

*Bogotá , Colombia, 1 de noviembre de 2011*

*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN).  
Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN.

Líder del proyecto  
Jorge Evelio Ángel Díaz, Ph.D.  
Instituto Colombiano Agropecuario ICA

**INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA (ENTIDAD LÍDER EN COLOMBIA)**

**Equipo técnico del proyecto** Edison Chavarro Mesa  
Julián Gilberto Martínez Henao  
Walther Turizo Álvarez  
Erick Geovanni Hernández

**Administración del proyecto** Jaime Dueñas Narváez  
Thomas González  
Lily Ana Chávez Zarama

**Revisión del documento** Adriana González Almario

**SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA SENASA (ENTIDAD SOCIA EN PERÚ)**

**Equipo técnico del proyecto** Ida Bartolini Martínez  
Arturo Olórtegui Livia  
Ernesto Velit Tamanaja

**INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA-INIA (ENTIDAD SOCIA-PERÚ)**

**Equipo técnico del proyecto** Jorge Benavides Ranilla  
Ciro Barrera Rojas  
Carlos Alvarado Aliaga  
Elizabeth Dávila



*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*

## *Agradecimientos*

*Las entidades beneficiarias: Instituto Colombiano Agropecuario ICA (entidad líder de la acción en Colombia), Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA e Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA (Entidades socias de la acción en Perú), expresan sus agradecimientos a la Comisión Europea por la financiación del presente proyecto y a la Secretaría General de la Comunidad Andina del Proyecto Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio FAT por su cooperación y constante apoyo, y a las demás personas y entidades que participaron en la realización de este convenio.*

*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*



# Índice

Presentación	
Descripción general del problema	
Beneficiarios de la acción	
Antecedentes del proyecto	
Objetivo del proyecto	
<b>Capítulo 1.</b> Martínez J.G., Chavarro E., Hernández G., Turizo W., Ángel J.E. DETECCIÓN DE BANANA STREAK VIRUS BSV (VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO)	<b>Pág.</b> <b>16</b>
<b>Capítulo 2.</b> Turizo W., Hernández G., Martínez J.G., Chavarro E., Ángel J.E. DETECCIÓN DE CUCUMBER MOSAIC VIRUS CMV (VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO)	<b>28</b>
<b>Capítulo 3.</b> Martínez J.G., Chavarro E., Ángel J.E. AVANCE EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS INICIAL Y CONFIRMATORIA PARA LOS VIRUS BANANA STREAK VIRUS (BSV) Y CUCUMBER MOSAIC VIRUS (CMV) EN MUSÁCEAS	<b>40</b>
<b>Capítulo 4.</b> Bartolini I., Olórtegui A., Tamanaja E. V. DETECCIÓN DE BANANA BRACT MOSAIC VIRUS BBRMV (VIRUS DEL MOSAICO DE LA BRÁCTEA)	<b>50</b>
<b>Capítulo 5.</b> Bartolini I., Olórtegui A., Tamanaja E. V. DETECCIÓN DE BANANA BUNCHY TOP VIRUS BBTV (VIRUS DEL COGOLLO RACIMOSO DEL BANANO)	<b>64</b>
<b>Capítulo 6.</b> Alvarado C., Dávila E., Benavides J.L. Barrera C. DETECCIÓN DE ABACA MOSAIC ABAMV (VIRUS DEL MOSAICO DEL ABACÁ)	<b>76</b>
<b>Capítulo 7.</b> Alvarado C., Dávila E., Benavides J.L. Barrera C. DETECCIÓN DE BANANA MILD MOSAIC VIRUS BANMMV (VIRUS DEL MOSAICO LEVE DEL BANANO)	<b>84</b>
ANEXO. RESÚMENES MESA DE DIÁLOGO PROYECTO	<b>99</b>



*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*

## *Presentación*

En estos momentos la CAN no cuenta con unas normas técnicas de diagnóstico en común o manuales estándares que se manejen entre entidades reguladoras fitosanitarias del gobierno. Actualmente, cada entidad maneja sus normas internas, lo que dificulta tener un mismo lenguaje técnico y una comunicación directa para intercambiar resultados, comentarios e inquietudes y dar alertas de las emergencias fitosanitarias. Lo anterior es un aspecto que se necesita para fortalecer los vínculos bilaterales y las relaciones técnico-científicas, que impulsen y acompañen la comercialización de productos agrícolas y genere confianza en los inversionistas exportadores e importadores que, en últimas, son los encargados de inyectar el capital necesario para que crezcan y se mantengan los agronegocios de la CAN.

La Comunidad Europea (CE) y la Comunidad Andina (CAN) coincidieron hoy en mostrarse “satisfechas” por el curso de las negociaciones para lograr un acuerdo de asociación entre ambas regiones, aunque para ello quedan asuntos “complicados” por resolver, como las normas sanitarias y fitosanitarias. La CAN enfrenta temas como: la necesidad de sincerar el cumplimiento de los acuerdos y en ese marco adoptar medidas, entre las que se recomienda el fortalecimiento de la normativa andina en el campo paraarancelario (normas técnicas fitosanitarias, propiedad intelectual, tránsito, unión aduanera), lo cual fortalecería la integración regional andina y los vínculos comerciales entre las dos regiones. Con la ejecución de este proyecto se contará con un paquete tecnológico de seis metodologías de diagnóstico para la detección de los virus de mayor importancia económica en musáceas (CMV, BSV, BBTv, BBrMV, BanMMV y AbaMV), que pueden ser implementadas en los sistemas de certificación de material de musáceas, además de ser utilizadas en una eventual aparición de aquellos virus no presentes en la región andina.

## *Descripción general del problema*

Una limitante en el cultivo de banano y plátano son los problemas fitosanitarios causados por virus, los cuales han afectado seriamente la productividad de los cultivos y la calidad de la producción para la exportación. La propagación de plántulas *In Vitro* de musáceas no ha mostrado ser la estrategia que garantice la eliminación de virus debido a que las partículas virales pueden encontrarse en concentraciones mínimas o pueden estar presentes en el genoma de la planta como es el caso del BSV en *M. balbisiana*. Así mismo, existe el factor de la diversidad molecular entre variantes virales, lo que ha dificultado su detección por algunas técnicas convencionales. Debido a esto, la presencia de virus en musáceas debe ser detectada y para ello se requiere desarrollar de un sistema que permita certificar el material semilla utilizado para la propagación, implementando tecnologías sensibles y específicas para la detección de virus reportados en la Comunidad Andina (CAN) y en otras regiones productoras de estos cultivos.

## *Beneficiarios de la acción*

### **Colombia** (beneficiario)

Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MADR, Centro de Investigación del Banano-CENIBANANO, Asociación Hortifrutícola de Colombia-ASOFRUCOL, Federación Nacional de Plataneros-FEDEPLATANO, Asociación de Bananeros- AUGURA, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA, Centro Internacional de Agricultura Tropical- IAT, Universidad Nacional de Colombia-UNAL, Universidad Tecnológica de Pereira-UTP, Universidad INCCA de Colombia-UNINCCA, Universidad de la Paz-UNIPAZ, Universidad Francisco de Paula Santander-UFPS.

### **Perú** (socio)

**INIA y SENASA** - Ministerio de Agricultura del Perú, REPEBAN CJ PERÚ (red de pequeños bananeros: AVCH, APPBOSA APOQ, BOS y TONGORRAPE), CEPIBO (Central Piurana de Pequeños Productores de Banano Orgánico), Corporación Peruana de Desarrollo Bananero, Bio Costa, Biorgánica, Inkabanana, Pronatur, Organia, Grupo Hualtaco Universidad de Piura (UDEP), Universidad Nacional de Tumbes (UNT), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Universidad Nacional De San Martín (UNSM), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Universidad Nacional de Ucayali (UNU).

## *Antecedentes del proyecto*

Las especies de la familia de las Musáceas se propagan comercialmente de manera asexual a través de dos vías de multiplicación *In Vitro* (germoplasma) e *In Vivo* (cormo), las cuales representan una vía factible para la propagación de virus si no se tienen los mecanismos adecuados para su detección que faciliten la propagación y movimiento de material vegetativo. Una de las limitantes comerciales en el cultivo de banano y plátano son los problemas fitosanitarios causados por virus que han afectado seriamente la productividad de los cultivos y la calidad de la producción para la exportación.

Este proyecto surge de la necesidad y compromiso de la Comunidad Andina (CAN) en proteger la producción agrícola de la amenaza de los agentes fitopatógenos y de obtener una agenda común con todos los miembros, que acompañe y fortalezca los procesos de exportación de sus productos, brindando seguridad a los países importadores de la inocuidad de nuestros productos. El principio de prevención y control fitosanitario señala que la mejor alternativa para minimizar el riesgo de infección y diseminación de un patógeno en sí es la detección del mismo en la fuente, es decir en la semilla o material de propagación. De este concepto se parte para demostrar la necesidad de diseñar e implementar un sistema de certificación fitosanitaria de material de propagación en este caso tomando como modelo la familia de las Musáceas debido a la importancia socio económica del plátano y banano para la economía de la CAN.

## *Objetivo del proyecto*

El objetivo del proyecto fue establecer las bases para la unificación y fortalecimiento del sistema de protección fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN) implementando un caso modelo de trabajo en el aspecto de detección y control de virus de importancia económica en la cadena productiva de Musáceas (Banano y Plátano). Este proyecto hace parte del proyecto marco financiado por la Comunidad Económica Europea, “Facilidad de Asistencia Técnica al Comercio” que tiene como objetivo fortalecer el proceso de integración, contribuir al desarrollo de las negociaciones entre la UE y los países de la CAN e intensificar el intercambio comercial intra-regional entre la Unión Europea y la Comunidad Andina, para lo cual apoya a las instituciones públicas y privadas involucradas con la integración regional andina y el comercio intra-regional con el bloque europeo, en la solución a sus problemas técnicos, legales y comerciales.



## Capítulo 1

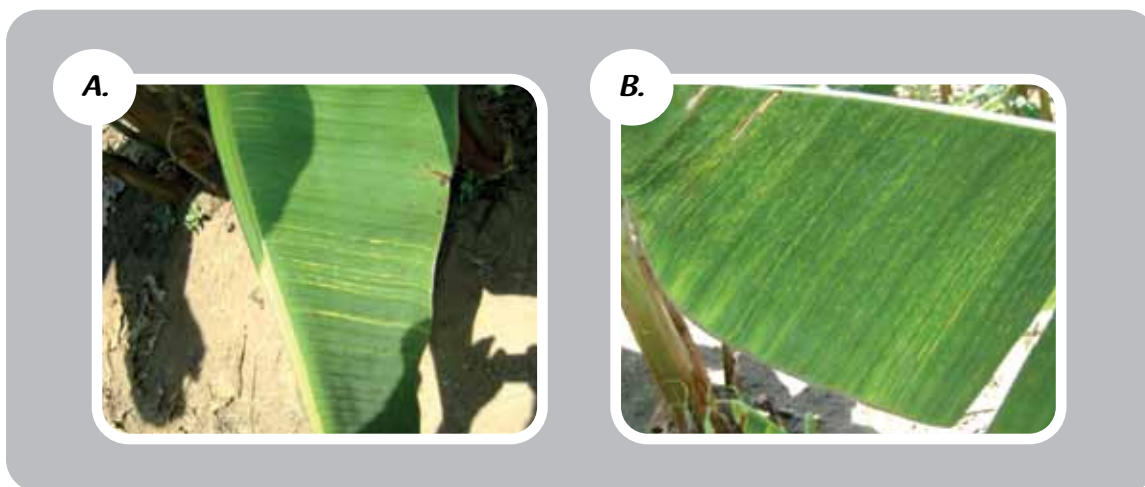
# Detección de Banana Streak Virus BSV (Virus del Rayado del Banano)

*Julián Martínez Henao, Edisson Chavarro Mesa, Erick Geovanni Hernández, Walther Turizo Álvarez, Jorge Evelio Ángel Díaz*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (Área de Biología Molecular). Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. Km 14 vía Bogotá a Mosquera (Cundinamarca, Colombia). E-mail: jorge.angel@ica.gov.co.

### Generalidades

El BSV es un pararetrovirus, miembro del grupo badnavirus, y está serológicamente relacionado con el virus baciliforme de la caña de azúcar. Presenta partículas baciliformes de 130-150 x 30 nm contenidas de un genoma de doble cadena circular de ADN (Harper y Hull, 1998; Daniells et al., 2001). El BSV es transmitido de manera semipersistente por pseudococcidos (Kubiriba et al., 2001). Sin embargo, la forma principal de disseminación es por propagación de material vegetativo infectado (Lockhart, 1994). El BSV no ha sido transmitido a *Musa* a través de inoculación mecánica; no obstante, existen evidencias de su transmisión a través de la semilla de *Musa* AAB (Daniells et al., 1995). Este badnavirus causa problemas severos en el cultivo de bananos, reduciendo el rendimiento de los frutos y restringiendo el mejoramiento de plantas y el movimiento de germoplasma (Harper y Hull, 1998). La enfermedad se manifiesta inicialmente como un mosaico consistente de rayas o estrías cloróticas, continuas o interrumpidas, esparcidas o concentradas en algunas áreas de las hojas. Las estrías cloróticas progresivamente se vuelven necróticas, produciendo un aspecto de estriado de color marrón oscuro o negro en las hojas más viejas. En algunos cultivares infectados se observan rayas cloróticas en las hojas (Figura 1A y 1B). Las plantas afectadas presentan un reducido vigor, racimos de menor tamaño y algunas veces frutos deformes; consecuentemente, se presenta una disminución en la producción.



*Figura 1. Posible sintomatología asociada con BSV en Musa sp. A y B (Material Manzales Colombia).*

## *Antecedentes sobre detección y epidemiología*

El diagnóstico del BSV es difícil de realizar, debido a la heterogeneidad genómica y serológica de los diferentes aislamientos del BSV (Lockhart, 1993). La detección del BSV no se puede realizar mediante la técnica de análisis de la doble cadena de RNA (dsRNA), debido a que el virus no posee intermediarios replicativos de este tipo (su genoma consiste en ADN de doble cadena).

De igual forma la detección mediante la amplificación de fragmentos de su ADN genómico, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es complicada por la gran variabilidad del virus. Además, la concentración del virus es generalmente baja, ocasionando incluso la desaparición periódica de los síntomas en las hojas y resultados negativos en los análisis serológicos (Lockhart, 1986). Posiblemente por las anteriores razones, algunas de las plantas sintomáticas de plátano y caña de azúcar resultaron negativas para el diagnóstico del BSV.

El BSV puede ser transmitido por insectos vectores entre plantas de banano y mediante inoculación mecánica de banano a caña de azúcar (Lockhart y Autre 1988). Puesto que el BSV se detectó también en cultivos de caña de azúcar vecinos a las plantaciones de plátano en la localidad de Andes, Antioquia región anteriormente cañera, es factible que el BSV haya sido transmitido de alguna manera de la caña de azúcar al plátano.

El BSV también pudo haber sido introducido y diseminado en el país, a través de la importación de material de siembra comercial de banano, producido *in Vitro*, en laboratorios de países productores de este tipo de material, donde el BSV ya estaba presente. Es sabido que el BSV es difícil de erradicar por la técnica del cultivo *in Vitro* de ápices meristemáticos, facilitando de esta manera su diseminación por la micropropagación masiva de materiales contaminados. La periodicidad en la expresión de los síntomas del BSV es un agravante del problema, dificultando la selección de plantas madres libres del virus.

En Musáceas, los síntomas producidos por el BSV se pueden confundir fácilmente con los ocasionados por el CMV. De esta manera la presencia del BSV pudo haber pasado inadvertida por algún tiempo en las regiones productoras de plátano y banano de Colombia, especialmente en la zona cafetera de Antioquia y Quindío, en donde se produce cerca del 70% del plátano que se consume en el país (Belalcázar, 1991). En ésta región, el banano se cultiva intercalado con café y es frecuente encontrar pequeñas plantaciones de caña de azúcar para la producción de panela.

## *Detección inmunoenzimática de BSV mediante TAS-ELISA (ADGEN Phytodiagnosics®)*

### *Metodología*

1. Diluir el anticuerpo de cobertura (PAb) en buffer de cobertura 1:1000 y agregar 100 µL en los pozos de la placa en que se realizará el diagnóstico.
2. Incubar a 37 °C/4 horas en cámara húmeda.
3. Lavar la placa 3 veces con Buffer Fosfato Salino + Tween 20 (0.05 %) (PBST).
4. Macerar 1g de tejido vegetal en 10 ml de Buffer de Extracción General.
5. Servir 100 µL del macerado, controles positivos y controles negativos por duplicado.
6. Incubar la placa a 4 °C durante toda la noche (al menos 16 horas), en cámara húmeda.
7. Lavar la placa 3 veces como se describe en el paso 3.
8. Adicionar 200 µL de una solución de leche descremada al 5% en PBS
9. Incubar a 37 °C/1 hora en cámara húmeda.

10. Lavar la placa 3 veces como se describe en el paso 3.
11. Diluir el anticuerpo en *buffer de dilución Mab* 1:100 y servir 100 µL en cada pozo.
12. Incubar a 37 °C/2 horas en cámara húmeda.
13. Lavar la placa 3 veces como se describe en el paso 3.
14. Diluir el conjugado enzimático IgG-AP en *buffer conjugado* 1:1000 y servir 100 µL en cada pozo.
15. Incubar a 37 °C/1 hora en cámara húmeda.
16. Lavar la placa 4 veces como se describe en el paso 3. El lavado extra se incluye en esta etapa con el fin de asegurar que todo el conjugado no fijado sea removido de todos los pozos.
17. Preparar el sustrato justo antes de usarlo. Para ello, agregue dos tabletas de PNP de 5 mg c/u en 10 ml de *buffer sustrato*, por cada placa a procesar.
18. Agregar 100 µL de sustrato preparado dentro de cada pozo.
19. Incubar en oscuridad a temperatura ambiente/1 hora (Revisar frecuentemente si ocurre cambio de coloración en cada uno de los pozos). Alternativamente, detenga la reacción utilizando 100 µL de NaOH 3M por pozo.
20. Leer la absorbancia (420 nm), de cada una de las muestras utilizando un espectrofotómetro. Una muestra es positiva cuando su valor de absorbancia es mayor que el valor promedio de absorbancia del control negativo más dos desviaciones estándar.

## Resultados compilados

Los resultados obtenidos para detección inmunoenzimática de BSV siguiendo las instrucciones del fabricante (ADGEN Phytodiagnosics®), fueron evaluados en varias oportunidades y con respecto a éstos, fueron incluidas modificaciones en el procedimiento. Las muestras analizadas correspondieron inicialmente a los controles positivos y negativos ofrecidos por ADGEN que corresponden a material vegetal seco.

Después del lavado del antígeno en las placas y mínimo 16 horas de incubación a 4°C, se adicionó leche descremada al 5% durante 1 hora con incubación a 37°C. Lo anterior disminuyó notablemente la variación de la densidad óptica (D.O) entre los duplicados de los controles positivos y negativos la cual osciló entre 5.30% al 13.3%; y el rango de dispersión entre



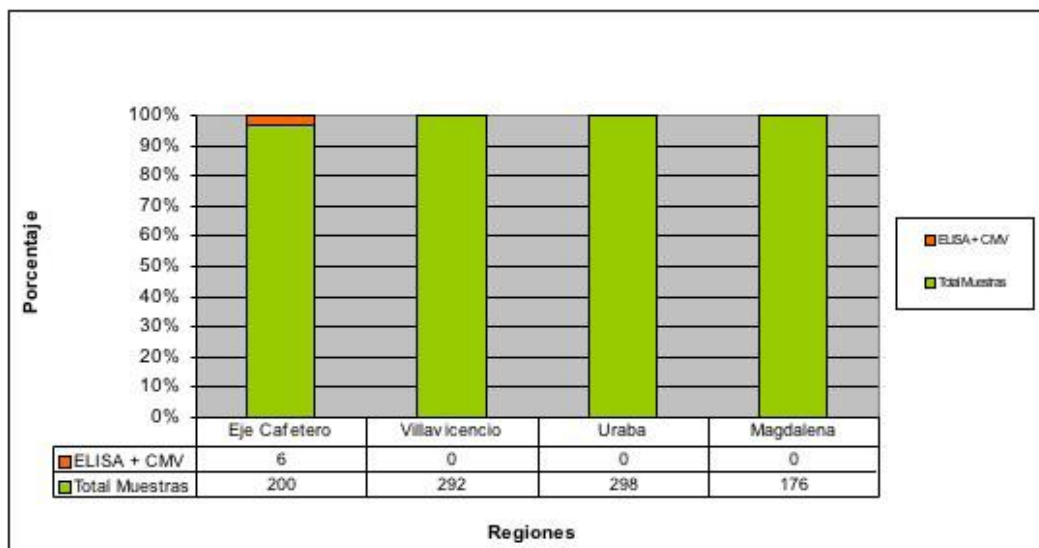
el promedio de las D.O de positivos y negativos aumentó siendo el valor máximo para los negativos 0,08 y el mínimo para los positivos 0,17 (Tabla 1).

*Tabla 1. Efecto de la adición de paso de bloqueo con leche descremada al 5% en la detección de BSV por TAS-ELISA.*

Controles	Negativos		Positivos	
	Promedio	C. Var.	Promedio	C. Var.
1	0,08	13,34	0,17	6,18
2	0,07	7,75	0,18	3,23
3	0,08	11,14	0,19	4,49
4	0,08	5,30	0,20	11,37
5	0,08	11,28	0,19	2,61
6	0,07	8,54	0,19	1,49
MAX	0,08	13,34	0,20	11,37
MIN	0,07	5,30	0,17	1,49

Con el fin de establecer los valores del ensayo que son válidos para usar en la prueba, se determinó el rango operativo lineal del ensayo mediante diluciones seriadas hasta un factor de dilución de 16. La asignación del estado de positivo o negativo de la muestra para BSV se realizó mediante la utilización de un punto de corte determinado por la sumatoria del promedio de los valores negativos y dos desviaciones estándar. Se determinó la posibilidad de diferenciación de los positivos y los negativos en una razón 1:3 de positivos y negativos. Las muestras recolectadas fueron procesadas por TAS-ELISA en grupos de tres plantas; los grupos que presentaron una D.O superior al promedio de los controles negativos fueron desagregados y la detección se realizó de nuevo de forma individual. En la gráfica 1 se expresa el total de muestras individuales reactivas para BSV por TAS-ELISA.

Gráfica 1. Distribución de Positivos y Negativos para BSV por TAS-ELISA.



## Detección de BSV mediante IC-PCR (PCR-Inmunocaptura)

### Metodología

La amplificación de Banana Streak Virus (BSV) se realizó de acuerdo a las condiciones reportadas por Harper et al. (2002) con pequeñas modificaciones. Las parejas de iniciadores utilizados fueron 1AF5'-CTN TAY GAR TGG YTN GTN ATG CCN TTY GG-3' – 4R 5'- TCC AYT TRC ANA YNS CNC CCC ANC C-3' (Harper et al., 2002).

#### 1. Sensibilización de tubos de PCR

Adicionar a cada tubo de PCR 100  $\mu$ L de el anticuerpo PAB en Buffer de cobertura (ADGEN Phytodiagnosics) 2:100 e incubar 3 horas a 37°C o toda la noche a 4°C y posteriormente lavar 3 veces con buffer PBS-T.

## 2. Adición del antígeno

Macerar 5g de material vegetal en 10 mL de buffer de extracción de ELISA (ADGEN Phytodiagnosics®). Adicionar 100 µL de macerado aclarado a los tubos de PCR sensibilizados e incubar 5 horas a 37oC o toda la noche a 4oC. Posteriormente lavar 3 veces con buffer PBS-T y una vez más con agua destilada estéril. Este tubo se utilizará para realizar la prueba de PCR. **Nota.** Transferir 1 mL del sobrenadante del macerado a un tubo Ependorff y almacenarlo a – 20oC hasta su uso.

## 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR

En la Tabla 2 se muestran las condiciones de PCR utilizadas para un volumen final de 25 µL/reacción y en la Tabla 3 se describe el programa de amplificación usado para la detección de BSV.

Tabla 2. Condiciones para PCR de BSV.

Reactivos PCR	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (µL) / 25 µl Reacción
H2O	—————	—————	17
Buffer PCR	10 X	1 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3 mM	1,5
BSA	—————	—————	1
Iniciador Forward	10 µM	0.24 µM	0,6
Iniciador Reverse	10 µM	0.24 µM	0,6
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0,5
Taq Polimerasa	5u/µL	1.5 U	0,3
DNA Templado	—————	—————	1

Tabla 3. Programa utilizado en la amplificación de BSV.

Paso	Etapa	Temperatura °C	Tiempo
1	Denaturación inicial	94	10 minutos
2	Denaturación	94	30 Segundos
3	Hibridación	37	30 Segundos
4	Elongación	72	90 Segundos
5	Ir a	Ir del paso 2 al paso 4, durante 5 ciclos	
6	Denaturación	94	30 Segundos
7	Hibridación	50	30 Segundos
8	Elongación	72	60 Segundos
9	Ir a	Ir del paso 6 al paso 8, durante 30 ciclos	
10	Elongación Final	72	10 minutos

## Resultados compilados

Se realizó la detección de BSV por IC-PCR en las muestras reactivas por TAS-ELISA y al menos tres veces más el número de muestras negativas (Razón 3:1), con la finalidad de comparar los diagnósticos realizados por estas dos metodologías. Las muestras positivas son caracterizadas por la obtención de un amplicón de 600 pb (Figura 2). El número de muestras analizadas por IC-PCR y el número total de positivos se muestran en la gráfica 2.

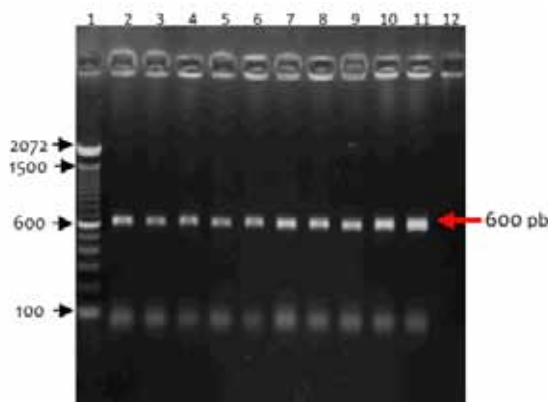
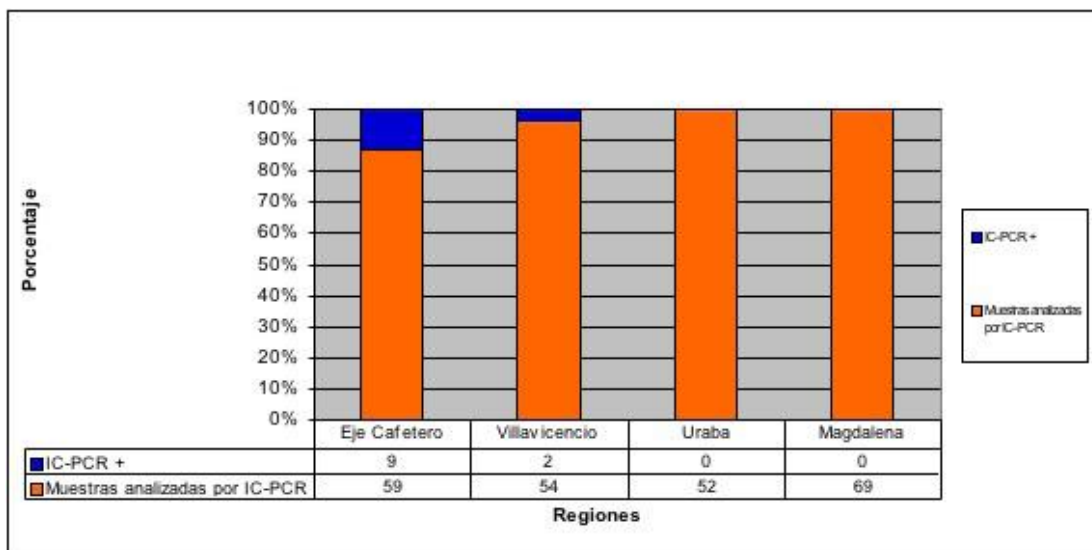


Figura 2. Detección de BSV mediante IC-PCR.

Pozo 1; Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), Pozos 2-5; Muestras provenientes del Eje Cafetero- Colombia, Pozo 6-9; Muestras provenientes de los Llanos Orientales-Colombia Pozo 10 y 11; Controles positivos, Pozo 12; Blanco de la Reacción.

Gráfica 2. Muestras analizadas y positivas para BSV por IC-PCR.



## Detección Preliminar Mediante PCR en Tiempo Real SYBR green

### Metodología

Para la detección de BSV mediante PCR en tiempo real se utilizó el fluoróforo Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG y los iniciadores 5345F/6681R reportados por Delanoy *et al.* (2003). Las condiciones de amplificación se estandarizaron con base en el programa de PCR convencional y en los datos aportados por Delanoy *et al.* (2003) (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR Real Time.

Componente	Volumen utilizado $\mu\text{L}$ / (25 $\mu\text{L}$ de reacción)
H2O destilada-estéril	10,25
Maxter mix Sybr-green	12
(Iniciador)1	0,5
(Iniciador) 2	0,5
DNA templado	2



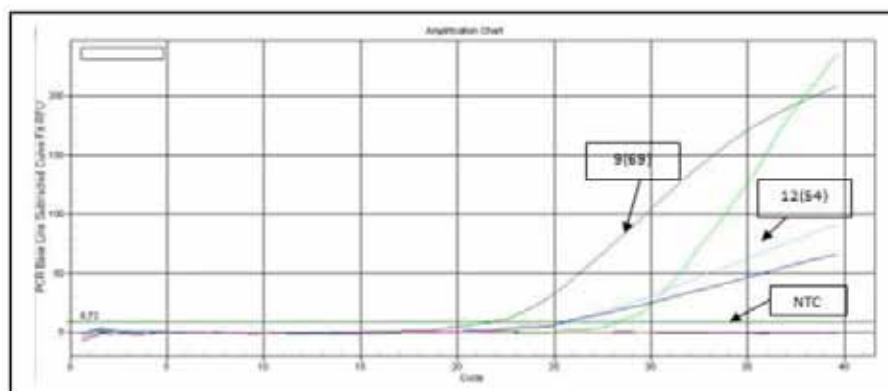
Tabla 5 Programa de termociclado PCR Real Time.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (Min-Seg)
Primer ciclo	50	02:00
Segundo ciclo	95	10:00
Tercer ciclo (repetir 40 veces)	95	00:30
	57	00:30
	72	01:00
Cuarto ciclo (repetir 81 veces)	55	00:30

## Resultados compilados

Utilizando las condiciones anteriormente descritas se logró mediante PCR en Tiempo Real Sybr Green, la detección de BSV observándose la curva para las detecciones positivas 9 y 12 correspondientes a las muestras 69-Piura y 54-Chancha procedentes de Perú y la ausencia en el NTC el cual muestra que la reacción no tuvo ninguna clase de contaminante, las muestras fueron amplificadas por duplicado (gráfica 3).

Gráfica 3. Vista de amplificación previa de la detección de BSV mediante PCR Real Time.



## Referencias

- Alarcón R, J.J., y Castaño Z. J., 2006. Reconocimiento fitosanitario de las principales enfermedades del plátano dominico hartón (*Musa aab simmonds*). *Agron.* 14(1): 65-79.
- Belalcázar, S. 1991. El Cultivo del Plátano en el Trópico. Manual de Asistencia Técnica No.5o. Comité de Cafeteros del Quindío, CIID, INIBA ICA, Cali, Colombia. pp.278- 279.
- Delanoy, M., Salmon, M., Kummert, J., Frison, E., and Lepoivre, P. 2003. Development of real time PCR for the rapid detection of episomal *Banana streak virus* (BSV). *Plant Dis.* 87:33-38.
- Daniells, J.W., Geering, A.D.W., Bryde, N.J., Thomas, J.E. 2001 The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. *Ann. Appl. Biol.* 139: 51-60.
- Daniells, J.; J. E. Thomas; M. Smith: Seed Transmission of Banana Streak Virus Confirmed, *Infomusa* 4 (1):7, Francia, 1995.
- Harper, G., Hart, D., Moul, S., Hull, R., 2002. Detection of Banana streak virus in field samples of bananas from Uganda. *Ann. Appl. Biol.* 141, 247–257.
- Harper, G., and Hull, R. 1998. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. *Virus Genes* 17: 271-278.
- Kubiriba, J., Legg, J.P., Tushemereirwe, W., Adipala, E. 2001. Vector transmission of *Banana streak virus* in the screenhouse in Uganda. *Ann. Appl. Biol.* 139: 37-43.
- Lockhart, B.E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76: 995-999.
- Lockhart, B.E.L. 1994. Banana streak. En: Ploetz, R.C., Zentmeyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G., Ohr, H.D. (Eds.) *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. APS Press. St. Paul, Minn., EEUU. pp. 19-20.
- Lockhart., B.E.L., and Autre, L.F .C. 1988. Ocurrance in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. *Plant Dis.* 72i 230-43.

- Lockhart, B.E.L., and Olszewski, N.E. 1993. Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: Implications for virus detection in *Musa* germplasm, En: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. Montpellier, France, pp. 105-113.
- Reichel, Helena., Belalcázar, Silvio., Múnera, Gladys., Arévalo, Emilio y Narváez, Javier. 1996. Primer reporte del virus del rayado del banano (BSV) afectando plantaciones de plátano (*Musa AAB Simmonds*), Caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) y Achira (*Canna edulis*) en Colombia. Revista CORPOICA, Vol. 1, No. 1.

## Capítulo 2

# *Detección de Cucumber Mosaic Virus CMV (Virus del Mosaico del Pepino)*

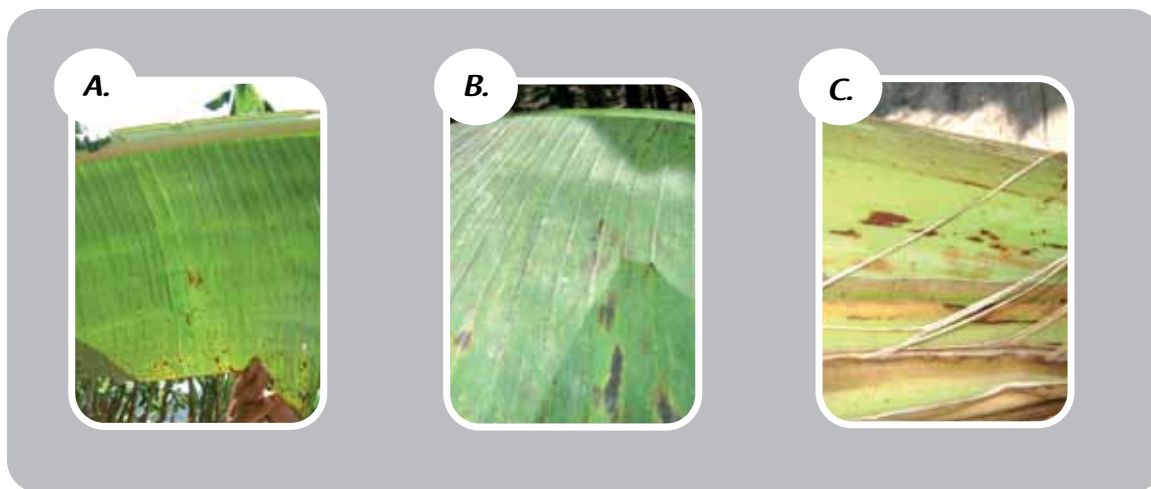
<sup>1</sup> *Walther Turizo Álvarez, Julián Martínez Henao, Erick Geovanni Hernández, Edisson Chavarro Mesa, Jorge Evelio Ángel Díaz*

Investigadores proyecto. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (Área de Biología Molecular). Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Km 14 vía Bogotá a Mosquera (Cundinamarca-Colombia). E-mail: Jorge.angel@ica.gov.co.<sup>1</sup>

### *Generalidades*

Los cultivos de plátano y banano ocupan áreas agrícolas muy importantes en Colombia y son la base fundamental de la economía de algunas de ellas. Como su propagación se realiza por métodos vegetativos se establecen las condiciones que permiten la perpetuación y diseminación de todas aquellas enfermedades que afectan sistémicamente a la planta. Entre éstas se encuentran las causadas por virus, siendo las menos estudiadas en Colombia pero que comienzan a adquirir importancia por los efectos que ellas tienen sobre la calidad y los rendimientos. El virus del Mosaico del Pepino (Cucumber Mosaic Cucumovirus, CMV), es el virus más ampliamente conocido en plátano y banano y se encuentra diseminado en todas las áreas productoras en el mundo. Los primeros síntomas se caracterizan por la presencia de rayas cloróticas discontinuas, paralelas a las nervaduras de la hoja. Los síntomas llevan a la formación de parches cloróticos que le dan el nombre de mosaico a la enfermedad y en ocasiones algunas hojas se pueden deformar como resultado de la infección (Figuras A, B y C). En la nervadura principal de la hoja se desarrollan lesiones necróticas, las que se observan también en el pseudotallo y llevan a pudriciones posteriores. Las plantas enfermas son más pequeñas y tienen un pseudotallo de menor diámetro. Como medidas de control de la enfermedad se recomienda la utilización de material de propagación libre de virus, la eliminación temprana de plantas enfermas, el control oportuno de malezas susceptibles que se convierten en fuente de inóculo para el cultivo y la toma de medidas para evitar la transmisión por medios mecánicos (Martínez, 2000).

Figura 1. Posible sintomatología asociada con CMV en *Musa sp.* A, B y C (Material Manizales Colombia).



## Antecedentes sobre detección y epidemiología

El *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), infecta más de 1.000 especies de hospederos, incluyendo miembros de 85 familias de plantas, lo que lo convierte en el virus conocido con más amplio rango de hospederos. El mosaico del pepino (cucumber mosaic) fue descrito por primera vez en 1916 por Doolittle y fue una de las primeras enfermedades de plantas atribuidas a un virus (Roossinck, 2001). Reportes de la enfermedad pronto vinieron de otros lugares en los Estados Unidos y más tarde de Europa y África (Price, 1934. En: Roossinck, 2001), y otras partes del mundo. Las herramientas para determinar la presencia del virus fue limitada y más tarde se demostró que hasta 40 diferentes enfermedades de plantas eran causadas por el CMV (Kaper & Waterworth, 1981. En: Roossinck, 2001).

El CMV produce una variedad de síntomas, siendo los más típicos moteados o mosaicos. Dependiendo de los hospederos y de los aislamientos del virus los síntomas también pueden incluir distorsión del crecimiento, marchitez, manchas anulares, fibrosidad de frutas y necrosis, seguido por muerte de la planta hospedera (Hsu, 2000).

El CMV causa grandes pérdidas en hortalizas, ornamentales y frutales, siendo muy destructivo debido a su alta dispersión y transmisión por más de 75 especies de áfidos de manera no persistente (Palukaitis et al., 1992. En: Roossinck, 2001). CMV puede ser transmitido por varias especies de áfidos incluyendo; *Aphis maidis*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum prunifoliae* y *Rhopalosiphum nymphaea*, los cuales no se alimentan normalmente de plátanos y bananos (Wardlaw, 1972. En: Chou, 2009).



Se han descrito muchos aislamientos de CMV y estos pueden ser divididos en dos grandes subgrupos, subgrupo I y subgrupo II, sobre las bases de las relaciones serológicas, mapeo peptídico de la cubierta proteica (CP), hibridación de ácidos nucleicos e identidad de secuencia de nucleótidos (Palukaitis et al., 1992. En: Yu, 2005). Recientemente se realizó una división más del subgrupo I en subgrupo IA y IB, esta propuesta fue basada sobre la secuencia de nucleótidos de la región 5' no codificante o no traducida (NTRs) y el gen de la cubierta proteica del RNA 3 (Roossinck, 2002; Roossinck et al., 1999. En: Yu, 2005).

## *Detección inmunoenzimática de CMV mediante DAS-ELISA (ADGEN Phytodiagnosics)*

### *Metodología*

1. Para sensibilizar la placa se debe diluir el anticuerpo de cobertura (PAb) en buffer de cobertura 1:1000 y agregar 100 µL en los pocillos de la placa.
2. Incubar a 37°C/4 horas en cámara húmeda.
3. Lavar la placa 3 veces con Buffer Fosfato Salino + Tween 20 (0.05 %) (PBST).
4. Macerar 1g de tejido vegetal en 10 ml de Buffer de Extracción General.
5. Aplicar 100 µL de las muestras maceradas en cada pocillo de la placa, así como de los controles positivos, controles sanos y buffer de extracción puro por duplicado.
6. Incubar la placa en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche (mínimo 16 horas).
7. Lavar la placa 3 veces con PBST como se describe en el paso 3.
8. Diluir el anticuerpo en buffer de dilución Mab 1:100 y aplicar 100 µL en cada pozo.
9. Incubar en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora.
10. Lavar la placa 4 veces con PBST como se describe en el paso 3.

El lavado extra se incluye en esta etapa con el fin de asegurar que todo el conjugado no fijado sea removido de todos los pozos.

11. Preparar el sustrato justo antes de usarlo. Para ello, agregar dos tabletas de PNP de 5 mg/c/u en 10 ml de buffer sustrato, por cada placa a procesar.
12. Agregar 100  $\mu$ L de sustrato preparado dentro de cada pozo.
13. Incubar la placa en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora (revisar frecuentemente si ocurre cambio de coloración en cada uno de los pozos). Alternativamente, detener la reacción utilizando 100  $\mu$ L de NaOH 3M por pozo.
14. Leer la absorbancia (420 nm), de cada una de las muestras utilizando un espectrofotómetro. Una muestra es positiva cuando su valor de absorbancia es mayor que el valor promedio de absorbancia del control sano más dos desviaciones estándar.

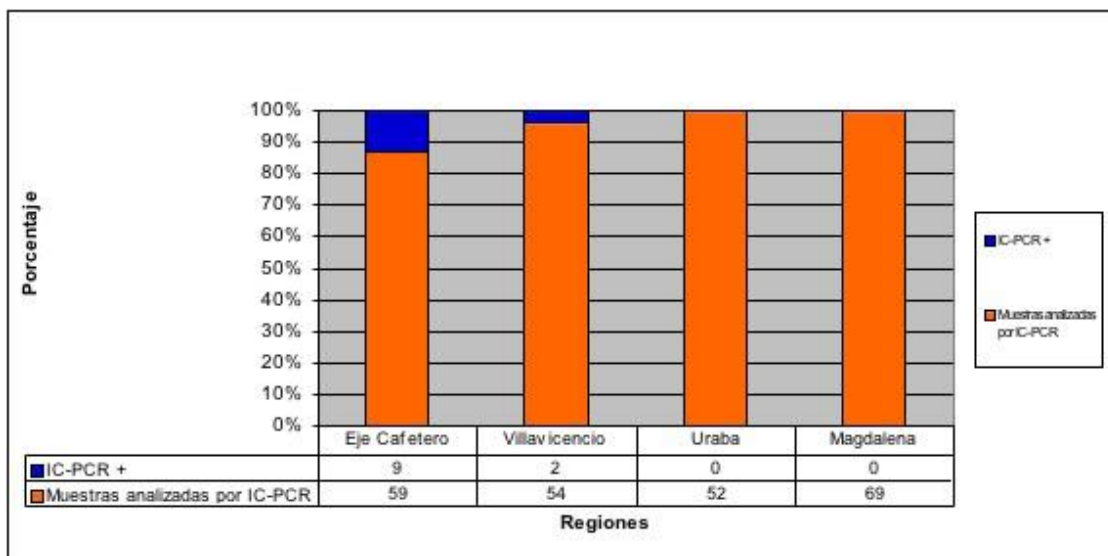
## *Resultados compilados*

Los resultados obtenidos para detección inmunoenzimática de CMV siguiendo las instrucciones del fabricante, fueron evaluados en varias oportunidades. Las muestras analizadas correspondieron inicialmente a los controles positivos y negativos ofrecidos por ADGEN que corresponde a material vegetal seco.

Después del lavado del antígeno en las placas y mínimo 16 horas de incubación a 4°C, se adicionó leche descremada al 5% durante 1 hora con incubación a 37°C. Lo anterior disminuyó notablemente la variación de la densidad óptica (D.O) entre los duplicados de los controles positivos y negativos la cual osciló entre 5.30 al 13.3%; y el rango de dispersión entre el promedio de las D.O de positivos y negativos aumentó siendo el valor máximo para los negativos 0,08 y el mínimo para los positivos 0,17. Con el fin de establecer los valores del ensayo que son válidos para usar en la prueba, se determinó el rango operativo lineal del ensayo mediante diluciones seriadas hasta un factor de dilución de 16. La asignación del estado de positivo o negativo de la muestra para CMV se realizó mediante la utilización de un punto de corte determinado por la sumatoria del promedio de los valores negativos y dos desviaciones estándar. Se determinó la posibilidad de diferenciación de los positivos y los negativos en una razón 1:3 de positivos y negativos.

Las muestras recolectadas fueron procesadas por DAS-ELISA en grupos de tres plantas; los grupos que presentaron una densidad óptica superior al promedio de los controles negativos fueron desagregados y la detección se realizó de nuevo de forma individual. En la grafica 1 se expresa el total de muestras individuales reactivas para CMV por DAS-ELISA.

**Grafica 1. Distribución de Positivos y Negativos para CMV por DAS-ELISA.**



Los grupos que obtuvieron valores de densidad óptica por encima del promedio de los controles negativos se consideraron reactivos por DAS ELISA para CMV y fueron analizados de nuevo mediante la misma metodología de forma individual. En la gráfica 1 se expresa el total de muestras individuales reactivas para CMV por DAS-ELISA. Solo fueron detectadas muestras positivas en el eje cafetero tomando como punto de corte el promedio de los negativos más dos desviaciones estándar.

## DetECCIÓN DE CMV MEDIANTE RT-PCR

### Metodología

**Protocolo de extracción de RNA de dobles cadenas – dsRNA - CMV (Técnica de Pappu et al., 1993; Guzmán, 1994; Guzmán et al., 1994)**

**Preparación del Sephadex:** Adicionar 2,5 gr de Sephadex G-50 a 50 mL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) y esterilizar. Cuando esté frío, retirar el líquido utilizando pipeta Pasteur y adicionar nuevo TE estéril, resuspender. Repetir 3 a 4 veces para remover impurezas finas y dextran soluble. Mantener a 4 °C dejando TE sobre el Sephadex G-50.

#### Extracción de dsRNA

1. Colocar en una gradilla tres tubos eppendorf de 1,5 ml (tapa rosca) por muestra correctamente marcados.
2. Macerar en nitrógeno líquido 1 gr de tejido hasta pulverizarlo e inmediatamente congelarlo a -20°C. Pesar 300 mg de tejido pulverizado en uno de los tubos de 1,5 mL e inmediatamente colocar el tubo eppendorf dentro de nitrógeno líquido.
3. Adicionar 500 µL de buffer de extracción (2% SDS; 0,1 M Tris pH 8,0 y 2 mM EDTA), 500 µL de fenol (Tris pH 8,0) – Cloroformo (1:1). Es decir 250 µL de fenol y 250 µL de cloroformo, dar vortex suavemente.
4. Colocar en hielo hasta procesar 4 muestras.
5. Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante al segundo tubo eppendorf de tapa rosca nuevo y rápidamente congelarlo en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso (muestra color amarillo indica dsRNA con impurezas).
7. Repetir hasta que todas las muestras estén congeladas.
8. Purificar dsRNA por medio de columna de exclusión de Sephadex G-50.

- Colocar un pequeño tapón de fibra de vidrio estéril en una columna plástica de 1 mL (jeringa de insulina sin aguja). Colocar una bolita hasta el extremo con la ayuda de un palillo de madera estéril.
- Adicionar el Sephadex con pipeta Pasteur estéril hasta completar toda la superficie y sin hacer burbujas (aquellas con burbujas se descartan). Colocar la columna dentro de un tubo eppendorf y todo esto dentro de un tubo de centrifuga falcon de 15 mL.
- Centrifugar a 1.600 rpm por 4 minutos. Retirar el TE del tubo falcon y continuar adicionando Sephadex hasta que el volumen de la columna sea de 0,9 mL.
- Lavar la columna dos veces con 150  $\mu$ L de TE, centrifugando cada vez a 1.600 rpm por 4 minutos.
- Aplicar 150  $\mu$ L de la muestra (del paso 6) y centrifugar a 1.600 rpm por 4 minutos, la muestra queda en el tubo tapa rosca.
- Recuperar el eluyente en un tubo eppendorf de tapa rosca, colocar el tubo en hielo, para el procedimiento de PCR inmediato o congelar a -80 oC (muestra transparente: dsRNA purificado).

## *Metodología de RT-PCR para detección del Cucumber Mosaic Virus (CMV)*

### *Síntesis de DNA complementario (cDNA) por Transcripción Reversa (RT) para la detección del CMV*

Síntesis de cDNA utilizando random primers y la enzima; Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), Cat.No: 28025-013, de la casa comercial Invitrogen®.

Mezclar y centrifugar cuidadosamente cada uno de los componentes usados.

1. Preparar la mezcla iniciador (random hexamer), dsRNA, dNTPs y agua ultra pura tratada con DEPC en un tubo estéril de 0,2 – 0,5 mL. Como se describe en la tabla 1.



**Tabla 1. Primera mezcla de reactivos para la RT usando random hexamers.**

Componente	Una (Rxn) Muestra
dsRNA	2 $\mu$ L
dNTP (10 mM – mezcla)	1 $\mu$ L
Random Hexamers (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Agua tratada con DEPC	11 $\mu$ L

2. Incubar cada muestra a 65°C por cinco minutos y pasar a hielo por un minuto.
3. Preparar la mezcla de reactivos que se observa en la tabla 2, para ser adicionada a cada mezcla de iniciador / dsRNA / dNTPs / agua grado molecular y preparar la mezcla para el número de reacciones necesarias (es recomendable utilizar los respectivos controles de la RT, como indica la casa comercial), la segunda mezcla de reactivos se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Segunda mezcla de reactivos para la RT (random hexamers).**

Componente	Una (Rxn) Muestra
First-Strand Buffer (5X)	4 $\mu$ L
DTT (0,1 M)	2 $\mu$ L
RNAseOUT	1 $\mu$ L

4. Adicionar 7  $\mu$ L de la segunda mezcla a cada tubo de dsRNA / Iniciador, etc. y agitar suavemente.
5. Incubar a 37°C durante dos minutos.
6. Adicionar 1  $\mu$ L de (200 unidades) de M-MLV-RT (a cada tubo), mezclar suavemente por pipeteo e incubar a 25°C durante 10 minutos.
7. Incubar la reacción a 37°C durante 50 minutos e inactivar mencionada reacción a 75°C por 15 minutos, transferir a hielo por un minuto.

8. Adicionar 1  $\mu$ l de E. coli RNase H (dos Unidades/ $\mu$ L) a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37°C.

### *Desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para CMV.*

Para la estandarización de la PCR se emplearon los iniciadores consignados en la tabla 3.

*Tabla 3. Pareja de oligonucleótidos específicos para la detección de CMV.*

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Polaridad
CP-CMV- F	CTT TYT CAT GGA TGC TTC TC	Sentido
CP-CMV-RE	GCT GGA TGG ACA ACC CGT TC	Antisentido

En la tabla 4 se muestran las concentraciones de los reactivos/enzima para la Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR de CMV.

*Tabla 4. Condiciones para la PCR (CMV).*

Reactivos para la PCR	Concentración Stock	Concentración Final
cDNA	---	2 uL de cDNA
Buffer de PCR	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Iniciadores Forward	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M
Iniciadores <b>reverse</b>	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M
Taq-Polimerasa	5 U/ $\mu$ L	1-2U/25 $\mu$ L

En la tabla 5 se visualiza el programa de termociclado empleado para la detección de CMV.

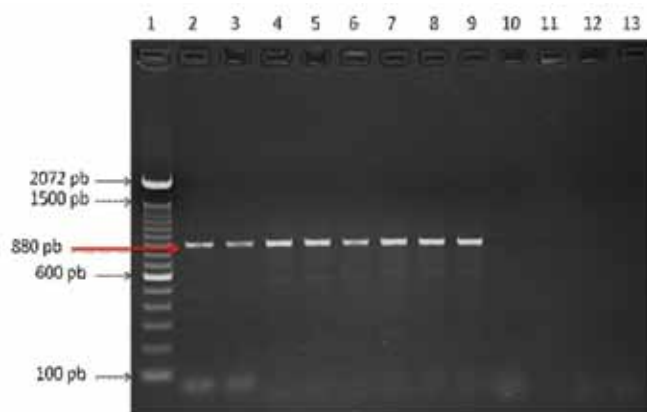
Tabla 5. Programa de Termociclado (PCR) de CMV.

Pasos de la PCR, utilizando los Iniciadores CP-CMV-F y CP-CMV-RE	Temperaturas, Tiempo y Número de Ciclos
Primera Denaturación	1= 95,0 °C por cinco minutos
Segunda Denaturación	2= 94,0 °C por un minuto
Temperatura de Hibridación	3= 55,0 °C por 30 segundos
Temperatura de Extensión	4= 72,0 °C por un minuto
Ir a	5= Ir del segundo al cuarto paso 35 ciclos
Temperatura de Extensión final	6= 72 °C por 10 minutos

## Resultados compilados

Se realizó la detección de CMV por RT-PCR en las muestras reactivas por DAS-ELISA y al menos tres veces más el número de muestras negativas (Razón 3:1), con la finalidad de comparar los diagnósticos realizados por estas dos metodologías. Las muestras positivas son caracterizadas por la obtención de un amplicón de 880 pb (Figura 2). El número de muestras analizadas por RT-PCR y el número total de positivos se expresa en la gráfica 2.

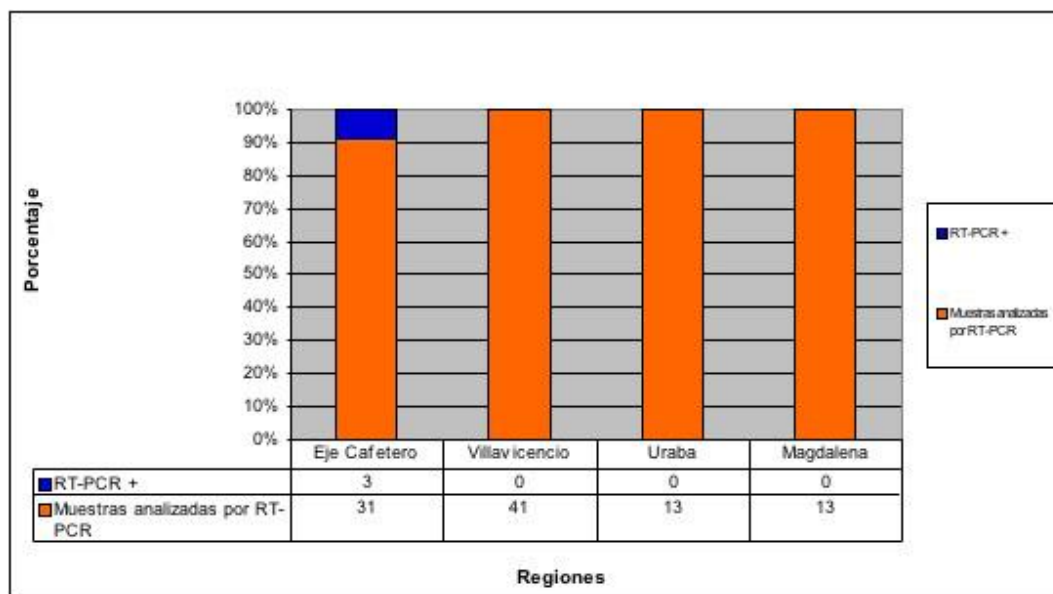
Figura 2. Detección de CMV mediante RT-PCR.



**Pozo 1;** Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), **Pozo 2;** Muestra N°154, **Pozo 3;** Duplicado de la Muestra N° 154, **Pozo 4;** Muestra N°5, **Pozo 5;** Duplicado de la Muestra N°5, **Pozo 6;**

Muestra N°84, **Pozo 7**; Duplicado de la Muestra N°84, **Pozo 8**; Muestra N°41, **Pozo 9**; Duplicado de la Muestra N°41, **Pozo 10**; Control Negativo 1, **Pozo 11**; Sin Muestra, **Pozo 12**; Control Negativo 2, **Pozo 13**; Blanco de la Reacción.

**Grafica 2. Muestras analizadas y Positivas para CMV por RT-PCR.**



## Referencias

- Chou, C.-N., Chen, C.-E., Wu, M.-L., Su, H.-J. & Yeh, H.-H. (2009) Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* Vol. 157 85-93.
- Guzmán-Barney, M., Manjunath, K. L., Pappu, S., Pappu, H., Febres, V., Lee, R. Niblett, C. 1993. Characterization of coat protein genes of citrus tristeza strains from Colombia. *Phytopathology* 83: 1403.
- Guzmán-Barney, M., Manjunath, K. L., Pappu, S., Pappu, H., Febres, V., Lee, R. Niblett, C. 1994. Comparación de secuencias del gen de la proteína de la cápsida de aislamientos colombianos del virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Fitopatología Colombiana* 18: 107-113.

Hsu, H.T., Barzuna, L., Hsu, Y.H., Bliss, W. & Perry, K.L. 2000. Identification and Subgrouping of Cucumber mosaic virus with Mouse Monoclonal Antibodies. *Phytopathology* 90:615-620

Martínez L. G., 2000. *Virología Vegetal*, evaluación de la importancia económica del virus del Mosaico del Pepino (Cucumber Mosaic Cucumovirus, CMV), en musáceas. [documento en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://ciagrope.tripod.com/ft03.html>>.

Pappu, S.S., R. Brand, H.R. Pappu, E.P. Rybicki, K.H. Gough, M.J. Frenkel and C.L. Niblett, 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selected amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: Application to Dasheen mosaic virus. *J. Virol. Methods*, 41: 9-20.

Roossinck, M., J. Cucumber mosaic virus a model for RNA virus evolution. 2001. *Molecular Plant Pathology* Vol. 2 59-63.

Yu, C., Wu, J. & Zhou, X. 2005. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 123, 155-161.



## Capítulo 3

# Avance en el proceso de validación de las pruebas diagnósticas inicial y confirmatoria para los virus Banana Streak Virus (BSV) y Cucumber Mosaic Virus (CMV) en musáceas

Julián Martínez Henao, Edison Chavarro Mesa, Jorge Evelio Ángel Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario (Área de Biología Molecular). Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. Km 14 vía Bogotá a Mosquera (Cundinamarca-Colombia). E-mail: Jorge.angel@ica.gov.co.

### Generalidades

Por exactitud o validez de una prueba se entiende qué tan bien funciona ésta cuando se compara con la prueba “reina” es decir la prueba que determina la verdad absoluta sobre la existencia o ausencia de enfermedad. La prueba reina también es conocida como el patrón de oro.

La estrategia recomendada para evaluar la validez o las características de cómo opera en la realidad una prueba diagnóstica es comparar la prueba a estudio contra el patrón de oro mediante una tabla de contingencia. La tabla contiene el resultado de la prueba bajo evaluación con un resultado positivo (anormal) o negativo (normal) y el resultado del patrón de oro que puede ser positivo para la enfermedad que queremos diagnosticar o negativo ya sea porque el control está sano o tienen otra enfermedad diferente.

En la tabla tetracórica se reconocen las siguientes casillas:

**VP:** verdaderos positivos aquellos que la prueba clasificó con la enfermedad y efectivamente tuvieron la enfermedad.

**VN:** verdaderos negativos aquellos que la prueba clasificó sin la enfermedad y efectivamente estaban sanos o no tenían esa enfermedad.

**FP:** falsos positivos aquellos que la prueba clasificó con la enfermedad y realmente estaban sanos o no tenían esa enfermedad.

**FN:** falsos negativos aquellos que la prueba clasificó sin la enfermedad y realmente tenían esa enfermedad. Los elementos a determinar en las características operativas de las pruebas diagnósticas son:

**-La sensibilidad:** capacidad de la prueba para detectar los realmente enfermos. Determina la probabilidad de que la prueba sea positiva dado que se está enfermo.

**-La especificidad:** capacidad de la prueba para detectar los realmente sanos. Determina la probabilidad de que la prueba sea negativa dado que se está sano o no se tiene la enfermedad a estudio.

**-El valor predictivo positivo (VPP):** probabilidad de estar enfermo dado que la prueba dio positiva.

**-El valor predictivo negativo (VPN):** probabilidad de estar sano o no tener esa enfermedad dado que la prueba dio negativa (VP/VN +FP).

**-Exactitud de la prueba:** número de exámenes en que la prueba calificó adecuadamente a los sujetos.

## Metodología

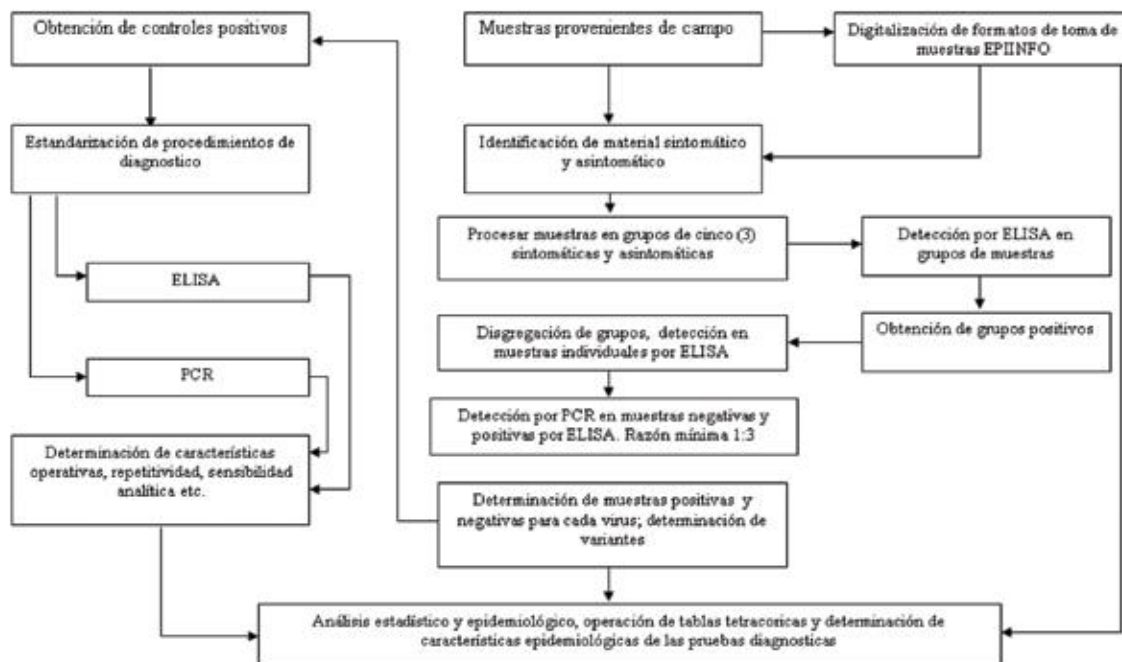


Figura 1. Diagrama metodológico, validación de las pruebas diagnósticas para los virus BSV y CMV.

## Validez del diagnóstico de Banana Streak Virus (BSV) por TAS-ELISA e IC-PCR

### Resultados compilados

En la Tabla 1 se muestra la relación entre las muestras analizadas por TAS ELISA e IC-PCR; de un total de 59 muestras analizadas por ambas técnicas 46 fueron negativas. El 15,3 % de las muestras fueron positivas por IC-PCR y el 16,9 % por TAS ELISA.

**Tabla 1. Tabla contingente de comparación de diagnósticos por IC-PCR y TAS-ELISA.**

		IC-PCR BSV		
		0	1	TOTAL
TAS ELISA BSV	0	46	3	49
	Fila %	93,9	6,1	100,0
	Columna %	92,0	33,3	83,1
	1	4	6	10
	Fila %	40,0	60,0	100,0
	Columna %	8,0	66,7	16,9
TOTAL		50	9	59
Fila %		84,7	15,3	100,0
Columna %		100,0	100,0	100,0

Se realizó la determinación de los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos comparando inicialmente TAS-ELISA versus IC-PCR y posteriormente IC-PCR versus TAS-ELISA; los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2. Análisis epidemiológico de comparación TAS-ELISA Versus IC-PCR.**

		TAS- ELISA		
		SI	NO	TOTAL
IC-PCR	SI	6	3	9
	NO	4	46	50
	TOTAL	10	49	59

Parámetros de evaluación de la prueba	%
Sensibilidad	60,000
Especificidad	93,878
Prevalencia Verdadera	16,949
Prevalencia Aparente	15,254
Valor Predictivo +	66,667
Valor Predictivo -	92,000

Como se observa en la tabla 2 se determinó para la técnica de IC-PCR una sensibilidad y especificidad de 60 % y 94 % respectivamente al compararla con la técnica diagnóstica de TAS-ELISA. La sensibilidad entendida como la propiedad que tiene una prueba diagnóstica de detectar a los individuos verdaderamente enfermos (portadores del virus) y la especificidad como la capacidad de detectar los verdaderamente sanos. Como se evidencia, la especificidad de la técnica IC-PCR es alta comparada con la sensibilidad, lo que indicaría la alta capacidad de la prueba que tiene de indicar los verdaderamente sanos de una población de muestras. En cuanto a los valores predictivos, los cuales indican el porcentaje de confianza indicado para la interpretación de los positivos y negativos encontrados; como se observa el valor predictivo negativo es alto indicando una alta confianza en la especificidad de la prueba. Al realizar la comparación de la IC-PCR Versus TAS-ELISA (Tabla 3) se encuentran valores muy similares a los anteriores los cuales pueden ser interpretados de una forma similar.

**Tabla 3. Análisis epidemiológico de comparación IC-PCR Versus TAS-ELISA.**

		IC-PCR		
		SI	NO	TOTAL
TAS-ELISA	SI	6	4	10
	NO	3	46	49
	TOTAL	9	50	59

Parámetros de evaluación de la prueba	%
Sensibilidad	66,667
Especificidad	92,000
Prevalencia Verdadera	15,254
Prevalencia Aparente	16,949
Valor Predictivo +	60,000
Valor Predictivo -	93,878

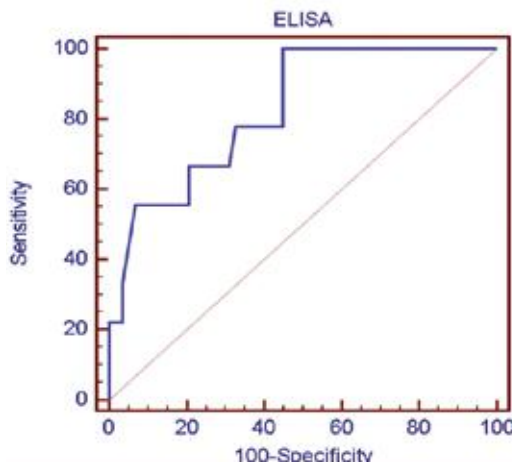
## Ajuste de Curvas ROC

Utilizando los valores de las absorbancias obtenidas mediante TAS-ELISA y como parámetro de clasificación de positivas o negativas los resultados de IC-PCR se ajustó una curva ROC determinando un área bajo la curva de 0,827 con un nivel de significancia menor que 0,05 como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de Curva ROC.

Área bajo la curva ROC (AUC)	0,827
Error Estándar	0,0690
Intervalo de Confianza 95%	0,715 a 0,908
Estadístico Z	4,736
Nivel de Significancia P (Área=0,5)	0,0001

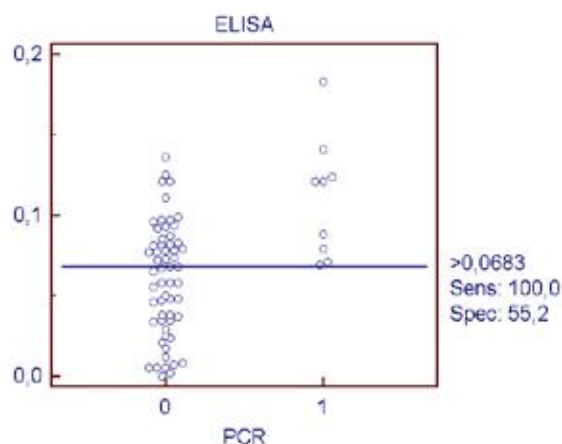
Como se observa en la gráfica 1 la sensibilidad de la prueba no es muy alta; entre más se acerque la línea azul hacia la parte superior izquierda mayor será ésta.



Gráfica 1. Curva ROC para el diagnóstico de BSV por TAS-ELISA.

En la grafica 2 se puede observar la distribución de las muestras evaluadas según su parámetro de clasificación por IC-PCR y sus valores de densidad óptica por TAS-ELISA. Como es notorio, existen muestras negativas por IC-PCR por encima del valor umbral utilizado inicialmente, razón por la cual los valores de sensibilidad y especificidad determinados inicialmente son más bajos. Para aumentar la sensibilidad de la prueba es necesario utilizar un punto de corte bajo de 0,0683 lo que es menor que el promedio de los valores negativos 0,09. Lo anterior conduciría a la ocurrencia de un alto número de falsos positivos pero aseguraría la inclusión de los verdaderamente positivos para su posterior confirmación por métodos más específicos.





Grafica 2. Distribución de muestras según el parámetro de clasificación.

## Validez del diagnóstico de Cucumber Mosaic Virus (CMV) por DAS-ELISA y RT-PCR

### Resultados compilados

En la tabla 5 se muestra la relación entre las muestras analizadas por DAS ELISA y RT-PCR. De un total de 31 muestras analizadas por ambas técnicas, 25 fueron negativas.

		RT-PCR BSV		
		0	1	TOTAL
DAS ELISA BSV	0	25	0	25
	Fila %	100,0	0,0	100,0
	Columna %	89,3	0,0	80,6
	1	3	3	6
	Fila %	50,0	50,0	100,0
	Columna %	10,7	100	19,4
TOTAL		28	3	31
Fila %		90,3	9,7	100,0
Columna %		100,0	100,0	100,0

Tabla 5. Tabla contingente de comparación de diagnósticos por RT-PCR y DAS-ELISA.

Se realizó la determinación de los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos comparando inicialmente DAS-ELISA versus RT-PCR y posteriormente RT-PCR versus DAS-ELISA; los resultados se muestran en las tablas 6 y 7.

**Tabla 6. Análisis epidemiológico de comparación DAS-ELISA Versus RT-PCR.**

		RT-PCR		
		SI	NO	TOTAL
DAS ELISA	SI	3	3	6
	NO	0	25	25
	TOTAL	3	28	31
	Parámetros de evaluación de la prueba		%	
Sensibilidad		66,667		
Especificidad		92,000		
Prevalencia Verdadera		15,254		
Prevalencia Aparente		16,949		
Valor Predictivo +		60,000		
Valor Predictivo -		93,878		

Como se observa en la tabla 6 la técnica de DAS-ELISA tiene una sensibilidad y especificidad de 66,6% y 92% respectivamente al compararla con la técnica diagnóstica de RT-PCR. Como se evidencia, la especificidad de la técnica DAS-ELISA es alta comparada con la sensibilidad lo que indicaría la alta capacidad que tiene de indicar los verdaderamente sanos de una población de muestras. En cuanto a los valores predictivos los cuales indican el porcentaje de confianza mostrado para la interpretación de los positivos y negativos encontrados; como se observa el valor predictivo negativo es alto indicando una alta confianza en la especificidad de la prueba. Al realizar la comparación de la RT-PCR Versus DAS-ELISA (Tabla 7) se encuentran valores muy similares a los anteriores los cuales pueden ser interpretados de una forma similar.

Tabla 7. Análisis epidemiológico de comparación RT-PCR Versus DAS-ELISA.

		DAS- ELISA		
		SI	NO	TOTAL
RT-PCR	SI	3	0	3
	NO	3	25	28
	TOTAL	6	25	31

Parámetros de evaluación de la prueba	%
Sensibilidad	50,000
Especificidad	100,000
Prevalencia Verdadera	19,355
Prevalencia Aparente	9,667
Valor Predictivo +	100,000
Valor Predictivo -	89,286

## Ajuste de Curvas ROC

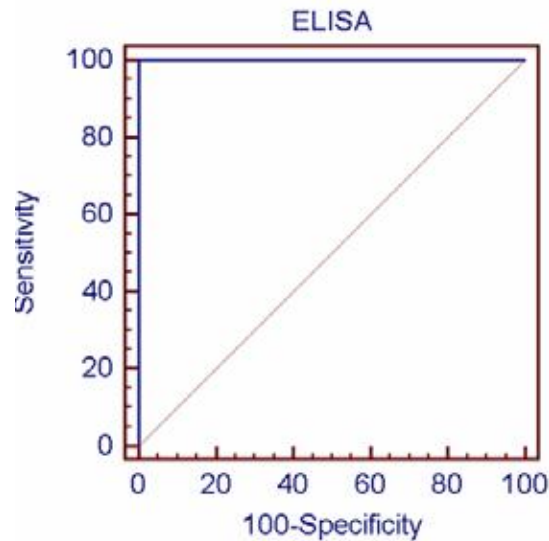
Utilizando los valores de las absorbancias obtenidas mediante DAS-ELISA y como parámetro de clasificación de positivas o negativas los resultados de RT-PCR se ajustaron a una curva ROC determinando un área bajo la curva de 1,000 con un nivel de significancia menor que 0,05 como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de Curva ROC.

Área bajo la curva ROC (AUC)	1,000
Error Estándar	0,000
Intervalo de Confianza 95%	0,955 a 1,000
Nivel de Significancia P (Área=0,5)	0,0000

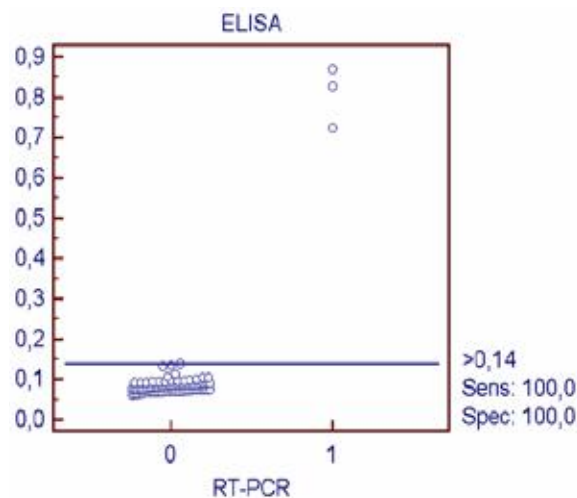
Como se observa en la grafica 4 la sensibilidad y especificidad de la prueba es muy alta; entre mas se acerque la línea azul hacia la parte superior izquierda mayor será esta.

Grafica 4. Curva ROC Para el diagnóstico de CMV por DAS-ELISA.



En la gráfica 5 se puede observar la distribución de las muestras evaluadas según su parámetro de clasificación por RT-PCR y sus valores de densidad óptica por DAS-ELISA. Para aumentar la sensibilidad de la prueba es necesario utilizar un punto de corte más alto que el utilizado; lo anterior conduciría a una alta sensibilidad y especificidad.

Grafica 5. Distribución de muestras según el parámetro de clasificación.



## Conclusiones

- La técnica de TAS ELISA para la detección de BSV, presenta un rango de dispersión entre los valores positivos y negativos muy bajos lo que dificulta la clasificación de los verdaderos positivos en contraste con la IC-PCR.
- Es posible utilizar la prueba de TAS ELISA para realizar el tamizaje de muestras por lotes e individual; utilizando un punto de corte bajo como se demostró con el análisis de curvas ROC. La detección de BSV mediante IC-PCR es adecuada para identificar los falsos positivos por ELISA. Se consigue una alta repetitividad de la técnica.
- Dado el costo de la prueba de IC PCR se consideran las dos técnicas usadas un buen complemento para el diagnóstico de rutina de BSV.
- Se puede asumir una prevalencia puntual baja para BSV y CMV, en las muestras recolectadas.
- La técnica de DAS ELISA probada se considera muy útil para el diagnóstico rutinario de CMV, dado que no se detectaron falsos positivos ni negativos, lo que genera unos valores predictivos altos.



## Capítulo 4

# *Detección de Banana Bract Mosaic Virus BBrMV (Virus del Mosaico de la Bráctea)*

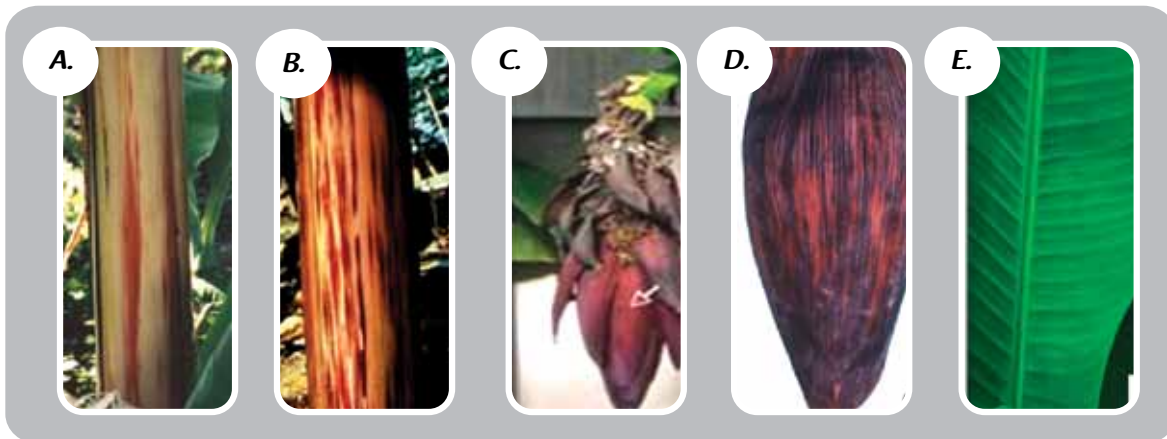
*Ida Bartolini Martínez, Arturo Olórtegui Livia, Ernesto Velit Tamanaja<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA. Av. La Molina N° 1915 (Lima-Perú). E-mail: ibartolini@senasa.gob.pe

### *Generalidades*

Las musáceas son atacadas por un gran número de patógenos que limitan su desarrollo y productividad; entre los patógenos más importantes que deben mantenerse bajo vigilancia y restricciones cuarentenarias se encuentra el banana bract mosaic virus (BBrMV) que ha causado daños severos en Asia. El Mosaico de las brácteas del banano es causado por un virus filamentosos que pertenece al grupo de los Potyvirus y que tiene partículas alargadas y flexuosas de 750 nm × 11 nm con una proteína de cubierta (CP) de 39 kDa.

Fue reconocido por primera vez en las Filipinas en 1979 por Magnaye, y más tarde registrado en la India, en Coimbatore y Bangalore, por Jones (1992). El nombre de la enfermedad se deriva de la decoloración y rayas cloróticas muy claras que se desarrollan en las brácteas del botón masculino. Los síntomas iniciales tienen la apariencia de rayas irregulares de color verdoso a café esparcidas a lo largo de los pecíolos. A medida que la enfermedad progresa, se presenta una decoloración similar, que se hace muy definida en las brácteas de la inflorescencia masculina, en el racimo y aún en los frutos. Un síntoma de diagnóstico característico lo constituyen las rayas ahusadas que se encuentran en el pseudotallo y que se observan después de retirar las hojas secas que lo cubren. La sintomatología del mosaico en las brácteas de flores masculinas es muy típica del BBrMV y es distinta a la ocasionada por algún otro virus conocido del banano. Los síntomas de la hoja, que consisten en lesiones en forma de huso y rayas paralelas a las venas, no siempre son evidentes, pero pueden expresarse en plantas jóvenes recientemente infectadas (Thomas et al. 1999) (ver Fig. 1)



**Fig 1. Sintomatología causada por el virus del mosaico de la bráctea del banano BBrMV. A y B: rayas ahusadas en el pseudotallo; C y D: decoloración en las brácteas de la inflorescencia masculina; E: rayas paralelas a las venas en las hojas. Fotos a, d y e tomadas de John E. Thomas (DPI&F), foto c tomada de Marie-Line Caruana (CIRAD) y foto b tomado de Lawrence Kenyon (University de Greenwich).**

## **Epidemiología**

El virus es transmitido en forma no persistente por diferentes especies de pulgones, incluidos *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis gossypii* y *Pentalonia nigronervosa*. Las infecciones también son perpetuadas por la propagación vegetativa de las plantas. La diseminación de la enfermedad indica que si bien los virus pueden moverse en virtud de sus mecanismos naturales de dispersión, el movimiento de germoplasma y el comercio constituyen la principal vía de transmisión.

Las medidas de control son similares a las de otras enfermedades causadas por virus. Requiere una detección temprana y la erradicación inmediata de las plantas enfermas. En el establecimiento de nuevas siembras se debe utilizar solo material libre de virus.

## **Diagnóstico serológico del virus BBrMV mediante DAS-ELISA (ADGEN Phytodiagnosics®)**

Las muestras colectadas fueron analizadas siguiendo las instrucciones de los protocolos contenidos en los kits de DAS-ELISA de ADGEN® para el Virus del Mosaico de la Bráctea del Banano (BBrMV).

## *Metodología*

1. Para sensibilizar la placa, diluir el anticuerpo de cobertura (PAb) en buffer de cobertura 1:1000 y agregar 100  $\mu$ L en los pocillos de la placa.
2. Incubar a 37 °C/4 horas en cámara húmeda.
3. Lavar la placa 3 veces con Buffer Fosfato Salino + Tween 20 (0.05 %) (PBST).
4. Macerar 1g de tejido vegetal en 10 mL de Buffer de Extracción General.
5. Aplicar 100  $\mu$ L de las muestras maceradas en cada pocillo de la placa, así como de los controles positivos, controles sanos y buffer de extracción puro por duplicado.
6. Incubar la placa en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche (mínimo 16 horas).
7. Lavar la placa 3 veces con PBST como se describe en el paso 3.
8. Diluir el anticuerpo en buffer de dilución Mab 1:100 y aplicar 100  $\mu$ L en cada pozo.
9. Incubar en cámara húmeda a 37 °C durante 2 horas.
10. Lavar la placa 3 veces con PBST como se describe en el paso 3.
11. Diluir el conjugado enzimático IgG-AP en buffer conjugado 1:1000 y aplicar 100  $\mu$ L en cada pozo.
12. Incubar a 37 °C por 1 hora en cámara húmeda.
13. Lavar la placa 4 veces con PBST como se describe en el paso 3. El lavado extra se incluye en esta etapa con el fin de asegurar que todo el conjugado no fijado sea removido de todos los pozos.
14. Preparar el sustrato justo antes de usarlo. Para ello, agregar dos tabletas de PNP de 5 mg c/u en 10 ml de buffer sustrato, por cada placa a procesar.
15. Agregar 100  $\mu$ L de sustrato preparado dentro de cada pozo.
16. Incubar la placa en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora (revisar frecuentemente si ocurre cambio de coloración en cada uno de los pozos). Alternativamente, detener la reacción utilizando 100  $\mu$ L de NaOH 3M por pozo.
17. Leer la absorbancia de cada una de las muestras utilizando un espectrofotómetro.

Una muestra es positiva cuando su valor de absorbancia es mayor que el valor promedio

de absorbancia del control sano más dos desviaciones estándar.

## *Resultados compilados*

Los resultados fueron muy bien definidos, tanto los controles sanos como positivos incluidos en el kit reaccionaron según lo esperado. Respecto a los análisis serológicos de las muestras correspondientes a las dos regiones bananeras, costa norte y selva central del Perú, éstos arrojaron resultados negativos para el BBrMV en estas zonas.

# *Diagnóstico molecular del Banana Bract Mosaic Virus (BBrMV) mediante PCR*

## *Metodología*

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con el kit de AXYGEN BIOSCIENCES®. Para la extracción de ácidos nucleicos de los controles positivos y negativos, se utilizó el material infectado incluido en los kits DAS-ELISA de ADGEN® y AGDIA®.

## *Protocolo de extracción de RNA a partir de tejido vegetal*

(Según indicaciones del Kit de extracción de la casa comercial AXYGEN BIOSCIENCES®).

Preparar los siguientes buffers:

Buffer W2: adicionar la cantidad de etanol absoluto especificada en la botella W2 y mezclar.

Buffer DV: adicionar al buffer DV 2 mL de buffer DV-A, 125 mL de isopropanol y 75 mL de isobutanol, mezclar bien y mantener el buffer DV a 4°C.

1. Macerar de 1 a 5 mg de de tejido foliar en nitrógeno líquido y transferirlo a un microtubo.
2. Agregar rápidamente 700  $\mu$ L del buffer G-A y mezclar por inversión durante 30 segundos.
3. Incubar a 65 °C durante 15 a 30 minutos en agitación a 2 rpm.
4. Colocar las muestras en hielo durante 3 a 5 minutos.
5. Agregar 400 $\mu$ L de Buffer G-B y un 1 ml de buffer DV (pre-enfriado a 4°C) en ese orden y mezclar vigorosamente.



6. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos y descartar la fase superior.
7. Agregar 1 mL de buffer DV pre-enfriado a 4°C a la fase inferior, agitar vigorosamente y centrifugar a 10.000 rpm por 2 min.
8. Descartar la fase superior y transferir la fase inferior a la columna spin-filter colocada en un tubo de 2 mL.
9. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto y descartar el spin-filter.
10. Adicionar 400µL de buffer DV al eluyente que queda en el tubo de 2 mL y mezclar vigorosamente por inversión.
11. Colocar la columna Miniprep en un tubo nuevo de 2 mL y transferir la solución de unión del paso anterior a la columna Miniprep colocada en el tubo de 2 mL.
12. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 min y descartar el filtrado.
13. Colocar nuevamente la columna en el mismo tubo y adicionar 500 µL de buffer W1 a la columna Miniprep.
14. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 min, descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente el mismo tubo de 2 mL.
15. Adicionar 700 µL de buffer W2 y centrifugar a 10000 rpm por 1 min. Repetir el lavado y descartar el filtrado del tubo de 2 mL.
16. Colocar la columna Miniprep en el mismo tubo de 2 mL y centrifugar a 10.000 rpm por 1 min.
17. Transferir la columna Miniprep a un tubo nuevo de 1.5 mL y agregar 100 µL de TE o agua de grado molecular en el centro de la membrana.
18. Dejar en reposo 1 minuto a temperatura ambiente
19. Eluir los ácidos nucleicos centrifugando a 10.000 rpm por 1 min.
20. Almacenar los ácidos nucleicos a -20 °C.

### *Desarrollo de la RT-PCR de Banana Bract Mosaic Virus (BBrMV)*

Entre los artículos examinados para revisar protocolos de PCR figuran Ishkra et al., 2008; Rodoni et al., 1999 y Marie-Jeanne et al., 2000 entre otros. Se seleccionaron los sets de iniciadores más idóneos para la detección del Virus (Tabla 1 y Tabla 2).



**Tabla 1. Iniciadores N1 y NR para detección de Banana Bract Mosaic Virus.**

Iniciador	Secuencia 5´ - 3´	Tamaño del Producto (bp)
Bract N1	GGR ACA TCA CCA AAT TTR AAT GG	280
Bract NR	GTG TGC YTC TCT AGC CCT GTT	

**Tabla 2. Iniciadores N2 y NR para detección de Banana Bract Mosaic Virus.**

Iniciador	Secuencia 5´ - 3´	Tamaño del Producto (bp)
Bract N2	ACA TGG AGT ATG ATG GAT AAGG	260
Bract NR	GTG TGC YTC TCT AGC CCT GTT	

### *Análisis de las características de los iniciadores seleccionados para síntesis*

Se evaluaron las características del oligonucleótido Bract N1, Bract NR y Bract N2, usando el software Oligo analizar 3.1 de la empresa IDT. <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, para obtener datos que servirían como referencia para la estandarización, resuspensión y selección de la temperatura de anillamiento de los iniciadores. Paralelamente usando el software Fast PCR, se observó que no hubo formación de dímeros o harpins entre ellos. La información que se obtuvo permitió concluir que los sets de iniciadores Bract N1/ Bract NR y Bract N2/ Bract NR fueron una buena opción para el diagnóstico del BBrMV.

### *Ensayos de la RT-PCR del BBrMV con los primers N1/NR y N2/NR*

- A.** RT-PCR CON DENATURACIÓN INICIAL A 65°C PREVIA A LA SINTESIS DE cDNA: Mezclar 8 µL de agua, 1 µL de iniciador NR y 1 µL de RNA de cada muestra, incluyendo control sano, positivo y agua. Denaturar a 65°C durante 5 minutos, enfriar en hielo y realizar la síntesis de cDNA y PCR.
- B.** RT-PCR CON DENATURACIÓN INICIAL A 95°C PREVIA A LA SINTESIS DE cDNA: Mezclar 8 µL de agua, 1 µL de iniciador NR y 1 µL de RNA de cada muestra, incluyendo control sano, positivo y agua. Denaturar a 95°C durante 5 minutos, enfriar en hielo y realizar la síntesis de cDNA y PCR.

- C.** RT-PCR DE UN SOLO PASO CON DENATURACIÓN INICIAL A 95°C:  
Mezclar 8  $\mu$ L de agua, 1  $\mu$ L de iniciador NR y 1  $\mu$ L de RNA de cada muestra, incluyendo control sano, positivo y agua. Denaturar a 95°C durante 5 minutos, enfriar en hielo y luego realizar la RT-PCR de un solo paso.

### *cDNA Síntesis*

Preparar la RT MIX y agregar 10  $\mu$ L a cada tubo del paso anterior que contiene la mezcla de RNA + iniciador NR denaturados. Incubar 10 min a temperatura ambiente y correr el programa 50 x 50 (50°C x 50 min), Tablas 3 y 4.

**Tabla 3. Primera mezcla de reactivos para la RT.**

Componente	Una (Rxn) Muestra
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L
5x PCR buffer	4 $\mu$ L
10 mM dNTPs	2 $\mu$ L
RNAsin 40 U/ $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
M-MLV 200 U/ $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1.5 $\mu$ L

**Tabla 4. Programa de termociclado 50x50.**

Programa 50x50
50°Cx50 min
95°Cx5 min
4°C

### *Amplificación*

Preparar la mezcla para PCR, repartir 20  $\mu$ L a cada tubo, luego agregar 5  $\mu$ L de cada cDNA y correr el programa BBrMV de 35 ciclos (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Mezcla de reactivos para la PCR.

Componente	Una (Rxn) Muestra
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.5 µL
5x PCR buffer	4 µL
Iniciador F 10 µM	0.5 µL
Iniciador R 10 µM	0.5 µL
Platinum Taq 5U/µL	0.2 µL
H <sub>2</sub> O	14.3 µL
TOTAL	20 µL

Tabla 6. Programa de termociclado para BBrMV.

Programa para BBrMV
94°Cx5 min
35 ciclos:
94°Cx1 min
57°Cx1 min
72°Cx30 seg
72°Cx5 min (extensión final)
4°C

### RT-PCR de un solo paso

Preparar la RT-PCR MIX, repartir 24 µL a los tubos de PCR, agregar 1 µL del RNA y correr el Programa BBrMV OneStep de 35 ciclos:

**Tabla 7. Mezcla de reactivos para la RT-PCR en un solo paso.**

Componente	Una (Rxn) Muestra
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µL
5x PCR buffer	2.5 µL
10 Mm dNTPs	0.5 µL
Iniciador N2 10 µM	0.5 µL
Iniciador NR 10 µM	0.5 µL
RNAsin 40U/µL	0.25 µL
M-MVL 200U/µL	0.25 µL
Platinum Taq 5U/µL	0.2 µL
H <sub>2</sub> O	18.3 µL
TOTAL	24 µL

**Tabla 8. Programa de termociclado para RT-PCR en un solo paso.**

Programa para RT-PCR 1 paso
50°Cx30 min
94°Cx15 min
35 ciclos:
94°Cx1 min
58°Cx1 min
72°Cx30 seg
72°Cx5 min (extensión final)
4°C

## **Resultados compilados**

Se corrieron las muestras amplificadas en un gel de agarosa al 1.5% en Buffer TBE 1 X a 100 V y 45 mA; posteriormente se colocó el gel en un bandeja que contenía Bromuro de Etidio (0.5 mg/L) y luego de 10 -15 minutos se visualizó en el transiluminador UV y se grabó la imagen en el Geldoc de BIORAD u otro equipo similar.

En la Fig. 2 se observó la amplificación correspondiente a la RT-PCR en dos pasos: la síntesis del cDNA seguido de la PCR. Cuando la denaturación inicial del RNA, previa a la síntesis del cDNA fue de 65°C se observó la presencia de bandas inespecíficas diferentes a la banda del control positivo (gel A). Este problema desapareció cuando se aumentó la temperatura de denaturación inicial a 95°C (gel B). Finalmente se ensayó la RT-PCR de un solo paso con denaturación inicial de 95°C y se logró obtener mejores resultados (ver Fig. 3), permitiendo contar con dos sets de iniciadores aptos para el diagnóstico molecular del BBrMV mediante RT-PCR tanto de dos pasos como de un solo paso.

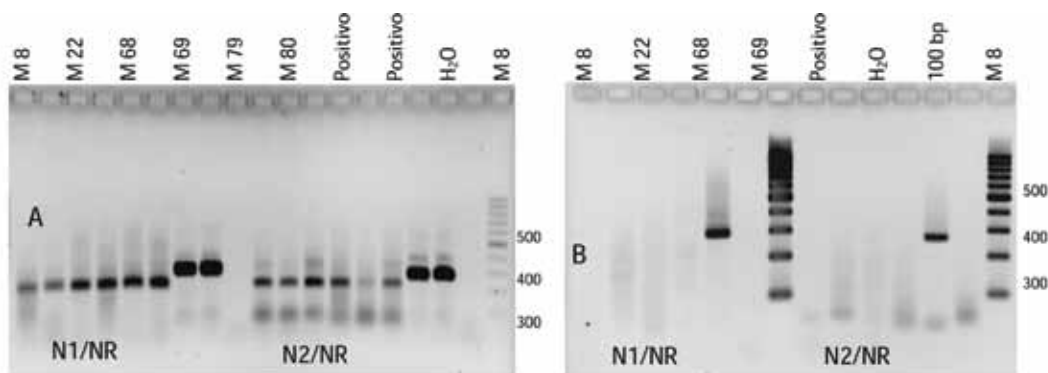


Fig 2. RT-PCR en dos pasos. A) Con denaturación de 65°C previa a la síntesis de cDNA y B) Con denaturación de 95°C previa a la síntesis de cDNA.

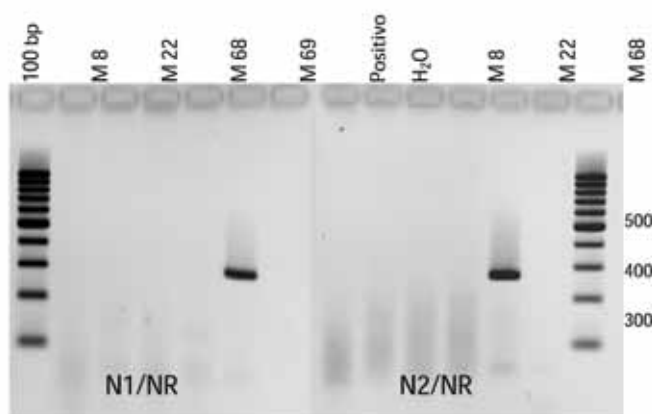


Fig 3. RT-PCR de un solo paso con denaturación inicial de 95°C previa a la síntesis de cDNA.



Los resultados del diagnóstico molecular mediante PCR convencional fueron negativos, las muestras analizadas no desarrollaron la amplificación de la banda correspondiente al control positivo de la técnica implementada. Las muestras de Perú provenientes de las zonas de la costa norte y de la selva y ceja de selva donde se realizó la prospección resultaron negativas al virus del BBrMV.

## *Diagnóstico del BBrMV mediante PCR en tiempo real*

### *Metodología*

#### *Diseño de iniciadores y sondas*

Para este fin se tomaron en cuenta el nivel de variación y procedencia de las secuencias publicadas y se seleccionó el siguiente grupo AF071582, AF071584, AF071585, AF071586, AF071587, AF071588, AF071589, AF071590, AY494979, AY529121, AY776327, AY953427, BBU88882, BBU88883, BBU88884 y BBU88885. Posteriormente fueron alineadas, se seleccionó el fragmento más representativo usando el programa Clustal X y se trabajó con Bioedit para la obtención de una secuencia consenso a partir de la cual usando el programa o paquete Primer Express de Applied Biosystem se diseñaron los iniciadores (resaltados en letras mayúsculas) y la sonda MGB ubicada dentro de la zona de los iniciadores (resaltada en letras minúsculas subrayadas).

Iniciadores y sonda diseñados para la detección del BBrMV con PCR en tiempo real;

BBrMV-SENASA-F	5'-GGGAGCAATATGATGCATGGT-3'
BBrMV-SENASA-R	5'-TGTTCTTCGTCCTCTATGGCATAAC-3'
BBrMV-SENASA-S	FAM-TGATGCTGTAAAACGTG-MGB

Posteriormente se evaluó in silico usando FAST PCR la efectividad de estos iniciadores dentro de las accesiones evaluadas encontrándose una gran capacidad de identificación, el producto de PCR correspondió a un producto de 64 pares de bases. Finalmente para la amplificación por PCR en Tiempo Real se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 9.

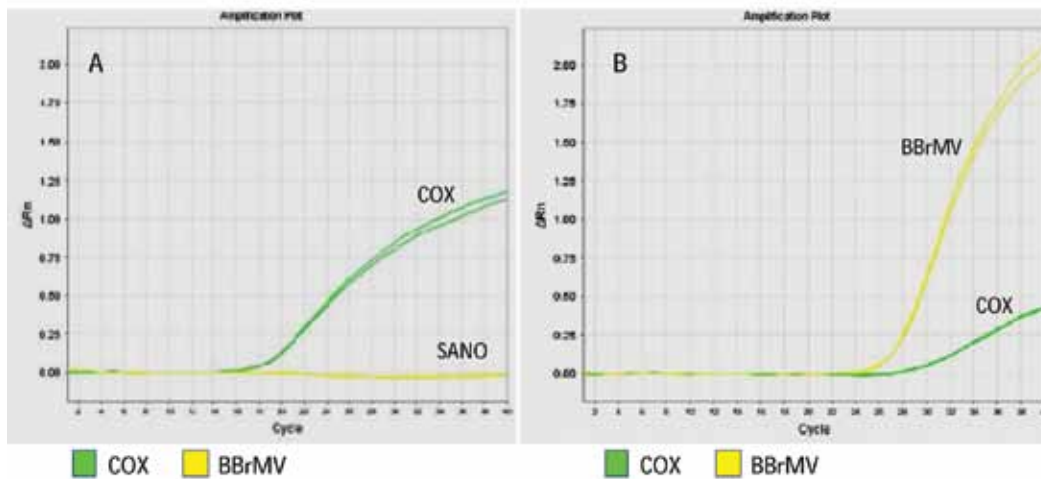
**Tabla 9. Mezcla de reactivos para la PCR en Tiempo Real.**

<b>Componente</b>	<b>Stock</b>	<b>Una (Rxn) Muestra</b>
Mezcla universal PCR	2x	8 µL
Iniciador B COX F	20 µM	0.72 µL
Iniciador B COX R	20 µM	0.72 µL
Sonda B COX	5 µM	0.64 µL
Iniciador BBrMV F	15 µM	0.96 µL
Iniciador BBrMV R	15 µM	0.96 µL
Sonda BBrMV	15 µM	0.64 µL
ROX	25 µM	0.32 µL
H2O grado molecular		1.44 µL
Muestra		1.6 µL
TOTAL		16 µL

## **Resultados compilados**

Los resultados se evaluaron utilizando el software del termociclador en Tiempo Real Step One plus de Applied Biosystems. Solo se consideraron resultados válidos todas aquellas muestras que exhiban la curva de amplificación del control interno de amplificación COX. Se consideraron sanas las muestras que mostraron solo la amplificación del control interno de amplificación COX (Fig.5A), mientras que se consideraron positivas aquellas muestras que mostraron la presencia de COX y la curva de amplificación del patógeno (Fig. 5B).

Fig 5. Detección del BBrMV mediante PCR en tiempo real. A) Control sano y B) control positivo. El control interno es la Citocromo Oxidasa (COX).



Las muestras en las que se observó la curva de amplificación para BBrMV dentro del rango de 15 a 36.5 Ct, se consideraron positivas. En el caso de que uno de los controles Sanos o Positivos no amplificara correctamente o si no se observara la amplificación del control interno en una muestra en estudio, el ensayo se tendrá que repetir. Los análisis de diagnóstico de BBrMV mediante PCR en tiempo real se validaron con los controles internos y se confirmaron con la presencia de controles sanos y positivos. Las muestras de plátano y banano colectadas en la costa norte y en la selva y ceja de selva fueron debidamente analizadas por duplicado y todas arrojaron resultados negativos. Esta información permite inferir que en las zonas donde se realizó la prospección no se registra la presencia del virus BBrMV.

## Conclusión

Se ensayaron las técnicas de DAS-ELISA, PCR convencional y PCR en tiempo real debidamente implementadas y validadas para la detección del Banana Bract Mosaic Virus. Las muestras colectadas en las zonas bananeras de la costa norte y selva central peruanas resultaron negativas al aplicar las tres metodologías desarrolladas en el presente trabajo y se puede afirmar que en esta prospección no se registró la presencia del BBrMV en Perú.

## Referencias

- Bateson, M. F., and Dale, J. L. 1995. Banana bract mosaic virus: Characterisation using potyvirus specific degenerate primers. *Arch. Virol.* 140:
- Iskra-Caruana M.L., Galzi S., Laboureau N., 2008. A reliable IC one-step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of Musa germplasm. *Journal of Virological Methods*, 153 : 223-231.
- Marie-Jeanne, V., loos, R., Peyre, J., Alliot, B. and Signoret, P. (2000). Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *J. Phytopathol.* 148, 141-151.
- Magnaye, L.V., Espino, R.R.C. Banana Bract Mosaic, a new disease of banana. I. Symptomatology, *Philippines Agr.* 73: 55-59.
- Marie-Jeanne, V., loos, R., Peyre, J., Alliot, B. and Signoret, P. 2000. Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. *J. Phytopathol.* 148, 141-151.
- Rodoni BC, Ahlawat YS, Varma A, Dale JL, Harding RM. 1997. Identification and characterization of banana bract mosaic virus in India. *Plant Disease* 81: 669-672.
- Rodoni BC, Dale JL, Harding RM. 1999. Characterization and expression of the coat protein-coding region of banana bract mosaic potyvirus, development of diagnostic assays and detection of the virus in banana plants from five countries in southeast Asia. *Archives of Virology* 144: 1725-1737.
- Sharman M, Gambley CF, Oloteo EO, Abgona RVJ, Thomas JE. 2000. First record of natural infection of abaca (*Musa textilis*) with banana bract mosaic potyvirus in the Philippines. *Australasian Plant Pathology* 29: 69.
- Thomas JE, Geering ADW, Gambley CF, Kessling AF, White M. 1997. Purification, properties, and diagnosis of banana bract mosaic potyvirus and its distinction from abaca mosaic potyvirus. *Phytopathology* 87: 698-705.
- Thomas JE, Iskra-Caruana ML, Magnaye LV, Jones D, R. 1999. Bract mosaic. In: Jones DR (ed) *Diseases of banana, abacá and enset*. CABI Publishing, Wallingford, Oxford, pp 253-256.
- Thomas, J.E., Magnaye, L.V., 1996. "Banana Bract Mosaic disease", *Musa Disease*. INIBAP, Montpellier, France

## Capítulo 5

# DetECCIÓN DE BANANA BUNCHY TOP VIRUS BBTV (VIRUS DEL COGOLLO RACIMOSO DEL BANANO)

Ida Bartolini Martínez, Arturo Amórtegui Livia, Ernesto Velit Tamancaja <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA. Av. La Molina N° 1915 (Lima-Perú). E-mail: ibartolini@senasa.gob.pe

### Generalidades

El nanovirus Banano Bunchy Top Virus (BBTV) conocido como el virus del cogollo racimoso del banano está considerado entre las 10 especies invasoras de mayor importancia y el más nocivo en musáceas. El BBTV pertenece al género Babuvirus de la familia nanoviridae, está conformado por partículas isométricas pequeñas de 18 a 20 nm y posee un genoma de ADN circular monocatenario (cssDNA) que consiste de seis componentes (Thomas et al., 1994; Burns TM, et al., 1994). Las especies y cultivares de musáceas *Musa spp.* son los hospederos naturales del BBTV (CABI, 2000; Dale, 1998; Diekmann y Putter, 1996).

Los síntomas de la enfermedad (Fig 1) son muy definidos y cambian muy poco de una variedad a otra. En casos avanzados las plantas infectadas muestran una apariencia de repollo, con hojas angostas, erectas, que le han dado el nombre de cogollo racimoso ó arrosetamiento del cogollo del banano ('bunchy top'). También se presentan rayas verdes en la vena principal y en el peciolo de las hojas, extendiéndose hacia abajo en el pseudotallo. Un síntoma más característico es la presencia de puntos y rayas de color verde oscuro a lo largo de las venas secundarias, que se observan mejor cuando se aprecian por el envés. Las plantas infectadas en estados tempranos de desarrollo permanecen enanas y no producen fruto. Hasta el momento los métodos de control de la enfermedad se realizan con la erradicación de las plantas enfermas y con el uso de material de siembra libre de virus. Las plantas infectadas en etapas iniciales del desarrollo, raramente producirán racimo, aunque en infecciones tardías podrían formar un racimo distorsionado. En infecciones muy tardías, el único síntoma que presenta son rayas de color verde oscuro en las puntas de las brácteas (CABI, 2000; Thomas et al., 1994; Stansbury et al., 2000; Ferreira et al., 1997).



## Epidemiología

El BBTV fue reconocido inicialmente en la isla de Fiji en 1890 y su naturaleza viral la estableció C.J.P. Magee en Australia en 1913, cuando demostró su transmisión en forma persistente por el áfido negro o pulgón del banano *Pentalonia nigronervosa* Coq, único medio reconocido de transmisión (Fig. 1B). Su distribución a grandes distancias se presenta por el movimiento de material vegetativo infectado tales como plántulas, cormos, hijuelos y plantas de cultivo de tejidos (plantas “in vitro”). Los estudios sobre las relaciones vector virus indican que se necesitan períodos largos de alimentación para adquisición del virus. Su diseminación a nivel internacional ha tenido lugar en los materiales de propagación (Wardlaw, 1961). El áfido vector se encuentra en forma agrupada alrededor de la hoja bandera y en la base de los pecíolos de hojas jóvenes. También se encuentran en la base del pseudotallo y en muchos tejidos de crecimiento. Estos áfidos aparecen durante todo el año pero están en mayor cantidad en época lluviosa.

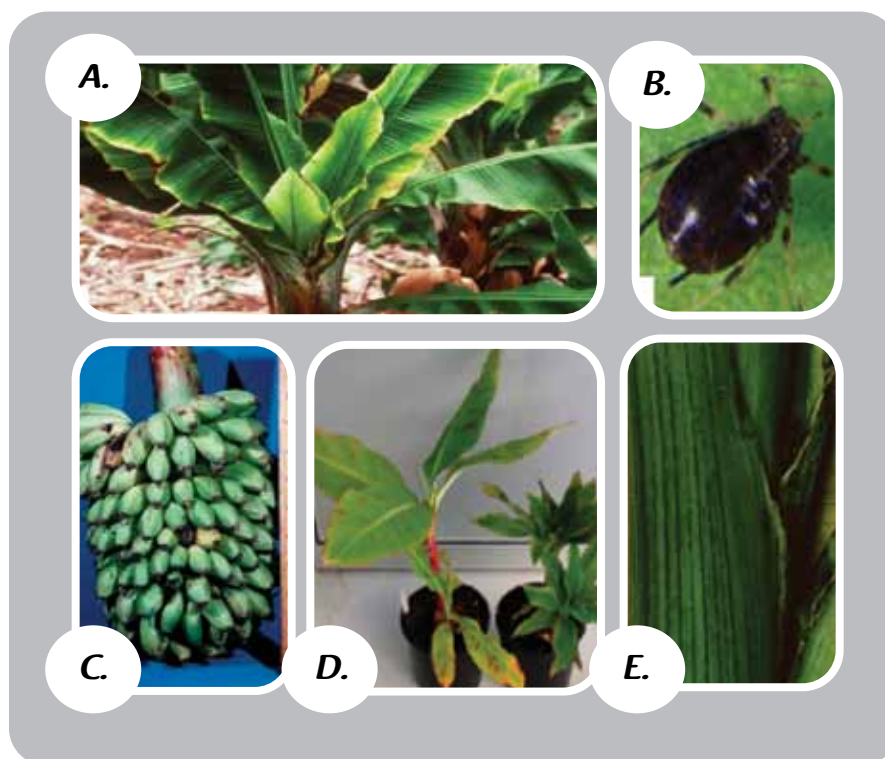


Figura 1. Síntomas y vector del BBTV. A) Planta con apariencia de repollo. B) Vector de transmisión *Pentalonia nigronervosa*. C) Arrosetamiento del racimo. D) Hojas angostas y erectas. E) Puntos y rayas de color verde oscuro a lo largo de las venas secundarias.

## Diagnóstico serológico de los virus BBTV mediante DAS-ELISA

Las muestras colectadas fueron analizadas siguiendo las instrucciones del protocolo contenido en el kit de DAS-ELISA de ADGEN® para el Virus del Cogollo Racimoso del Banano (BBTV).

### Metodología

1. Para sensibilizar la placa, diluir el anticuerpo de cobertura (PAb) en *buffer de cobertura* 1:1000 y agregar 100 µL en los pocillos de la placa.
2. Incubar a 37 °C/4 horas en cámara húmeda.
3. Lavar la placa 3 veces con Buffer Fosfato Salino + Tween 20 (0.05 %) (PBST).
4. Macerar 1g de tejido vegetal en 10 mL de Buffer de Extracción General.
5. Aplicar 100 µL de las muestras maceradas en cada pocillo de la placa, así como de los controles positivos, controles sanos y buffer de extracción puro por duplicado.
6. Incubar la placa en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche (mínimo 16 horas).
7. Lavar la placa 3 veces con PBST como se describe en el paso 3.
8. Diluir el anticuerpo en *buffer de dilución Mab* 1:100 y aplicar 100 µL en cada pozo.
9. Incubar en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora.
10. Lavar la placa 4 veces con PBST como se describe en el paso 3. El lavado extra se incluye en esta etapa con el fin de asegurar que todo el conjugado no fijado sea removido de todos los pozos.
11. Preparar el sustrato justo antes de usarlo. Para ello, agregue dos tabletas de PNP de 5 mg c/u en 10 mL de buffer sustrato, por cada placa a procesar.
12. Agregar 100 µL de sustrato preparado en cada pozo.
13. Incubar la placa en oscuridad a temperatura ambiente por 1 hora (revisar frecuentemente si ocurre cambio de coloración en cada uno de los pozos). Alternativamente, detener la reacción utilizando 100 µL de NaOH 3M por pozo.

14. Leer la absorbancia (420 nm), de cada una de las muestras. Una muestra es positiva cuando su absorbancia es mayor que el valor promedio del control sano más dos desviaciones estándar.

## *Resultados compilados*

Los ensayos fueron realizados satisfactoriamente según las indicaciones del kit y los controles sanos y positivos incluidos en el kit de DAS-ELISA reaccionaron según lo esperado. Los análisis de las muestras correspondientes a las dos regiones bananeras, costa norte y selva central Peruana arrojaron resultados negativos para el BBTv. Por lo tanto, no se registró la presencia de este virus en las zonas mencionadas, utilizando el diagnóstico inmunoenzimático.

## *Diagnóstico Molecular del Banana Bunchy Top Virus (BBTV)*

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con el kit de AXYGEN BIOSCIENCES®. Y como controles positivos se utilizaron los incluidos en los kits DAS-ELISA de ADGEN® y AGDIA®.

### *Protocolo de extracción de RNA a partir de tejido vegetal*

(Según indicaciones dadas por el Kit de extracción de la casa comercial AXYGEN BIOSCIENCES®).

Preparar los siguientes buffers:

Buffer W2: adicionar la cantidad de etanol absoluto especificada en la botella W2 y mezclar.

Buffer DV: adicionar al buffer DV, 2 ml de buffer DV-A, 125 ml de isopropanol y 75 ml de isobutanol, mezclar bien y mantener el buffer DV a 4°C.

1. Macerar de 1 a 5 mg de de tejido foliar en nitrógeno líquido y transferirlo a un microtubo de 1.5  $\mu$ L.
2. Agregar rápidamente 700  $\mu$ L del buffer G-A y mezclar por inversión durante 30 segundos.
3. Incubar a 65 °C durante 15 a 30 minutos en agitación a 2 rpm.
4. Colocar las muestras en hielo durante 3 a 5 minutos.

5. Agregar 400  $\mu$ L de Buffer G-B y un 1 mL de buffer DV (pre-enfriado a 4°C) en ese orden y mezclar vigorosamente.
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos y descartar la fase superior.
7. Agregar 1 mL de buffer DV pre-enfriado a 4°C a la fase inferior, agitar vigorosamente y centrifugar a 10.000 rpm por 2 min.
8. Descartar la fase superior y transferir la fase inferior a la columna spin-Filter colocada en un tubo de 2 mL.
9. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto y descartar el spin-filter.
10. Adicionar 400  $\mu$ L de buffer DV al eluyente que queda en el tubo de 2 mL y mezclar vigorosamente por inversión.
11. Colocar la columna Miniprep en un tubo nuevo de 2 mL y transferir la solución de unión del paso anterior a la columna Miniprep colocada en el tubo de 2mL.
12. Centrifugar a 10.000rpm por 1 min y descartar el filtrado.
13. Colocar nuevamente la columna en el mismo tubo y adicionar 500  $\mu$ L de buffer W1 a la columna Miniprep.
14. Centrifugar a 10.000rpm por 1 min, descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el mismo tubo de 2 mL.
15. Adicionar 700  $\mu$ L de buffer W2 y centrifugar a 10.000 rpm por 1 min. Repetir el lavado y descartar el filtrado del tubo de 2mL.
16. Colocar la columna Miniprep en el mismo tubo de 2 mL y centrifugar a 10.000 rpm por 1 min.
17. Transferir la columna Miniprep a un tubo nuevo de 1.5 mL y agregar 100  $\mu$ L de TE o agua de grado molecular en el centro de la membrana.
18. Dejar en reposo 1 minuto a temperatura ambiente
19. Eluir los ácidos nucleicos centrifugando a 10.000 rpm por 1 min.
20. Almacenar los ácidos nucleicos a -20 °C.

## Desarrollo de la PCR convencional de Banana Bunchy Top Virus (BBTV)

Se utilizaron tres pares de iniciadores Galal et al., 2007, Hazaa et al., 2006 y Thompsom et al., 1995 (Tabla 1). Los controles sanos y positivos se obtuvieron de ácidos nucleicos extraídos a partir de los controles de los Kits de DAS-ELISA de ADGEN y AGDIA. Se evaluaron las temperaturas de alineamiento en el termociclador de gradiente en rangos de 53.0°C-61.6°C y rangos modificados. Las condiciones de PCR se muestran en las tablas 2 y 3.

**Tabla 1. Iniciadores para la detección molecular de BBTV.**

Nombre Iniciador	Secuencia Iniciador (5' - 3')
BBT1 (Thompsom)	5'CTC GTC ATG TGC AAG GTT ATG TCG 3'
BBT2 (Thompsom)	5'GAA GTT CTC CAG CTA TTC ATC GCC 3'
BBHa-R (Hazaa)	5'GCT AGG TAT CCG AAG AAA TC 3'
BBHa-F (Hazaa)	5'TCA AAC ATG ATA TFT AAT TC 3'
BBG-P1: (Galal)	5'TAC AAG ACG CTA TGA CAA ATG TAC G 3'
BBG-P2: (Galal)	5'TTT CAT AGC CTG TTG TAT TTC GTT CCA 3'

**Tabla 2. Mezcla de reactivos para la PCR.**

Componente	Una (Rxn) Muestra
10x PCR buffer	2.5 µL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75 µL
10 mM dNTPs	0.5 µL
Iniciador BBT1 10 µM	0.5 µL
Iniciador BBT2 10 µM	0.5 µL
Platinum Taq 5U/µL	0.1 µL
H <sub>2</sub> O	18.2 µL
TOTAL	23 µL



Tabla 3. Programa de termociclado para BBTV.

Programa para BBrMV
94°Cx5 min
35 ciclos:
94°Cx1 min
55°Cx1 min
72°Cx1 min
72°Cx5 min (extensión)
4°C

## Resultados compilados

Los iniciadores de Galal y Thompson amplificaron satisfactoriamente (Fig. 2 A y B), a diferencia de los de Hazaa (Fig 2 C), donde no hubo amplificación. Se corrieron las muestras amplificadas en un gel de agarosa al 1.5% en Buffer TBE 1X a 100V y 45 mA; posteriormente se colocó el gel en un bandeja que contenía Bromuro de Etidio (0.5 mg/L) y luego de 10 -15 minutos se visualizó en el transiluminador UV y se grabó la imagen en el Geldoc de BIORAD u otro equipo similar (Fig. 3).

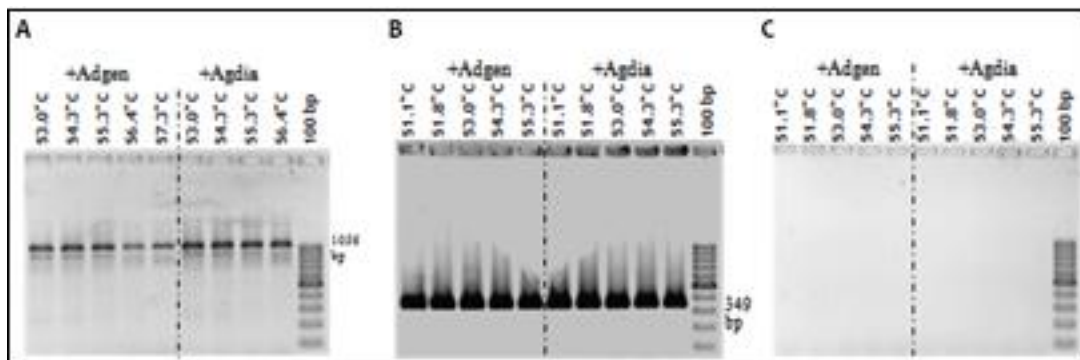
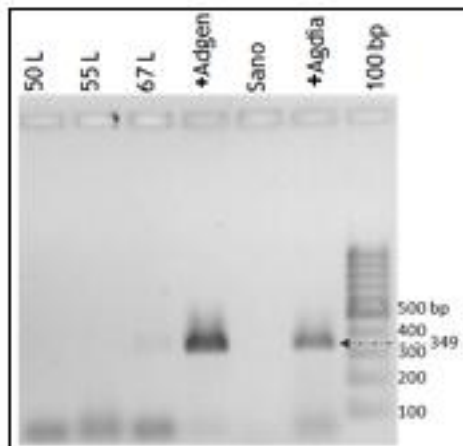


Fig 2. PCR convencional y gradientes de temperatura de alineamiento para los iniciadores descritos por: A) Galal et al., 2007. B) Thompson et al., 2000. C) Hazaa et al., 2006.



**Fig 3. Detección de BBTV mediante PCR convencional.**

En cuanto al análisis de los resultados electroforéticos de los ensayos del BBTV, se observó que en el caso de los análisis con las 296 muestras colectadas en las regiones de la selva peruana no se apreció la banda equivalente al control positivo lo cual indicó que no hay presencia del virus en el grupo de las muestras colectadas en esta zona. En el caso de las 209 muestras obtenidas en la costa norte se encontraron 6 muestras que amplificaron la banda equivalente al control positivo, específicamente en la zona de Lambayeque.

Sin embargo para poder afirmar que los datos encontrados respecto a las bandas de las muestras positivas ciertamente correspondían al BBTV es necesario realizar varias pruebas que permitan confirmar esta información. Se puede recurrir a varias alternativas como realizar un nuevo estudio de prospección, utilizar métodos clásicos de bioensayo (aislamiento del virus de las muestras, reinoculación en banano y plantas hospederas para verificar la multiplicación del virus y la sintomatología) y métodos moleculares como la amplificación de otras regiones del genoma viral y su secuenciamiento.

## *Detección de BBTV mediante PCR en tiempo real*

### *Metodología*

#### *Diseño de iniciadores y sonda para PCR en Tiempo Real (Componente DNA-R)*

Se evaluaron las secuencias de los componentes involucrados en la replicación (DNA-R), la infección, desarrollo de la cápside, el movimiento de proteínas y el de las proteínas que se unen al retinoblastoma (DNA-C) involucradas en el ciclo celular del hospedero y se seleccionaron el (DNA-R) y el (DNA-C) debido a que contienen sectores conservados entre las accesiones evaluadas que permitían el anclaje de los iniciadores y sondas.

Las secuencias evaluadas para la generación de la sonda e iniciadores para el componente (DNA-R) fueron: GQ374514.1, EU531473.1, FJ605506.1, FJ463042.1, FJ009240.1, AB252641.1, AB252640.1, EU366169.1, AM418539.1, AM418538.1, AM418537.1, AM418536.1, AM418535.1, AM418534.1, EF584545.1, EF095162.1, EF095161.1, DQ656119.1, DQ640742.1, AB108458.1, AB108456.1, AB108453.1, AF416470.1, AF416469.1, AF416468.1, AF416467.1, AF416466.1, AF238875.1, AF238874.1 y AY845437.1.

Luego de realizar el alineamiento múltiple y analizar las secuencias con el programa BIOEDIT, se procedió a obtener la una secuencia consenso, la cual posteriormente fue la base para el diseño de los iniciadores y sonda.

Los iniciadores y sonda diseñados fueron:

QPCR BBTV-SEN F:	5'-GCGCACACCTTGAGAAACG-3'
QPCR BBTV-SEN R:	5'-CACCAAACCTCGAAGGGACCTT-3'
S-BBTV-DNA-R- SEN:	FAM- ATGAAGGAAGATACAAGAAT-MGB

La PCR in silico con el software FAST PCR obtuvo un amplicón de 95 pares de bases, y según el programa del NCBI-BLAST se confirmó que es específico para el virus BBTV.

## Diseño de iniciadores y sonda para PCR en Tiempo Real (componente DNA-C)

Las accesiones seleccionadas del NCBI para este fin fueron: EU292095.1, EU292086.1, EU292092.1, EU292093.1, EU292097.1, EU292099.1, EU292102.1, EU292103.1, EU292104.1, EU292108.1, EU292110.1, EU292111.1, EU292112.1 y EU292113.1. Se realizó el alineamiento múltiple usando el programa Clustal X.

Utilizando la secuencia consenso y el programa primer Express de Applied Biosystem se diseñaron los siguientes iniciadores y sonda:

BBTV-NC-DNA-C- SEN F: 5'-GCCGAAGGCCCGTTTAAAT-3'  
 BBTB-NC-DNA-C- SEN R: 5'-CCATTGTTCTGCTTACTTTTTTGTG-3'  
 S-BBTB-NC-DNA-C- SEN: FAM-TGTGTTGGACGAAGTC-MGB

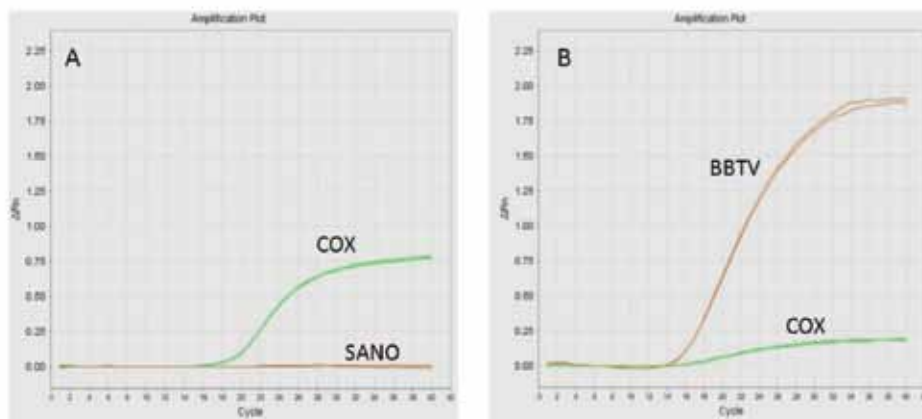
La PCR in silico con el programa FAST PCR, arrojó un aplicón de 65 pares de bases que fue evaluado con el programa de la NCBI-BLAST. Finalmente para la amplificación por PCR en Tiempo Real se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 4.

**Tabla 4. Mezcla de reactivos para la PCR en Tiempo Real.**

Componente	Stock	Una (Rxn) Muestra
Mezcla universal PCR	2x	8 µL
Iniciador B COX F	20 µM	0.72 µL
Iniciador B COX R	20 µM	0.72 µL
Sonda B COX	5 µM	0.64 µL
Iniciador BBTB F	15 µM	0.96 µL
Iniciador BBTB R	15 µM	0.96 µL
Sonda BBTB	15 µM	0.64 µL
ROX	25 µM	0.32 µL
H2O grado molecular		1.44 µL
Muestra		1.6 µL
TOTAL		16 µL

## *Resultados compilados*

Los resultados se observaron utilizando el programa del termociclador en Tiempo Real Step One plus de Applied Biosystems. Solo se consideraron como resultados válidos todas aquellas muestras que exhibían la curva de amplificación del Control interno de amplificación COX. Se consideraron sanas las muestras que exhibían únicamente la amplificación del control interno de amplificación COX (Figura 5A), mientras que se consideraron positivas aquellas muestras que muestren la amplificación de COX y la curva de amplificación del patógeno (Figura 5B).



**Fig. 5. Detección del BBTV mediante PCR en Tiempo Real. A) Control sano y B) Control positivo. Como control interno se utilizó el gen del Citocromo oxidasa (COX).**

Las muestras en las que se observó la curva de amplificación para BBTV dentro del rango de 15 a 36.5 Ct, se consideraron positivas. En el caso de que uno de los controles Sanos o Positivos no amplifique correctamente o si no se observa la amplificación del control interno en una muestra en estudio, el ensayo debe repetirse. Las muestras analizadas, correspondientes a las colectadas en la costa norte y en la selva y ceja de selva dieron un resultado similar al encontrado con la PCR convencional.

En el caso de las 296 muestras colectadas en las regiones de la selva peruana no se registró amplificación lo cual indicó que no hay presencia del virus en el grupo de las muestras colectadas en esta zona. En el caso de las 209 muestras provenientes de la costa norte se confirmaron las amplificaciones de las muestras de la zona de Lambayeque.



## Referencias

- Burns TM, Harding RM, Dale JL, 1994. Evidence that banana bunchy top virus has a multiple component genome. *Archives of Virology* 137: 371-380.
- CABI. 2000. Banana Bunchy Top Virus. *Crop Protection Compendium. Global Module. 2nd. Edition.* CAB International. UK.
- Dale, J.L. 1998. Banana Bunchy Top. *Banana Diseases Caused by Virus.* En: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G., Ohr, H.D. (eds.). 1998. *Compendium of Tropical Diseases.* The American Phytopathological Society. APS Press. USA
- Diekmann, M. & Putter, C.A.J. 1996. *Musa spp. Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm.* FAO/IPGRI. N°15. *Musa 2nd edition.* FAO. Rome/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Ferreira, A., Trujillo, E.E., Ogata, Y. 1997. Banana Bunchy Top Virus. *Plant Disease Dec. 1997.* PD-12. Cooperative Extension Service. University of Hawaii at Manoa.
- Galal A.M., 2007. Use of polymerase chain reaction for detecting Banana Bunchy Top Nanovirus. *Biotechnology* 6(1): 53-56.
- Hazaa. M.M, El-DougDoug Kh.A. and El-MaatyHazaa Sabah Abo. 2006. Eradication of Banana Viruses from Naturally Infected Banana Plants 2. Production of Certified Banana Plants and Virus Tested. *Journal of Applied Sciences Research*, 2(10): 714-722.
- Rodoni, B.C., Ahlawat, Y.S., Varma, A., Dale, J.L. and Gardin, R.M. 1997. Identification and characterization of banana bract mosaic virus in India. *Plant Dis.* 81:669-672.
- Stansbury, C., McKirdy, S., Hortguard, G.P. 2000. Banana Bunchy Top Virus. Exotic threat to Western Australia. *Fact sheet N°13/2000.* Agriculture Western Australia.
- Thomson Darelle and Dietzgen Ralf G. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods* 54: 85-95
- Thomas, J.E., Iskra-Caruana, M.L., Jones, D.R. 1994. Banana Bunchy Top Disease. *Musa Disease Fact Sheet N°4.* INIBAP. France.
- Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling A.F. and White, A. 1997. Purification, Properties, and Diagnosis of Banana Bract Mosaic Potyvirus and Its distinction from Abaca Mosaic Potyvirus. *Phytopathology* 87:698-705.

## Capítulo 6

# DetECCIÓN DE Abaca Mosaic AbaMV (Virus del Mosaico del Abacá)

Carlos Alvarado Aliaga, Elizabeth Dávila, Jorge Luis Benavides Ranilla, Ciro Barrera Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA. Av. La Molina N° 1981 (Lima-Perú). E-mail: jbenavides@inia.gob.pe.

### Generalidades

El virus del Mosaico del Abacá (AbaMV) es un potyvirus (Ganbley, 2004), las partículas en forma de barra flexible miden alrededor de 680 nm. La enfermedad afecta el rendimiento en fibras, así como la calidad de la fibra siendo una limitación importante en la producción de abacá en las Filipinas. Las hojas presentan manchas de color verde amarillento brillante, en pecíolos y nervaduras centrales manchas oscuras con rayas verdes y amarillentas (fig. 1 A y B) *Musa textilis*, es nativa de Filipinas y su fibra es conocida en todo el mundo como el cáñamo de Manila. La fibra se obtiene de las vainas de las hojas de la planta de abacá, que es similar a la del plátano en su apariencia. En la actualidad, sólo hay dos países en la producción comercial de fibra de abacá, Filipinas y Ecuador. Las variedades de abacá en Ecuador originalmente provenían de la Filipinas, en particular de Mindanao. La fibra de abacá es considerada la más fuerte entre las fibras naturales y se utiliza como materia prima para cordeles y pulpa para la producción de productos de papeles especiales, como documentos de seguridad, bolsas para el té, papel para cigarrillos, cajas para carne y embutidos y otros papeles de impresión fina.

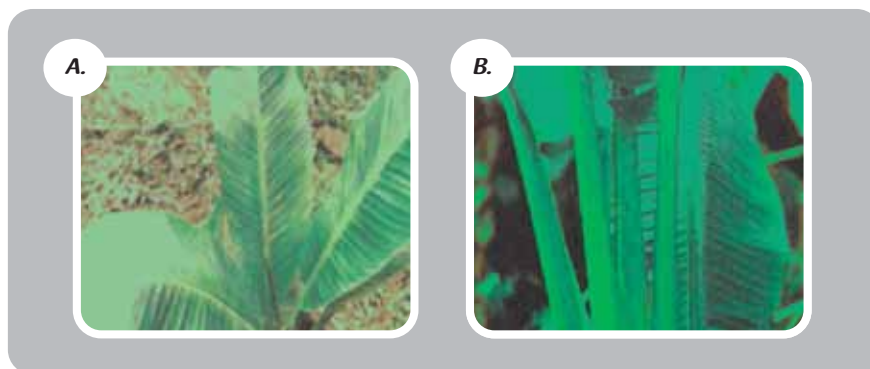


Figura 1. Posible sintomatología asociada con AbaMV.

## Antecedentes sobre detección y epidemiología

El virus del mosaico de abacá (AbaMV) se relaciona con los miembros del virus del mosaico de la caña de azúcar subgrupo del género Potyvirus. Resultó ser más similar al virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) y distintos de los virus del mosaico de alepo (JGMV), el virus del mosaico del enanismo del maíz (MDMV), y el virus del mosaico del sorgo (SrMV). Cladogramas de la región terminal 3' (núcleo de la proteína de cubierta y la región 3' no traducida) mostró que AbaMV se agrupó con SCMV, y que fue un clado distinto y separado de JGMV, MDMV y SrMV. La región N-terminal de la proteína de la cubierta AbaMV tenía un único motivo de aminoácido repetido diferente a los publicados anteriormente para otras cepas de SCMV. La primera transmisión experimental de AbaMV de abacá (*Musa textilis*) de banano (*Musa sp.*), fue utilizando los vectores de pulgones *Rhopalosiphum maidis* y *Aphis gossypii*.

## Detección molecular de Abaca Mosaic Virus (AbaMV) mediante RT-PCR

Como no se cuenta con un kit comercial para la detección de este virus, se solicitó el control positivo del virus (hojas liofilizadas infectadas) y suero policlonal de conejo, que fueron proporcionados por el Dr. John Thomas del Ministerio de Agricultura de Australia, con el fin de implementar un método de detección del virus AbaMV en el laboratorio del Instituto Nacional De Innovación Agraria-INIA, Perú. Al hacer la extracción de proteínas para las pruebas serológicas se obtuvo un macerado oscuro (fenolizado) y al hacer las lecturas en el espectro, las concentraciones de proteínas fueron demasiado bajas. Así mismo al hacer la extracción de RNA genómico a partir de estas hojas liofilizadas no se obtuvieron resultados positivos.

### Metodología

Se utilizaron dos protocolos para la extracción de ARN

#### 1. Extracción de ARN de tejido vegetal utilizando reactivo Qiazol sin Nitrógeno Líquido

##### Homogenización

1. Pesar 100 mg de tejido vegetal. Utilizar un sacabocado de 1 cm de diámetro. Pesar 12 círculos de hoja que pesen aprox. 100mg.

2. Colocar el tejido en una bolsa de molida 100 mg de la muestra y triturar las muestras con un tubo de ensayo.
3. Añadir 1 ml del reactivo Qiazol y moler vigorosamente con un tubo de ensayo. Transferir el molido a un tubo de 1.5 mL.

Transferir el molido a un tubo de 1.5 mL.

- Homogenizar 2 veces la mezcla por 15 segundos a velocidad media y por 20 segundos a máxima velocidad con el vortex.
  - Centrifugar a 4°C por 20 minutos a 5.000 rpm.
4. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL.

*Nota: el volumen del tejido no debe exceder el 10% del volumen de Qiazol usado.*

### ***Separación***

- Incubar a T ° ambiente por 5 minutos (entre 15 °C-30°C).
- Adicionar 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de Qiazol®.
- Agitar vigorosamente (sin vortex) por 20 segundos e incubar a T ° ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

### ***Precipitación y lavado***

- Adicionar 0.5 mL de Isopropanol por 1 mL de Qiazol®.
- Agitar por 15 segundos e incubar a T ° ambiente por 10 minutos. (Para mayor producción, precipitar por toda la noche a -20° C.)
- Centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C.
- Lavar el botón con 1 mL de etanol a 70 % por 1 mL de Qiazol®. Agitar con vortex a baja velocidad por 10 segundos.
- Centrifugar a 5.000 rpm por 7.5 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el botón.

- Secar el botón a temperatura ambiente por 10 minutos. No secar completamente.
- Resuspender el pellet en 50- 100  $\mu$ L de agua DEPC.

## **2. Extracción de ARN de tejido vegetal utilizando RNAeasy QIAGEN®**

1. Pesar 100 mg de Tejido vegetal. Utilizar un sacabocado de 1 cm de diámetro. (Pesar 12 círculos de hoja aprox. 100mg.)
2. Colocar el tejido en una bolsa de molida 100 mg, y proceder a triturar las muestras con un tubo de ensayo.
3. Añadir 650  $\mu$ L Buffer RLT mas 6.5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) (10  $\mu$ L  $\beta$ -ME RLT por 1 mL de Buffer) al triturado y moler vigorosamente con un tubo de ensayo.
4. Transferir el molido a un tubo de 1.5 mL y llevar al vortex por 15 seg agitar vigorosamente de forma manual y luego dar vortex por 20 seg.
5. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a una columna de giro QIAshredder en un tubo de colección de 2 mL, y centrifugar durante 2 min a velocidad máxima (14.000 rpm). Utilizar únicamente este sobrenadante en posteriores pasos.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante del flujo a través de un tubo de microcentrífuga nuevo (no suministrado).
8. Añadir 0,5 volúmenes de etanol (96-100% Aprox. 250  $\mu$ L) al lisado, y pipetear inmediatamente. No centrifugar. Proceda inmediatamente al paso 6.
9. Transferir la muestra (generalmente 650  $\mu$ L), incluyendo cualquier precipitado que pueda tener, a una columna de giro RNeasy colocada en un tubo de recogida de 2 ml (incluido).
10. Añadir 700  $\mu$ L de buffer RW1 a la columna de giro RNeasy. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 15 segundos a 8.000 gravedades para lavar la columna. Reutilizar el tubo de recolección.
11. Añadir 500  $\mu$ L del tampón RPE a la columna de giro RNeasy. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 2 min a 8.000 gravedades para lavar la columna.



12. Opcional: Colocar la columna spin RNeasy en un nuevo tubo colector 2 mL (incluido).  
Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar a toda velocidad por 1 min.
13. Colocar la columna spin RNeasy en un nuevo tubo de 1,5 mL de recogida (suministrado).  
Añadir 30 - 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna.  
Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 1 min a 8.000 gravedades para eluir el ARN.

### *RT-PCR y Nested PCR para la detección de AbaMV*

El análisis de este virus se baso en las publicaciones: "Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers" (Simon A. Langeveld & col., 1991) y "Abaca mosaic virus: a distinct strain Sugarcane mosaic virus" (Ganbley, C, J. Thomas, L. Magnaye and L. Herradura). Quienes diseñaron los iniciadores específicos degenerados para RT-PCR de zonas conservadas.

La amplificación del RT-PCR para Abacá se realizó de acuerdo a las condiciones del Kit One Step RT-PCR de QIAGEN®.

Las parejas de iniciadores degenerados que se utilizaron fueron:

Primer F U341      5'-CCGGAATTCATGRTITGGTGYATIGAIAYGG-3'  
Primer R D341      5'-CGCGGATCCGCIGYYTTCATYTGIRIWKIGC-3'

Las condiciones para RT-PCR utilizadas se muestran en Tabla 1, para un volumen final de 50  $\mu$ L/reacción, y el programa de amplificación para RT-PCR se muestra en la tabla 2.

**Tabla 1. Mezcla de reactivos para la RT-PCR en un solo paso.**

Componente	Volumen
Agua libre de RNAasa	30 $\mu$ L
5X QIAGEN PCR Buffer	10 $\mu$ L
dNTP Mix (contiene 10 mM de cada dNTP)	2 $\mu$ L
Primer F (U341) 1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer R (D341) 1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
OneStep Qiagen RT-PCR Mix enzima	2 $\mu$ L
ARN Molde	4 $\mu$ L
Volumen final	50 $\mu$ L

**Tabla 2. Programa de termociclado para RT-PCR en un solo paso.**

Programa para RT-PCR 1 paso
50°Cx30 min
94°Cx15 min
35 ciclos:
94°Cx1 min
45°Cx1 min
72°Cx1 min
72°Cx10 min (extensión final)
4°C

Condiciones para Nested PCR mostradas en las tablas 3 y 4 utilizando la pareja de iniciadores U341 y D341

**Tabla 3. Mezcla de reactivos para la Nested-PCR.**

Componente	Volumen
Agua libre de RNAasa	15 µL
Hot Star Master Mix	25 µL
Primer F (U341) 1 µM	1 µL
Primer R (D341) 1 µM	1 µL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL
cDNA	4 µL
Volumen total	50 µL

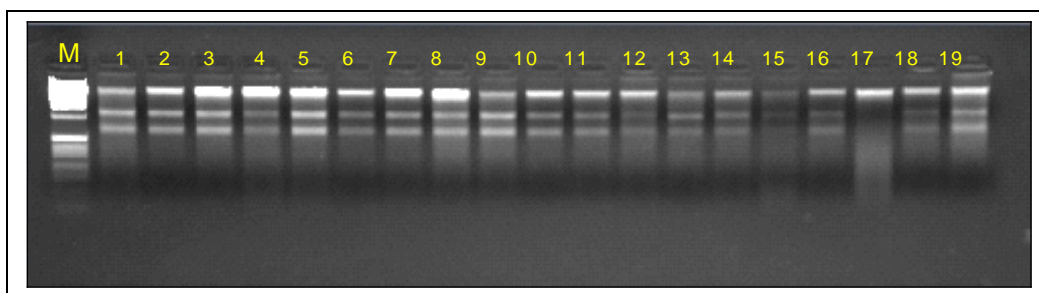
**Tabla 4. Programa de termociclado para Nested-PCR.**

Programa para Nested-PCR
94°Cx3 min
30 ciclos:
95°Cx1 min
42°Cx1 min
72°Cx1 min
72°Cx10 min (extensión final)
4°C

## *Resultados compilados*

Se realizaron 5 colectas, incluyendo las regiones de Piura, Tarapoto, Pucallpa, Iquitos y Tumbes. Se colectaron de cada región 300 muestras para un total de 1500 muestras en las cinco regiones.

Las primeras 100 extracciones (Piura 50 muestras y Tarapoto 50 muestras) fueron extraídas utilizando el reactivo de Qiazol® (Ver protocolo adjunto), pero hubo problemas ya que no todas las extracciones fueron satisfactorias. Posteriormente, se realizaron las extracciones utilizando el Kit de extracción de RNA con el reactivo de RNeasy Plant Mini Kit®, y se completaron las extracciones faltantes de Región Piura y Región Tarapoto. Los resultados obtenidos se compararon con la anterior metodología, obteniendo resultados muy satisfactorios en cuanto a calidad de RNA (Figura 1). Se han realizado un total de 500 extracciones de ARN de las regiones de Piura, Tarapoto, Iquitos, Pucallpa y Tumbes (100 por región).



**Figura 1** *Calidad de la extracción de ARN Protocolo de Qiagen (RNeasy Plant Mini Kit®). Región Tumbes.*

Se implementó en el INIA de Perú una extracción de ARN Para la detección del virus de Mosaico de Abacá (AbaMV) mediante RT-PCR y Nested-PCR, no hubo amplificación en ninguna de las muestras analizadas.

## *Referencias*

- C. F. Gambley and J. E. Thomas. 2001. Molecular characterisation of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Arch Virol* 146: 1369–1379.
- Pierre-Yves Teycheney, A. Marais, L. Svanella-Dumas, M. J. Dulucq, and T. Candresse (2005) Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the Flexiviridae family. *Arch Virol*. 150: 1715–1727.
- Pierre-Yves Teycheney, Isabelle Acina, Benham E.L. Lockhart, Thierry Candresse. 2007. Detection of Banana mild mosaic virus and Banana virus X by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR) *Journal of Virological Methods* 142 41–49.
- Simon A. Langeveld, Jean-Michel Dore, Johan Memelink, Antonius F. L. M. Derks, Cornelia I. M. van der Vlugt, Cees J. Asjes and John F. Bol. 1991., Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology*. 72, 1531-1541.
- Workshop on the detection of viral diseases of banana and plantain taller técnico sobre detección de enfermedades virales en banano y platano. Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement – CIRAD. 2006. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

## Capítulo 7

# *Detección de Banana Mild Mosaic Virus BanMMV (Virus del Mosaico Leve del Banano)*

*Carlos Alvarado Aliaga, Elizabeth Dávila, Jorge Luis Benavides Ranilla, Ciro Barrera Rojas<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Investigadores proyecto. Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA. Av. La Molina N° 1981 (Lima-Perú). E-mail: jbenavides@inia.gob.pe.

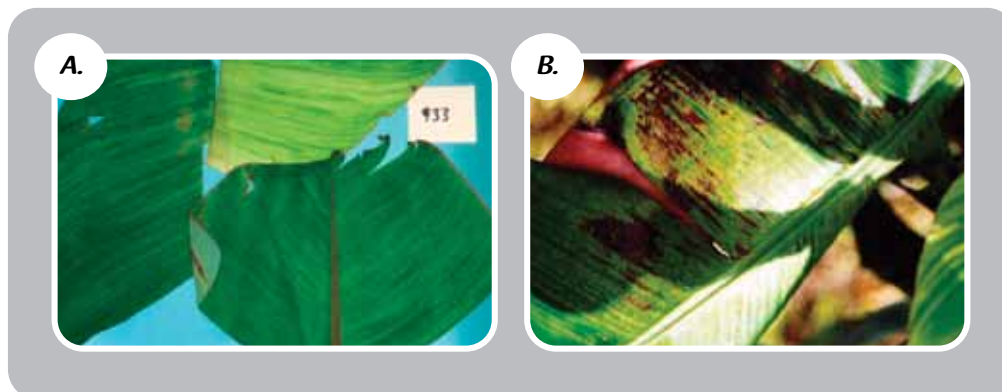
### *Generalidades*

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) son cultivos alimenticios importantes en toda la zona tropical y las áreas sub-tropicales del mundo. La cosecha es de multiplicación vegetativa y es esencial que el material de siembra esté libre de virus tanto para el control de enfermedades como para la distribución de germoplasma utilizados en los programas de mejoramiento y de evaluación.

Recientemente, viriones filamentosos previamente no reconocidos se han observado durante la indexación de germoplasma de *Musa* y en plantas de campo. El nombre del virus mosaico leve de Banano (o en inglés Banana Mild Mosaic Virus, BanMMV) fue propuesto para este nuevo virus. El virus BanMMV no está asociado a ninguna enfermedad. Por lo general, provoca síntomas, en algunos casos, presentan finas líneas blancas o plateadas que pueden observarse por la transparencia hacia una fuente de luz en la última hoja antes de la maduración (Figura 1A).

Este virus tiene la distinción de aparecer en la co-infección con otros virus de banano, por ejemplo el virus del mosaico del pepino-CMV (Cucumber Mosaic Virus), potyvirus del mosaico de las brácteas del banano-BBrMV (Banana Bract Mosaic Virus) y del rayado del banano-BSV (Banana Streak Virus). En estos casos, hay una mayor severidad de la enfermedad (caso del BSV y CMV) con la aparición de un síntoma adicional de la necrosis en el caso del CMV (Figura 1B).





**Figura 1. A) Sintomatología asociada con BanMMV en hojas de un cultivar susceptible. B) Lesiones necróticas en hojas con infección múltiple con CMV.**

El virus del mosaico leve de Banano (BanMMV) es un virus filamentoso distinto a otros conocidos que infectan a *Musa* spp. El tamaño del virus es de 580 x 14 nm cuyo genoma es de aproximadamente 7.3 kb. El genoma completo ha sido secuenciado a partir de clones de PCR y consta de 7,352 nucleótidos, que codifica cinco marcos de lectura abierta (ORF) de 205, 25.5, 12.4, 8.0 y 26.8 kDa, respectivamente. BanMMV fue más estrechamente relacionado con Foveavirus y Carlavirus, basado en el análisis filogenético utilizando una parte de la replicasa viral. El análisis de otras partes del genoma reveló similitudes con Carlavirus y Potexvirus.

### ***Antecedentes sobre detección y epidemiología***

El primer método de detección que se sigue utilizando es la observación por microscopía electrónica después de una semi-purificación de las hojas de plátano. Otros métodos se implementaron como la obtención dos sueros policlonales y un anticuerpo monoclonal derivado de un virus aislado de la India. Las pruebas de ELISA combinando los anticuerpos policlonales y monoclonales son eficaces, pero debido a la dificultad en la producción de estos reactivos ningún kit se comercializa hoy en día. Los iniciadores específicos para el virus BanMMV fueron diseñados a partir del genoma viral disponible, pero no son muy eficientes. Recientemente, un nuevo enfoque de IC-RT PCR anidada para la detección genérica fue adaptado con éxito para la detección de BanMMV.

El primer reporte en Suramérica de la presencia del virus BanMMV fue en Colombia en el 2001, siendo este país el mayor productor de plátano y el tercer mayor exportador de bananos en el mundo. Microscopía electrónica de los extractos de tejido sintomático reveló la presencia de partículas filamentosas similares al virus de aproximadamente 800 nm de largo.

Los análisis de secuencias mostraron una homología a nivel de nucleótidos y aminoácidos de 80 a 83% y de 90 a 92%, respectivamente, con una muestra australiana de BanMMV (GenBank AF314662).

La proteína de la cápside (CP) del gen de BanMMV de la cepa colombiana consta de 717 nucleótidos. El CP del BanMMV de Colombia (GenBank: AY319331, AY319332 y AY319333) se comparó con el CP australiano, observando en la región N-terminal una región altamente variable. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de BanMMV aislado de plátano en Colombia y de la presencia de variabilidad molecular en la CP de BanMMV. Este BanMMV se ha encontrado en Colombia asociado a virus del rayado del banano y al virus del mosaico del pepino. Durante el presente proyecto, en el laboratorio de Biología Molecular del INIA-Perú obtuvimos resultados satisfactorios para la detección del virus BanMMV en muestras locales de plátanos y bananas colectadas en las regiones Norte y Nor-oriental del Perú mediante el uso de técnica serológicas y moleculares no reportadas hasta el momento.

## *Detección serológica del BanMMV mediante Western blot*

Como no se contaba con un kit comercial para la detección de este virus, se solicitó el control positivo del virus (hojas liofilizadas infectadas) y suero policlonal de conejo, que fueron proporcionados por el Dr. Ben Lockhart de la Universidad de Minnesota de USA, con el fin de implementar un método de detección del virus BanMMV en el laboratorio del INIA. Así mismo, se diseñaron iniciadores a partir de secuencias reportadas en el NCBI para ser utilizados en la amplificación de la región de la proteína de la cápside del virus mediante RT-PCR y Nested-PCR.

### *Metodología*

#### *1. Extracción de proteínas*

1. Pesar 0.027 g de hojas liofilizadas de plátano infectado con el virus BanMMV. Por otro lado, mediante un sacabocado cortar discos de la hoja fresca de una planta de campo y pesar aproximadamente 0.5 g.
2. Colocar las muestras pesadas en bolsas plásticas y agregar 1 mL de buffer QB para la extracción de proteínas.

3. Homogenizar las muestras con el buffer mecánicamente presionando con un tubo de vidrio y transferir el homogenizado a un tubo microcentrifuga de 1.5 mL.
4. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante donde están las proteínas solubles y transferirlo a un nuevo tubo de microcentrifuga y mantenerlas en hielo hasta su uso.

## **II. Determinación de la concentración de proteínas (método de Lowry)**

1. Colocar 10  $\mu$ L de muestra del sobrenadante y del Standard (solución BSA 1 mg/mL) en un tubo de vidrio (13x100 mm) por separado y completar con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) hasta 1 mL. El tubo Blanco contiene 1 mL de agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) sin muestra.
2. Colocar 2 mL de solución alcalina e incubar 10 min a Temperatura Ambiente.
3. Añadir 0.1 mL de Folin-Ciocalteu y mezclar.
4. Incubar por 30 min a Temperatura ambiente.
5. Leer las Absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro, colocando el blanco a cero.
6. Determinar la concentración de la muestra mediante la fórmula:

$$[ X ] = ( \text{Cantidad St} / \text{D.O. St} ) \times \text{D.O muestra} \times 100$$

Cantidad St = 10  $\mu$ g

D.O. St = 0.028

D.O Sana = 0.157 [ X1] = 5.6 mg/mL

D.O virus = 0.170 [ X2] = 6.0 mg/mL

## **III. Electroforesis en gel SDS-PAGE**

1. Preparar 10 mL de gel de corrida SDS-PAGE al 12% (acrilamida/bisacrilamida 30 %) en una cámara de minigel y 2 mL de gel Stacking.

2. Alternativamente para ver el perfil proteico diseñar el gel teniendo en cuenta que la mitad del gel nos sirva para transferir a un papel de nitrocelulosa y la otra mitad del gel para la coloración de Plata.
3. Las concentraciones de proteínas en las muestras varían desde 4 mg/mL hasta 16 mg/mL. Colocar un volumen de cada muestra que contengan 45  $\mu\text{g}$  de proteínas totales (generalmente es de 2 a 6  $\mu\text{L}$ ) y completar hasta 10  $\mu\text{L}$  con H<sub>2</sub>O. Luego añadir 10  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra. (Tris 0.5 M pH 6.8 (0.2 mL), SDS 10% (0.2 mL), 2-Mercapto etanol (0.02 mL), Glicerol (0.2 mL) H<sub>2</sub>O (0.36 mL) y Azul de Bromofenol 0.1% (0.02 mL).
4. Para la muestra infectada con el virus colocar 30  $\mu\text{L}$  en un vial, diluida 1: 2 con buffer de muestra.
5. Colocar las muestras en un baño maría a 100°C durante 3 o 5 minutos.
6. Adicionar enseguida 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra en cada pocillo del gel. Colocar 8  $\mu\text{L}$  del marcador de tamaño de proteínas pre-teñidas de bajo y mediano rango BIORAD®.
7. Colocar el gel en el aparato de electroforesis (Max Fill Mini Protean de BIORAD®). Correr la electroforesis a 200 voltios durante 45 minutos, utilizando una fuente de poder Sigma-Aldrich PS 4010-2

#### ***IV. Transferencia al Papel de nitrocelulosa (Capilaridad y Electroblooming)***

##### *Transferencia por capilaridad*

1. Cortar el papel de nitrocelulosa al tamaño del gel y embeberlo primero con agua tipo Milli-Q hasta humedecerlo totalmente por 2 minutos y luego sumergirlo en buffer de transferencia.
2. Cortar 6 trozos de papel filtro 3M también del mismo tamaño que el gel y sumergirlos en tampón de transferencia.
3. Realizar el montaje de transferencia colocando una bandeja conteniendo el buffer de transferencia y un soporte plano de vidrio o plástico como base.
4. Colocar sobre la base tres tiras largas de papeles filtros 3M grueso embebidos con el buffer de transferencia, de tal forma que cubra la base y esté en contacto con la fuente de buffer contenidos

en la bandeja.

5. Una vez colocado las tiras de papel filtro sobre la base, colocar consecutivamente el gel, la membrana de nitrocelulosa, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana, y los 6 trozos de papel filtro.
6. Finalmente colocar 2 paquetes de papel toalla apilada sobre el papel filtro y una plataforma de vidrio con una botella para distribuir el peso equitativamente sobre la membrana, asegurando de esta forma una correcta transferencia.

### *Transferencia por electroblotting*

Cortar la membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel y además cortar 6 trozos de papel filtro también del mismo tamaño que el gel y sumergirlos en tampón de transferencia. Realizar el montaje de transferencia colocando tres papeles filtros grueso, el gel, la membrana y un papel grueso entre dos esponjas, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana y asegurando una correcta transferencia. Este sándwich colocarlo en el cassette y en la cámara de transferencia y finalmente en la cubeta llena de buffer de transferencia. Conectar el sistema a una fuente de voltaje y aplicar una intensidad de 100 V durante 1 hora.

### *V. Desarrollo de la prueba de Western blot*

1. Una vez transferidas las proteínas al papel de Nitrocelulosa (NC) sea por capilaridad o electro transferencia, cortar la membrana en tiras a lo largo de la corrida con el fin de separar los rieles.
2. Separar las tiras que contengan el antígeno (hojas liofilizadas con virus), muestra de hojas sanas y el marcador de proteínas, para enfrentarlas al suero negativo. Las tiras deben colocarse en los canales de la placa, mientras que el resto de muestras (incluyendo la planta con virus) serán enfrentados con el suero positivo, no necesariamente cortados en tiras.
3. Colocar las tiras de papel de Nitrocelulosa en una placa de petri y bloquear con PBS-leche por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave (60 rpm).
4. Lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-Tween) por 10 minutos, cada lavado realizarlo a temperatura ambiente.
5. Incubar con un primer anticuerpo policlonal específico para el virus BanMMV, a una dilución de 1/50.



6. Lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-Tween) por 10 minutos. Hacer cada lavado a temperatura ambiente.
7. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave con el segundo anticuerpo de conejo anti-IgG conjugado con peroxidasa diluido en 1:500.
8. Lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-Tween) por 10 minutos. Hacer cada lavado a temperatura ambiente.
9. Finalmente, lavar 2 veces con buffer PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Revelar utilizando 10 mg de Diaminobenzidina en 20 ml con PBS al cual debe adicionarse 2 $\mu$ L de Peróxido de Hidrógeno; adicionar esta suspensión en cada uno de los canales de la placa durante 10 minutos y luego detener la reacción con agua destilada.

## *Resultados compilados*

El Western blot, o inmunoblot, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas ligadas a una enzima mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE el cual es transferido por capilaridad o electroblotting a una membrana de Nitrocelulosa.

En la electroforesis se llevó a cabo el fraccionamiento molecular de proteínas separando la banda diagnóstica del virus cuyo peso molecular (PM) aproximadamente fue de 30-31 KDa. Como se muestra en la figura 2 donde se utiliza como marcador de peso molecular (BioRad Low Range para electroforesis SDS PAGE).

Como se tiene conocimiento previo de la secuencia completa de la proteína de cubierta del virus (BanMMV) que corresponde a 717 pares de bases (NCBI), se calculó teóricamente el peso molecular en KDa. obteniendo un peso aproximado de 30,440 KDa.

Una vez trasferidas a la membrana de nitrocelulosa se procedió a enfrentar las muestras con sus respectivos anticuerpos para realizar el test de Western Blot. Como se aprecia en la Figura 2A la prueba de Western blot reveló una banda bien diferenciada a la altura del marcador de 31 KDa, tamaño que correspondía con el valor calculado para la proteína de la cápside del Virus BanMMV, siendo ésta entre 30 y 31 KDa.

## Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos la prueba de Western Blot discriminó mejor la banda proteica de la cápside del virus BanMMV.

En las pruebas realizadas en las muestras colectadas de las diferentes regiones del Perú como se observa en la figura 2B, en las hojas de Lima e Iquitos se detectó la presencia del virus BanMMV, siendo éste el primer reporte de la presencia de este virus en el país.

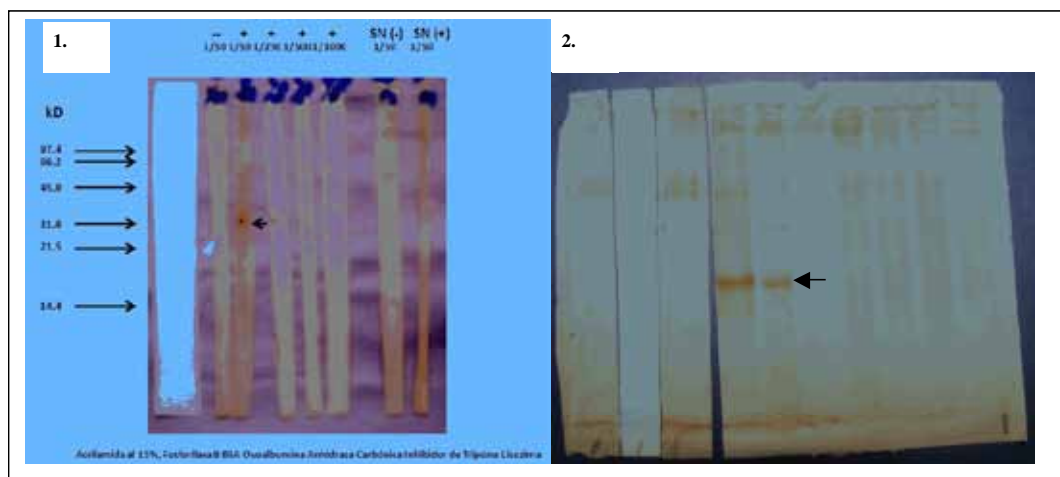


Figura 2. Test de Western Blot para la detección de BanMMV. A) Prueba de diluciones del anticuerpo para la detección del virus. B) detección de la presencia del virus BanMMV en muestras provenientes de Lima e Iquitos (ver flecha).

## DetECCIÓN MOLECULAR DE BANMMV MEDIANTE PCR

### Metodología

Se utilizaron dos protocolos para la extracción de ARN.

## **1. Extracción de ARN de tejido vegetal utilizando reactivo Qiazol®**

### **Homogenización**

- 1.** Pesar 100 mg de tejido vegetal. Utilizar un sacabocado de 1 cm de diámetro. Pesar 12 círculos de hoja que pesen aproximadamente 100 mg.
- 2.** Colocar el tejido en una bolsa de molida 100 mg de la muestra y triturar las muestras con un tubo de ensayo.
- 3.** Añadir 1 mL del reactivo Qiazol® y moler vigorosamente con un tubo de ensayo. Transferir el molido a un tubo de 1.5 mL.
  - Homogenizar 2 veces la mezcla por 15 segundos a velocidad media y por 20 segundos a máxima velocidad con el vortex.
  - Centrifugar a 4°C por 20 minutos a 5.000 rpm.
- 4.** Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL.

**Nota: El volumen del tejido no debe exceder el 10% del volumen de Qiazol® usado.**

### **Separación**

- Incubar a T ° ambiente por 5 minutos (entre 15 °C-30°C).
- Adicionar 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de Qiazol®.
- Agitar vigorosamente (sin vortex) por 20 segundos e incubar a T ° ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo

### **Precipitación y lavado**

- Adicionar 0.5 mL de Isopropanol por 1 mL de Qiazol®.
- Agitar por 15 segundos e incubar a T ° ambiente por 10 minutos. (Para mayor

- Producción, precipitar por toda la noche a -20° C.)
- Centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C.  
Lavar el botón con 1 mL de etanol a 70 % por 1 mL de Qiazol®. Agitar con vortex
- a baja velocidad por 10 segundos.
- Centrifugar a 5.000 rpm por 7.5 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el botón.
- Secar el botón a temperatura ambiente por 10 minutos. No secar completamente.
- Resuspender el pellet en 50- 100 µL de agua DEPC.

## *2. Extracción de ARN de tejido vegetal utilizando RNAeasy QIAGEN®*

1. Pesar 100 mg de Tejido vegetal. Utilizar un sacabocado de 1 cm de diámetro. (Pesar 12 círculos de hoja aprox. 100mg.)
2. Colocar el tejido en una bolsa de molida 100 mg, y proceder a triturar las muestras con un tubo de ensayo.
3. Añadir 650 µL Buffer RLT mas 6.5 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) (10 µL β-ME RLT por 1 mL de Buffer) al triturado y moler vigorosamente con un tubo de ensayo.
4. Transferir el molido a un tubo de 1.5 mL y llevar al vortex por 15 seg agitar vigorosamente de forma manual y luego dar vortex por 20 seg.
5. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a una columna de giro QIAshredder en un tubo de colección de 2 mL, y centrifugar durante 2 min a velocidad máxima (14.000 rpm). Utilizar únicamente este sobrenadante en posteriores pasos.
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante del flujo a través de un tubo de microcentrífuga nuevo (no suministrado).
8. Añadir 0,5 volúmenes de etanol (96-100% Aprox. 250 µL) al lisado, y pipetear inmediatamente. No centrifugar. Proceda inmediatamente al paso 6.

9. Transferir la muestra (generalmente 650  $\mu$ L), incluyendo cualquier precipitado que pueda tener, a una columna de giro RNeasy colocada en un tubo de recogida de 2 ml (incluido).
10. Añadir 700  $\mu$ L de buffer RW1 a la columna de giro RNeasy. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 15 segundos a 8.000 gravedades para lavar la columna. Reutilizar el tubo de recolección.
11. Añadir 500  $\mu$ L del tampón RPE a la columna de giro RNeasy. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 2 min a 8.000 gravedades para lavar la columna.
12. Opcional: Colocar la columna spin RNeasy en un nuevo tubo colector 2 mL (incluido). Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar a toda velocidad por 1 min.
13. Colocar la columna spin RNeasy en un nuevo tubo de 1,5 mL de recogida (suministrado). Añadir 30 - 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar durante 1 min a 8.000 gravedades para eluir el ARN.

## *RT-PCR y Nested PCR para la detección de BanMMV*

El análisis de este virus se basó en la publicación “Detection of *Banana mild mosaic virus* and *Banana virus X* by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR)” (Pierre-Yves Teycheney & col., 2007). La amplificación de *Banana Mild Mosaic Virus* (BanMMV) fue llevada a cabo de acuerdo a las condiciones del Kit One Step RT-PCR de Qiagen. Como una alternativa al método anterior se diseñaron nuevos iniciadores específicos para el gen de la proteína de cubierta del virus BanMMV, utilizando las secuencias publicadas en el NCBI y el programa PRIMER3.

Los Iniciadores diseñados en el INIA para la detección de BanMMV fueron los siguientes:

F coat 1	5´- GAAATATGCCCTCTCCGTC-3´
R coat 1	5´-CCACAGCATCGAGAAAGTC-3´
F coat 2	5´-AACCTTCAAAGGTCGAAGCA-3´
R coat 2	5´-TATTCCAGTTGGGGGCATAA-3´

Las condiciones para RT-PCR utilizadas se muestran en Tabla 1, para un volumen final de 50  $\mu$ L/reacción, y el programa de amplificación para RT-PCR se muestra en la tabla 2.



**Tabla 1. Mezcla de reactivos para la RT-PCR en un solo paso.**

Componente	Volumen
Agua libre de RNAasa	18 $\mu$ L
5X QIAGEN PCR Buffer	10 $\mu$ L
dNTP Mix (contiene 10 mM de cada dNTP)	2 $\mu$ L
Primer F 0.6 $\mu$ M	3 $\mu$ L
Primer R 0.6 $\mu$ M	3 $\mu$ L
Solución Q	10 $\mu$ L
OneStep Qiagen RT-PCR Mix enzima	2 $\mu$ L
ARN Molde	2 $\mu$ L
Volumen final	50 $\mu$ L

**Tabla 2. Programa de termociclado para RT-PCR en un solo paso.**

Programa para RT-PCR 1 paso
50°Cx30 min
95°Cx15 min
35 ciclos:
94°Cx1 min
56°Cx1 min
72°Cx1 min
72°Cx10 min (extensión final)
4°C

Condiciones para Nested PCR mostradas en las tablas 3 y 4 utilizando la pareja de iniciadores F coat-1 y R coat-1.

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la Nested-PCR.

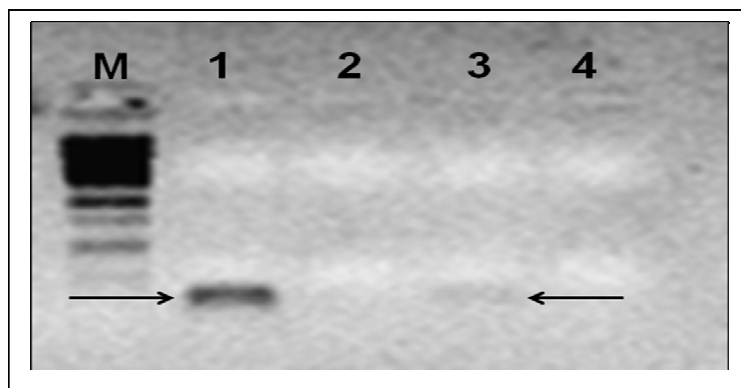
Componente	Volumen
Agua libre de RNAasa	15 $\mu$ L
Hot Star Master Mix	25 $\mu$ L
Primer (F coat-1) 1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
Primer (R coat-1) 1 $\mu$ M	1 $\mu$ L
50 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L
cDNA	4 $\mu$ L
Volumen total	50 $\mu$ L

Tabla 4. Programa de termociclado para Nested-PCR.

Programa para Nested-PCR
94°Cx3 min
30 ciclos:
95°Cx1 min
42°Cx1 min
72°Cx1 min
72°Cx10 min (extensión final)
4°C

## Resultados compilados

Se realizaron 5 colectas, incluyendo las regiones de Piura, Tarapoto, Pucallpa, Iquitos y Tumbes. Se colectaron 300 muestras de cada región para un total de 1500 muestras en las cinco regiones. 500 extracciones de ARN se obtuvieron en las cinco regiones (100 muestras por región). Y se logró amplificar mediante RT-PCR la región de la proteína de cubierta del virus BanMMV a partir de una de las muestras positivas obtenidas por Western blot (figura 3).



**Figura 3.** Amplificación por RT-PCR de la región de la proteína de cubierta del virus BanMMV. Carril 1; amplificación utilizando las condiciones implementadas en el laboratorio del INIA-Perú. Carril 3; amplificación propuesta por Teycheney et al., 2007.

## Referencias

- C. F. Gambley and J. E. Thomas. 2001. Molecular characterisation of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. *Arch Virol* 146: 1369–1379.
- Pierre-Yves Teycheney, A. Marais, L. Svanella-Dumas, M. J. Dulucq, and T. Candresse (2005) Molecular characterization of banana virus X (BVX), a novel member of the Flexiviridae family. *Arch Virol*. 150: 1715–1727.
- Pierre-Yves Teycheney, Isabelle Acina, Benham E.L. Lockhart, Thierry Candresse. 2007. Detection of Banana mild mosaic virus and Banana virus X by polyvalent degenerate oligonucleotide RT-PCR (PDO-RT-PCR) *Journal of Virological Methods* 142 41–49.
- Simon A. Langeveld, Jean-Michel Dore, Johan Memelink, Antonius F. L. M. Derks, Cornelia I. M. van der Vlugt, Cees J. Asjes and John F. Bol. 1991., Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of General Virology*. 72, 1531-1541.
- Workshop on the detection of viral diseases of banana and plantain taller técnico sobre detección de enfermedades virales en banano y plátano. Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement – CIRAD. 2006. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*

## **RESÚMENES**

### **EVENTO MESA DE DIÁLOGO PROYECTO**

*Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN*



## Participantes

- Ida Bartolini Martínez  
Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA-Perú
- Aurora Fraile  
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas CBGP-España
- Margarita Perea Dallos  
Departamento de biología  
Universidad Nacional de Colombia
- Mónica Betancourt Vásquez  
Facultad de Ciencias Agrícolas-  
Universidad Santa Rosa de Cabal  
(UNISARC)-Colombia
- Marta Leonor Marulanda Ángel  
Laboratorio de Biotecnología  
Vegetal, Universidad Tecnológica de  
Pereira-Colombia
- Ana María López Gutiérrez  
Laboratorio de Biotecnología  
Vegetal, Universidad Tecnológica de  
Pereira-Colombia
- Javier Romero Cano  
Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria  
Departamento de Protección  
Vegetal-INIA-España
- Manuel G. Moreno Pérez  
Universidad Politécnica de Madrid  
UPM-España
- Leonardo Mariño Ramírez  
National Center for Biotechnology  
Information (NCBI)-United States of  
America
- Javier Garcia González  
Dirección Técnica de Análisis y  
diagnóstico Instituto Colombiano  
Agropecuario
- Jorge L. Benavides Ranilla  
Instituto Nacional de Innovación  
Agraria-INIA-Perú
- Ciro Barrera Rojas  
Instituto Nacional de Innovación  
Agraria-INIA-Perú
- Jorge Evelio Ángel Díaz  
Líder proyecto  
Instituto Colombiano Agropecuario
- Jaime Dueñas Narváz  
Integrante Proyecto-Colombia
- Julián Martínez Henao  
Integrante Proyecto-Colombia
- Erick Geovanni Hernández  
Integrante Proyecto-Colombia
- Edisson Chavarro Mesa  
Integrante Proyecto-Colombia
- Walther Turizo Álvarez  
Integrante Proyecto-Colombia

● Silverio Alonso González Flórez  
Federación Nacional de Plataneros-  
FEDEPLATANO-Colombia

● Julio E. Sierra Jarma  
Sanidad vegetal  
Instituto Colombiano Agropecuario-  
Seccional Magdalena

● John Jairo Alarcón  
Dirección Técnica de Regulación  
Sanitaria y Fitosanitaria  
Instituto Colombiano Agropecuario

● Efraín Torres Ariza  
Dirección Técnica de Regulación  
Sanitaria y Fitosanitaria  
Instituto Colombiano Agropecuario

## *ICA lidera encuentro internacional para estudio de virus en plátano y banano*

El evento tuvo lugar en la capital del país y el objetivo fue producir una metodología para la detección de virus que atacan las musáceas en los países de la CAN.

Con la presencia de expertos de Colombia, Perú, España y Estados Unidos, y gracias a un programa financiado por la Unión Europea, se llevó a cabo en Bogotá una mesa de diálogo que buscaba crear una metodología para la detección de los virus que atacan los cultivos de musáceas, es decir plátano y banano, en los países de la Comunidad Andina (CAN).

El propósito de esta actividad, además de integrar a los países que hacen parte de este bloque económico, fue prestar asistencia técnica a los laboratorios para producir material libre de dichos virus.

El proyecto, denominado “Unificación y Fortalecimiento del Sistema de Protección Fitosanitaria en la Comunidad Andina de Naciones (CAN). Caso-Modelo: Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de importancia económica en la CAN”, tuvo como objetivo lograr un protocolo que permitiera transferir material vegetal libre de virus entre los países de la CAN, en este caso para el cultivo del plátano y banano, lo que fortaleció el intercambio entre estos países y con otros bloques económicos como la Unión Europea.

La organización del encuentro fue liderada por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), con el apoyo de entidades como el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) y el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), también del vecino país.

Así mismo, contó con el concurso de científicos e investigadores de la Universidad Politécnica de Madrid y con la asistencia de representantes de la Cadena Nacional del Plátano y de laboratorios privados que producen semilla in vitro de musáceas, actividad que muestra un gran crecimiento.

De acuerdo con la Gerente general del ICA, Teresita Beltrán Ospina, a los países que participaron en este importante proyecto no sólo los unen fuertes lazos de fraternidad y cooperación con Colombia sino, como en esta oportunidad, iniciativas conjuntas en busca de logros a nivel fitosanitario que buscan mejorar las condiciones de los agricultores y del agro en general en toda la región.

Los virus que se evaluaron en estas mesas de diálogo (CMV, BSV, BBTv, BBrMV, BanMMV y AbaMV) disminuyen notablemente la producción, a pesar de que el banano colombiano es una fruta apetecida y goza de gran consumo en los países de la UE, justamente.

Al cierre de la agenda, la Gerente del ICA invitó a los asistentes a continuar llevando a cabo iniciativas de este tipo, no sólo por su positivo impacto en materia de integración regional, sino porque ello permitiría lograr nuevos avances Fito y Zoonosológicos para el bien de la economía de los países participantes y otros que puedan beneficiarse del mismo.

***Grupo de invitados y colaboradores internacionales del proyecto junto con la gerente del ICA, Dra. Teresita Beltrán.***



***De izquierda a derecha: Jorge Benavides, INIA-Perú; Ciro Barrera, INIA-Perú; Jorge E. Ángel, Líder Proyecto ICA-Colombia; Silverio González, FEDEPLATANO-Colombia; Julio Sierra, ICA-Magdalena; Javier Romero, INIA-España; Jaime Dueñas, Administrador proyecto. Ana Maria López, UTP-Colombia; Ida Bartolini, SENASA-Perú; Mariluz Villamil, Subgerencia de Análisis y Diagnostico ICA-Colombia; Teresita Beltrán, Gerente General ICA-Colombia; Aurora Fraile, CBGP-España, y Mónica Betancourt, UNISARC-Colombia.***

## *Métodos de diagnóstico del Virus del Mosaico de la Bráctea del Banano (BBrMV) y Virus del Cogollo Racimoso del Banano (BBTV)*

**Ida Bartolini Martínez, Arturo Olórtegui Livia**

Unidad Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Biología Molecular. Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA, [ibartolini@senasa.gob.pe](mailto:ibartolini@senasa.gob.pe).

Durante los últimos 10 años el cultivo y la producción de plátano y banano han aumentado notablemente en los países de la región andina debido a la gran demanda externa y a la tecnología aplicada. Sin embargo existen factores de índole fitosanitaria que afectan estos cultivos como las enfermedades causadas por los virus del Mosaico de la Bráctea del Banano (BBrMV) y del Cogollo Racimoso del Banano (BBTV) considerados como cuarentenarios en esta región. Ante esta situación es muy importante contar con metodologías modernas que permitan el diagnóstico oportuno y el control preventivo para evitar su diseminación y garantizar la producción y calidad de estos cultivos. En esta parte del Proyecto se han estandarizado las técnicas de DAS-ELISA, PCR convencional y PCR en tiempo real para detectar ambos virus. En el caso de DAS-ELISA se trabajó con kits de ADGEN y para la PCR convencional se analizaron varios pares de primers modificando y estandarizando las condiciones de corrida hasta obtener una banda clara y definida en ambos casos. Los primers seleccionados fueron N2/NR para el BBrMV con producto de 260 bp y P1/P2 para el BBTV con producto de 349 bp. En el caso de la PCR en tiempo real se diseñaron primers y sondas MGB en la zona de la CP para el BBrMV y la SD1 para el BBTV; se utilizó COX como control interno. Las 600 muestras colectadas en seis zonas bananeras peruanas se analizaron mediante DAS-ELISA y fueron negativas para los dos virus. Cuando fueron analizadas por PCR convencional los resultados fueron negativos para BBrMV pero en el caso del BBTV se observó que 7 muestras de Lambayeque presentaron una banda a la altura del control positivo del BBTV, estas muestras también fueron positivas mediante PCR en tiempo real y están siendo secuenciadas para su confirmación y caracterización.



## *Resumen de los avances realizados por el INIA-Perú*

**Jorge Benavides Ranilla**

Laboratorio de Biología Molecular, Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Instituto Nacional de Innovación Agraria, INIA-Perú, jbenavides@inia.gob.pe.

Dentro del marco del Proyecto Musáceas en coordinación con ICA de Colombia y SENASA del Peru el INIA ha desarrollado una técnica de detección para el virus BanMMV mediante el uso de la técnica Western Blot, el cual consiste en separar las proteínas de una muestra vegetal de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de Poli(acrilamida) (PAGE) tratadas con SDS. Luego las proteínas separadas en el gel son transferidas a un papel de nitrocelulosa (NC) mediante difusión por capilaridad o utilizando un campo eléctrico llamado electroblotting. El papel NC es hibridado con el primer anticuerpo policlonal de conejo específico para el virus BanMMV y luego es sometido a un segundo anticuerpo específico para los anticuerpos de conejo. Este segundo anticuerpo es conjugado con una enzima llamada peroxidasa que permite visualizar mediante una reacción de coloración violácea en presencia del substrato llamado diaminobencidina. Esta técnica tiene la ventaja de verificar el peso molecular en kiloDalton (kD) de la proteína antígeno del virus BanMMV, el cual pudimos comprobar que se trataba de la proteína de cubierta del virus por tener el peso molecular esperado de aproximadamente 31 kD. A diferencia de un Dot ELISA que el anticuerpo policlonal de conejo puede dar reacción cruzada con otras proteínas no específicas de la planta dando una reacción inespecífica cubriendo el revelado de las proteínas específicas mostrando de esta manera cierta dudas en los resultados finales para una prueba cualitativa. Por otro lado, debido a la cantidad limitada del anticuerpo policlonal disponible, proveído amablemente por el Dr Ben Lockhart de la Universidad de Minnesota, se ha pedido la síntesis del gen que codifica a la proteína de cubierta clonado en un vector, el cual será utilizado para insertarlo en un vector de expresión de proteínas en bacterias, con el fin de producir mg de proteínas del virus para ser utilizado en producir más anticuerpos policlonales en un conejo tratado. De esta manera hemos determinado hasta ahora 3 muestras de banano y plátano que presentan esta reacción positiva en el ensayo del Western Blot. Estas muestras positivas serán analizadas a su vez con técnicas moleculares de RT-PCR Nested utilizando primers específicos degenerados para estos virus con el fin de confirmar los resultados y además de producir una sonda para ser



luego marcados con digoxigenina para pruebas de hibridación. Para ello se ha estandarizado la extracción de ARN sin el uso de Nitrógeno Líquido (N<sub>2</sub>) con el fin de ser utilizado en cualquier laboratorio a menor costo y materiales. En esta técnica, se utiliza 10 discos de la muestra congelada (100mg) y es homogenizada con el buffer de extracción que es suplementado por el Kit Plant RNAeasy de Qiagen. Con esta técnica tenemos 500 extracciones de RNA total de las colectas realizadas en las regiones peruanas de Tumbes, Piura, Loreto, Ucayali y San Martín, las cuales están siendo utilizadas para la detección de los virus BanMMV por RT-PCR Nested. Con respecto al virus del Abaca Mosaic Virus (AbaMV) es el otro virus que se le ha asignado al INIA para ser evaluado mediante estas técnicas moleculares y serológicas. El AbaMV fue proveído por el Dr John Thomas de Australia; sin embargo, la cantidad de suero policlonal contra el virus así como la muestra vegetal infectada liofilizada no son suficientes para realizar los ensayos de estandarización, por lo que se ha coordinado con el SENASA realizar la detección mediante el uso de un Kit de Agdia para la determinación de cualquier potivirus, por lo que si en el caso fuera positivo para alguna muestra analizada será descartada por la detección de los otros virus relacionados. Simultáneamente, los ARNs de las muestras de las colectas serán utilizados para la determinación del AbaMV mediante el uso de las pruebas moleculares de RT-PCR con primers específicos de este virus que han sido reportados.

## Evaluación del riesgo de plagas para introducción de material vegetal al país

Efraín Torres Ariza, John Jairo Alarcón

Dirección Técnica de Regulación Sanitaria y Fitosanitaria-Instituto Colombiano Agropecuario, Jhon.alarcon@ica.gov.co, efrain.torres@ica.gov.co.

El comercio de plantas y productos vegetales entre países o regiones constituye un medio de transporte, introducción y dispersión de plagas importantes que pueden tener impactos negativos en los ecosistemas y la sanidad de los cultivos afectando la producción, comercialización y exportación de productos vegetales. Por lo tanto, la Organización Mundial de Comercio (OMC) y la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) para prevenir que los países abusen de las medidas de protección fitosanitarias restringiendo el comercio internacional, los autoriza a establecer sus propias medidas siempre y cuando estén basadas en la metodología de Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) establecidas en las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). El ARP es el proceso de evaluación de las evidencias biológicas, científicas y económicas para determinar si un organismo es una plaga, si debería ser reglamentado y la intensidad de cualquier medida fitosanitaria que haya que adoptarse contra él (CIPF, 2009). El ARP podrá utilizarse para organismos que no han sido reconocidos previamente como plagas (sean estas plantas, agentes de control biológico u otros organismos benéficos u organismos vivos modificados), plagas reconocidas, vías de ingreso o dispersión, y para el examen de las políticas fitosanitarias. El proceso consiste en tres etapas.

**1. Inicio:** consiste en la identificación de la plaga o plagas y de las vías que suscitan preocupación con respecto a la cuarentena y que deben tenerse en cuenta en el análisis de riesgo, en relación con el área de ARP identificada (país o región exportadora) (CIPF, 2009).

**2. Evaluación del riesgo:** comienza con la categorización de las plagas individuales para determinar si se cumplen los criterios para incluirlas entre las plagas cuarentenarias. Continúa con una valoración de la probabilidad de entrada, establecimiento y dispersión de la plaga y de sus consecuencias ambientales y económicas potenciales (CIPF, 2009).

**3. Manejo del riesgo:** consiste en determinar las opciones con respecto al manejo para disminuir los riesgos identificados en la etapa 2. Esas opciones se evalúan en función de su eficacia, viabilidad y repercusiones con el fin de seleccionar las que son apropiadas (CIPF, 2009).

Al concluir el ARP es conveniente que el análisis, las medidas propuestas para mitigar el riesgo y la incertidumbre existente se comuniquen a los interesados directos y a la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria interesada o a las Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPF), según sea lo apropiado. A partir de las conclusiones del ARP se pueden o no fijar requisitos, restricciones o prohibiciones fitosanitarias. Estos requisitos de importación son el resultado de un proceso técnicamente justificado y un manejo del riesgo no discriminatorio (CIPF, 2009).

**Literatura citada:** CIPF (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria). 2009. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias 1 - 32. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 467p

## Escalamiento de la termoterapia en la producción de semilla de plátano

**Silverio Alonso González Flórez**

Dirección, Federación Nacional de Plataneros FEDEPLATANO-Colombia.

silveriogonzalez2003@yahoo.es.

Los métodos de propagación en musáceas por muchos años han utilizado cormos y agujas de la planta madre. Al paso de las generaciones se ha logrado, mediante investigación, usar cormos de menor tamaño lo que adujo una mitigación en la transmisión de plagas y enfermedades, pero produce poco material y no se encuentra sano totalmente. En investigaciones más recientes se adoptó el uso de rebrotes inducidos en viveros. Aunque es un método que produce más material, tiene problemas con el picudo, al igual que con nematodos y el moko (*Ralstonia Solanacearum*), tanto en los lotes inducción como en los viveros. El método más reciente en la historia es el cultivo de tejidos. Este debe ser indexado. Sin embargo, solo existen tres laboratorios en el mundo: uno en Australia, uno en Francia y otro en África. En América no hay el protocolo, ni existe el personal capacitado que esté trabajando en ello. Esto, sumado al alto costo de producción y al hecho agravante que en el plátano, por tener balbisiana, existe en el código genético el virus del BSV. Podemos deducir de las anteriores consideraciones, que no se debe producir semillas de plátano por el método de meristemas. En vista de estas circunstancias, hace nueve años nos dimos a la tarea de encontrar y aplicar nuevas tecnologías con un menor costo y que conllevaran a una alta certeza de la sanidad vegetal. En las reuniones de las Cadenas Productivas, y en especial en la de Plátano, se llegaba a la conclusión que en el Plátano el ítem más importante es la semilla certificada, y, a pesar de los grandes esfuerzos hechos por el ICA, no se encontraba una manera segura de certificar por medio de los kits de laboratorio.

Con el apoyo solicitado al CIAT y al CIRAD, el ICA y FEDEPLATANO se buscó una luz en la propagación y certificación de material vegetal de plátano. Con la asesoría del Dr. Thierry Lescot trabajamos en propagación por el método de estímulo con cámaras hechas a la sombra, lográndose un gran avance, aunque con el tiempo encontramos que el picudo y las enfermedades se propagaban por ser este un medio óptimo para su propagación. Cuando en el CIAT se trabajaba en la evaluación de productos y elementos que dieran resistencia al Moko,

(*Ralstonia solanacearum*), encontramos unos inductores para el calor. Gracias a este hallazgo, iniciamos la construcción de Cámaras Térmicas.

Durante seis años se realizaron evaluaciones hasta conseguir temperaturas entre 42 y 71 grados centígrados. Inicialmente, a los 46 grados, se morían completamente las plantas. La termoterapia por inmersión en agua a 42 grados es un método muy antiguo. En Colombia se ha utilizado en Caña y luego en Banano en Urabá. La termoterapia con aire caliente en Cámara y con escalamiento es la innovación a esta técnica. Actualmente, estas cámaras se han tecnificado para lograr un sistema totalmente inteligente con comandos y sensores electrónicos de temperatura en aire y sustrato, humedad en aire y sustrato, luminosidad y fertilización que ligados a software anulan, en lo posible, el error humano y pueden ser comandados desde diferentes regiones y países, logrando así, un gran avance a nivel mundial en la producción de plantas sanas con métodos eficientes y económicos, en grandes volúmenes y en corto tiempo.

### **RESULTADOS**

Con seis años de experiencias en la producción de semillas sanas en Cámaras Térmicas y seis millones de plantas producidas en estas, de las cuales cinco millones se encuentran hoy en producción, con un mayor nivel productivo y sanitario, con material más homogéneo, mayores niveles de clorofila y mayor número de raíces comparadas con las semillas convencionales, semillas por rebrote inducido y meristemas. El picudo nunca ha sido encontrado en las Cámaras Térmicas, pues sucumbe a las altas temperaturas, pudiéndose producir masivamente el material de alto valor genético que hemos obtenido por selección durante veinte años. Hay instituciones trabajando en mejoramiento genético que requieren propagación de material sano, masiva y rápidamente para lograr sus objetivos y sus metas, siendo una limitante importante que esta metodología puede subsanar.

**NOTA:** esta técnica está reservada. Pero mediante petición al CIAT, CIRAD y FEDEPLATANO se podrá difundir para el bien de toda la humanidad y no para los negocios de unos cuantos.



## Evolución de virus vegetales

**Aurora Fraile, Soledad Sacristán, Israel Pagán, Mónica Betancourt, Fernando Escriu, Julien Bonnet, José M. Malpica, Fernando García-Arenal.**

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA. Campus de Montegancedo, Universidad Politécnica de Madrid. Pozuelo de Alarcón (Madrid). España.

En esta exposición se comenta lo que se conoce de los mecanismos de evolución y cómo ésta modifica la estructura genética de las poblaciones de virus de plantas, resaltando las contribuciones que nuestro grupo ha hecho al conocimiento de los distintos procesos que determinan dicha estructura genética. Las poblaciones de virus son genéticamente heterogéneas, p. ej. la estructura genética de TMGMV fue descrita por Rodríguez-Cerezo & García-Arenal (1989, *Virology* 170:418).

Las fuentes de variación genética son:

**Mutación:** la tasa de mutación espontánea en TMV se ha estimado en  $2.34 \times 10^{-5}$  por base (Malpica et al. 2001. *Genetics* 162:1505).

**Selección:** Es el proceso que más se ha invocado para explicar la evolución de virus. Asociada con cualquier factor del ciclo de vida del virus, p. ej. la presencia de genes de resistencia en el huésped (García-Arenal & McDonald, 2003 *Phytopathology* 93:941; Fraile et al, 2010. *Mol. Biol. Evol.*), la alternancia de huéspedes (Sacristán, et al. 2005 *Phytopathology* 95:827; Malpica et al. 2006 *PLoS ONE* 1:e41), etc.

**Recombinación y/o pseudorrecombinación:** En el caso de CMV, se ha comprobado que la mayoría de los recombinantes y pseudorrecombinantes no se establecen en la población (Bonnet et al. 2005 *Virology* 332:359; Escriu et al. 2007 *PLoS Pathog* 3:e8).

**Deriva genética:** Hay que distinguir entre el censo de la población de un virus y el tamaño efectivo de su población, es decir el número de individuos que pasan sus genes a una nueva generación. Aunque el censo en las plantas infectadas es muy elevado (p. ej. 1011-1012 partículas de TMV/hoja infectada (Harrison 1956 *J.Gen. Microbiol.* 15:210), las estimas del tamaño efectivo de la población para TMV y CMV realizadas por nuestro grupo oscilan entre 0.5 y 35 (Sacristán et al. 2003 *J. Virol* 77:9906; Betancourt et al. 2008 *J. Virol* 82:12416).

## *Virus emergentes. Una aproximación vista desde el Virus del Mosaico del Pepino Dulce (PepMV)*

**Manuel Guillermo Moreno Pérez,**

Estudiante de doctorado de la Universidad Politécnica de Madrid, del grupo de Interacción y co- evolución Planta-Virus dirigido por el Dr. García-Arenal Rodríguez, Fernando ([http://www.cbgp.upm.es/plant\\_virus.php](http://www.cbgp.upm.es/plant_virus.php)).

Inicialmente antes del proceso de domesticación de las plantas, los virus han venido co-evolucionando con plantas silvestres, estas plantas silvestres estaban conformadas en comunidades mixtas de especies. Y este proceso de co-evolución **dio forma y modulo tanto** a las plantas silvestres como a sus patógenos. Después en el proceso de domesticación ya hace mucho tiempo (10-15.000 años) se fue modificando el ambiente naturaleza de las plantas silvestres. Cambiando esas comunidades mixtas de especies en lo que ahora conocemos como monocultivo, para la producción de **alimentos, fibras, medicinas y ornamentales**. Durante estas etapas tempranas de domesticación, las plantas fueron infectadas por los virus de sus antepasados silvestres. Entonces La evolución de virus fue ocurriendo adicionalmente cuando los virus que se mudaron a plantas domesticadas y se fueron adaptando a esta situación diferente en la que sus huéspedes estaban creciendo en competencias de territorio y principalmente en cultivo de especie mezcladas. Seguidamente hace aproximadamente 8.000 años se dio el mayor esparcimiento y movimiento del hombre moderno lo que conllevó a la gradual distribución de los cultivos fuera del centro de original de domesticación (Rojas R. y Gilbertson L. 2008. Capitulo 3 Plant Virus Evolution). Además, actualmente la rápida expansión en la actividad humana incluyendo la sofisticación cada vez más de las prácticas agrícolas y el cultivo extendido en monocultivo provee las condiciones que incrementan la futura inestabilidad, favoreciendo las frecuentes y perjudiciales epidemias de virus de plantas. Debido a la continua expansión del volumen y velocidad de comercio de plantas y productos de plantas, y el movimiento de plantas fuera de su centro de domesticación, hay un incremento de amenaza de la alimentación por virus procedentes de plantas autóctonas. El estudio de la evolución nos da varias reglas, acerca de lo que puede evolucionar, lo que puede distribirse y lo que no. Si conocemos algunas reglas, podemos empezar a predecir lo que va a pasar. El interés del virus, al igual que en cualquier proceso de selección, es el juego de números: reproducirse rápidamente y con la mayor progenie posible. Mas evolución significa más mutaciones lo que a su vez

significa más capacidad de generar mutaciones que se adaptaran a los nuevos ambientes, tales como nuevas especies huésped (Holmes, E. 2009). El estudio de la diversidad genética y los cambios en la estructura de poblaciones de los virus de plantas, nos permiten revelar que factores determinan la evolución de un virus. Esto es altamente importante en el desarrollo de estrategias de control de enfermedades causadas por virus (García-Arenal y col, 2001; Fernando Escriu, y col., 2003). El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en tan solo 20 años se ha transmitido por todo el mundo pasando del Pepino dulce (*Solanum muricatum*) a tomate (*Solanum lycopersicum L.*) y se ha convertido en el agente etiológico de una enfermedad emergente muy importante que afecta a cultivos de tomate en diversos lugares geográficos de Europa, Asia, Sur y Norte de América.(EPPO, 2009). El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino Mosaic virus*, PepMV), perteneciente al genero potexvirus, es uno de los principales factores limitantes de la producción de tomate en Europa y América, ya que afecta al rendimiento, la calidad y la comercialización del cultivo. Desde que en 1974 fuera descrito por primera vez infectando plantas de pepino dulce (*Solanum muricatum*) en Perú, se han caracterizado cuatro cepas: la cepa original de Perú (PE), y las cepas europea (EU), americana (US1) y chilena (CH2), que presentan una homología de la secuencia de nucleótidos con el aislado peruano del 95%, 82% y 79%, respectivamente. En España, PepMV fue detectado por primera vez en 1999, causando graves epidemias en cultivos de tomate en invernadero. Hasta 2004 la mayoría de los aislados caracterizados pertenecían a la cepa EU, pero en años posteriores la prevalencia de aislados CH2 ha ido en aumento, lo que sugiere un cambio en la estructura genética de la población de PepMV, y subraya el peligro de introducción de nuevas cepas. nuestros resultados confirman este cambio de la estructura genética y la introducción de nuevas cepas como la US1 y del recombinante US2 (US1+CH2). Para evaluar esta posibilidad, y con el fin de determinar el origen de la diversidad genética de PepMV se ha estudiado la estructura genética de la población del virus en Perú, que ha sido propuesto como centro de diversificación de la especie. Para ello, se realizaron muestreos en diferentes poblaciones silvestres de especies del género *Solanum* en el centro y sur del país. El análisis filogenético utilizando el gen de la CP mostró que los aislados obtenidos en dichos muestreos forman un nuevo grupo que ha sido denominado *chilense* (SC). Estos resultados indican que la población peruana de PepMV es más diversa que la población en Europa, y sugieren que efectivamente Perú es un centro de diversificación de PepMV. Esta presencia de aislados nuevos en Perú, no descritos en Europa y el norte de América advierte sobre los posibles riesgos que pueden surgir en el cultivo de tomate si no se toman las medidas correspondientes y no se vigila su introducción. Se presenta la caracterización molecular y biológica de aislados de la nueva cepa SC.

## Producción Y exportación de banano en el Magdalena (Colombia). Problemas fitosanitarios

Julio E. Sierra jarma

I. A. Sanidad vegetal, Instituto Colombiano agropecuario-ICA-Magdalena, julio.sierra@ica.gov.co.

El banano es uno de los alimentos de primera necesidad más importantes en las zonas tropicales y su producción para la venta en mercados locales es, junto con la producción lechera y la horticultura, una de las pocas actividades que proporciona a las unidades familiares ingresos regulares durante todo el año; Se estima que a nivel mundial los bananos y plátanos se cultivan en una superficie de 10 millones de Hectáreas y que producen alrededor de 84 millones de toneladas de fruta, de los cuales un poco más de 10% es exportable. Los principales países productores son: India, Brasil, Ecuador, Colombia, Indonesia, Filipinas y China entre otras.

**SITUACION NACIONAL.** Para el año 2009 existían en el país un total de 44,500 Ha sembradas con Banano las cuales produjeron un total de 96,7 millones de Cajas (18,14 Kg) , con una productividad promedio de 2,174 Cajas/Ha/Año, cuyas exportaciones generaron ingresos por un valor de US\$ 705,6 millones, resaltando dos grandes zonas:

- Zona Uraba, Área 33,500 Ha, productividad promedio 2,142 Cajas/Ha/Año, Exporta 71.7 millones de cajas por un valor de US\$ 533,3 millones.
- Zona Santa Marta, Área 11,000 Ha, productividad promedio de 2,273 Cajas/Ha/Año, Exporta 25 millones de Cajas por un valor de US\$ 172,3 millones.

**SOCIO-ECONÓMICO.** Las 44,500 Ha de Cultivo Generan 22,250 empleos directos y 66,750 indirectos, convirtiéndose en la principal fuente de empleo y generador de divisas para el Departamento. El sector Bananero ha pasado por varias crisis entre éstas la sufrida en 1928 “La Masacre de las Bananeras” y actualmente se ve directamente afectado por el conflicto interno armado del país (década del 90).

**SISTEMA DE PRODUCCIÓN.** Áreas Planas; Siembra en Triangulo, distancia entre plantas 2,60 m., densidad de 1,700 plantas/Ha; Sistemas de Riego y Drenajes; Manejo de Arvenses; Programas de Nutrición acorde con resultado de análisis de suelo y Prácticas Culturales Propias del Cultivo.

**ASPECTOS FITOSANITARIOS.** Resaltan como principales Plagas al cultivo La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis Morelet*), El Moko (*Ralstonia solanacearum*) y ocasionalmente Defoliadores (*Oiketicus* sp, *Opshiphanes* sp) ó Picudo (*Cosmopolites* sp, *Metamasius* sp).



## *El crecimiento de las exportaciones de banano en Perú y la importancia de las limitaciones fitosanitarias (virus)*

**Ciro Barrera Rojas**

Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA- Perú. [cbarrera@inia.gob.pe](mailto:cbarrera@inia.gob.pe).

En las costas de Tumbes y Piura hay alrededor de 5,500 hectáreas de banano orgánico que en los últimos años han experimentado rápidos incrementos en la exportación al pasar de 7 millones en el año 2003 a 47 millones de US \$ FOB en el 2009; es decir que en el lapso de seis años éstas se incrementaron siete veces, siendo los principales países de destino USA, Alemania, Holanda Bélgica y Japón. La mayoría de éstas plantaciones fueron instaladas utilizando hijuelos provenientes de campos comerciales, esta modalidad de propagación anti técnica da lugar a que las enfermedades producidas por virus sean transferidas conjuntamente con el material de propagación (hijuelos) a las nuevas plantaciones con el consiguiente efecto en la reducción de los rendimientos y el deterioro de la calidad de la fruta que al final se ve reflejada en el 25 % de pérdida por no alcanzar los calibres requeridos para la exportación.

El proyecto FAT de Virus en Musáceas (Plátano y Banano) de Importancia Económica en la CAN permitirá superar estas limitaciones mediante la elaboración de un paquete tecnológico para la identificación, detección y diagnóstico oportuna de los virus más importantes que afectan al banano y plátano como Banana Streak Virus (BSV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Banana Bunchy Top Virus (BBTV), Banana Brack Mosaic Virus (BBrMV), Banana Mild Mosaic Virus (BanMMV) y Abacá Mosaic Virus (AbaMV). La detección temprana de estos patógenos, permitirá establecer un programa de producción de plantas madres elites libres de virus para la propagación de hijuelos de bananos y plátanos de calidad, así como facilitar el intercambio de material genético entre los países integrantes de la CAN. Estas innovaciones constituyen aportes al fortalecimiento de las actividades agro exportadoras del banano y a la seguridad alimentaria de 5 millones de habitantes de la Selva Peruana donde el plátano constituye la principal fuente alimenticia.

## **Biología computacional**

**Leonardo Mariño Ramírez**

National Center for Biotechnology Information (NCBI)-United States of America. marino@ncbi.nlm.nih.gov.

La biología computacional y la bioinformática son disciplinas que han evolucionado rápidamente en las últimas dos décadas para responder a los retos generados por los altos volúmenes de datos genómicos presentes en las bases de datos públicas. El National Center for Biotechnology Information (NCBI) tiene la misión de desarrollar nuevas tecnologías de información para ayudar a comprender los procesos moleculares y genéticos fundamentales de los sistemas biológicos. El sistema Entrez de NCBI integra una gran cantidad de bases de datos biológicas que le permiten al investigador navegar por la literatura, genomas, proteomas, taxonomías, datos de expresión y de variación, entre otros. El NCBI cuenta con recursos genómicos, taxonómicos y de alineamientos especializados para realizar minería de datos a partir de genomas virales y de viroides. Estos recursos especializados son actualizados frecuentemente y se convierten en una herramienta fundamental para el experimentalista.

## *Herramientas moleculares para el diagnóstico y control de las enfermedades virales*

**Javier Romero Cano**

Departamento de Protección Vegetal, INIA, Carretera de La Coruña Km. 7.0, 28040-Madrid, España. Email: romero@inia.es.

La detección de virus en material vegetal, necesita métodos específicos, sensibles y de uso rutinario. La Biología Molecular ha proporcionado herramientas para estos fines, entre las que destacan las hibridaciones y la PCR. Ambas técnicas tienen como inconveniente la preparación de extractos, que pueden ser evitados, usando las impresiones sobre membranas para ambas técnicas o la inmunocaptura para la PCR. La sensibilidad del método también se puede ampliar usando la quimioluminiscencia en el revelado de las hibridaciones o diferentes variantes de la PCR puestas a punto para este fin: Heminested-PCR, PCR-ELISA, Nested-PCR en un solo tubo o Co-PCR. El uso de la PCR a tiempo real es una gran técnica que tiene la ventaja de su alta sensibilidad y poder realizar todo el proceso en un solo equipo, sin embargo, su gran inconveniente es su alto coste, la preparación de las muestras y no ser una técnica apropiada para uso rutinario. La desinfección de las herramientas de trabajo para evitar su contaminación por virus, puede realizarse usando otras sustancias diferentes de la lejía como puede ser 0.5% NaOH ó 20 % de leche en polvo desnatada conteniendo 0.1 % de Tween 20. El mejor método de control molecular que ahora disponemos para combatir estas enfermedades es la producción de plantas transgénicas resistentes a virus (PTRV), sin embargo, después de 25 años de trabajos en este campo solo 2 PTRV están funcionando de forma comercial y otras 5 están en vísperas de salir al mercado. Actualmente se dispone en los laboratorios PTRV de casi todos los cultivos, pero el alto coste y tiempo de la solicitud de autorización y el rechazo de la sociedad a las plantas transgénicas constituyen barreras que los científicos debemos vencer si queremos aumentar la producción de alimentos agrícolas para el consumo de la creciente población mundial.

## *Estandarización de la técnica de Hibridación por Tissue - Print y Dot Blot con sondas de Digoxigenina para el diagnóstico de CMV y BSV en plátano y banano*

*Becerra, Juan Pablo<sup>1</sup>, Gartner, Felipe<sup>1</sup>, Zuleta, Cristian<sup>1</sup>, Betancourt, Mónica<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Estudiantes semillero de investigación en Evolución de patógenos, Universidad Santa Rosa de Cabal, UNISARC, Colombia. <sup>2</sup>Profesora titular Fitopatología, Universidad Santa Rosa de Cabal, UNISAR, Colombia. [decagricolas@unisarc.edu.co](mailto:decagricolas@unisarc.edu.co).

Uno de los métodos principales para el diagnóstico de virus de plantas es la técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), la cual se basa en el reconocimiento de epítopes específicos de la proteína de la cápsida del virus. A pesar de la popularidad de esta técnica, en muchos casos puede resultar inespecífica por la baja concentración en las plantas o por la alta variabilidad de las poblaciones de virus, por esta razón otras técnicas basadas en biología molecular representan una buena oportunidad para el diagnóstico de virus. En este trabajo se desarrollaron sondas de RNA viral marcadas con digoxigenina para la detección de dos virus de importancia económica en musáceas: el virus del mosaico del pepino, CMV y el virus del rayado del banano, BSV. La técnica mostró niveles de sensibilidad mayores para la detección de ambos virus comparada con ELISA y permitió estandarizar la técnica de diagnóstico a partir de impresiones de tejido – tissue print, la cual puede representar una oportunidad para la aplicación directa con los agricultores.

## ***Micropropagación de plátano (*Musa balbisiana*) y banano (*Musa acuminata*)***

***Marta Leonor Marulanda Ángel y Ana María López Gutiérrez***

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Tecnológica de Pereira, E- mail: ubioteve@utp.edu.co, Telefax: 57-63215995, Pereira (Colombia).

La micropropagación consiste en cultivar de forma aséptica diferentes explantes de la planta, constituidos por fracciones de un tejido u órgano, los cuales tienen potencial de diferenciación para generar otro individuo. La micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *In vitro*. La propagación vegetativa tradicional de plátanos y bananos (Familia Musaceae), se hace a partir de yemas que surgen alrededor del cormo, llamados comúnmente “colinos”, otras estructuras ampliamente utilizadas como los “puyones” son más jóvenes. Ambos tipos de propágulos permiten la transmisión de patógenos sistémicos y vasculares, además a menudo, se presenta poca oferta de material vegetativo para el establecimiento de plantaciones grandes y sanas. La micropropagación permite producir material libre de un gran número de patógenos, establecer cultivos con plantas sanas y evitar así, la diseminación de problemas sanitarios. Con la micropropagación a partir de un meristemo se pueden obtener hasta 15.000 plántulas de plátano o banano en un año con porcentajes inferiores al 5 % en variantes somaclonales. La micropropagación debe tener especial cuidado en garantizar la conformidad de la variedad deseada, que la tasa máxima de mutantes somaclonales no sobrepase el 10%, además se sugiere realizar pruebas diagnósticas de fitopatógenos, especialmente Moko (*Ralstonia solanacearum*) y virus asociadas a los procesos de micropropagación. El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira ha trabajado alrededor de la micropropagación de plátanos y bananos desde hace 15 años con perspectivas investigativas y comerciales, acogiéndose a la normatividad nacional vigente. Los protocolos de micropropagación en dicho laboratorio, han sido totalmente establecidos, así como los protocolos de aclimatización y establecimiento posterior en campo. El Laboratorio de biotecnología vegetal ha desarrollado además, protocolos de propagación *In vitro* para otras especies filogenéticamente relacionadas con plátano y banano como son plantas del género *Heliconia* (Familia Heliconiaceae) con las cuales comparten importantes problemas fitosanitarios. De esta forma se ha contribuido al mantenimiento de la sanidad en cultivos de musáceas y heliconiaceas en la zona cafetera central colombiana.



## *Detección y caracterización de Cucumber Mosaic Virus-CMV. Agente causal del Mosaico del Banano y el Plátano en Colombia*

**Walther Turizo Álvarez, Jorge Evelio Ángel Díaz**

Laboratorio de Nacional de Diagnóstico Fitosanitario. Instituto Colombiano Agropecuario-ICA.  
E-mail: bio.molecular1208@gmail.com

Considerando que el agro colombiano tiene debilidades en el desarrollo y aplicación de herramientas de detección que sean viables en términos técnicos y económicos, es necesario estructurar plataformas de diagnóstico de enfermedades relevantes en el orden nacional e internacional que posean óptimas características de; sensibilidad, reproducibilidad, eficiencia, rapidez y sencillez. De esta manera, se generaría un mayor conocimiento de los patógenos y se ampliarían las posibilidades de establecer métodos adecuados para el manejo de dichas afecciones en los cultivos. Durante el seminario se abordó el estado del arte, a nivel de diagnóstico fitosanitario, de una de las enfermedades de tipo viral más importantes, que afecta los cultivos de plátano y banano en el país. Se analizaron brevemente, algunos conceptos básicos pero necesarios para el entendimiento de su etiología tales como; estructura, organización y clasificación taxonómica del agente causal, distribución geográfica, hospederos, infección, transmisión, sintomatologías, métodos de detección, entre otros aspectos fundamentales para entrar en contexto con la problemática expuesta. De igual forma, se plantearon los cimientos para la determinación de la variabilidad del CMV en Colombia y países de la CAN, a partir de amplificaciones de regiones parciales de los RNAs; 1, 2 y 3 de mencionado virus. Por lo tanto, el seminario; “Detección y caracterización de Cucumber Mosaic Virus-CMV agente causal del mosaico del banano y el plátano en Colombia” pretende exponer la problemática de dicha enfermedad y su respectivo agente etiológico, teniendo especial interés en abrir un campo de discusión y generar las bases para la estructuración de una plataforma de diagnóstico, tránsito y certificación de material vegetal libre de CMV en la CAN.

## **Correos electrónicos para contacto**

**Ida Bartolini Martínez**

Servicio Nacional de Sanidad Agraria-SENASA-Perú  
ibartolini@senasa.gob.pe

**Aurora Fraile**

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas CBGP-España  
aurora.fraile@upm.es

**Margarita Perea Dallos**

Departamento de biología Universidad Nacional de Colombia  
emperead@unal.edu.co

**Mónica Betancourt Vásquez**

Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Santa Rosa de Cabal (UNISARC)-Colombia  
decagricolas@unisarc.edu.co

**Marta Leonor Marulanda Ángel**

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Tecnológica de Pereira-Colombia  
ubioteve@utp.edu.co

**Ana María López Gutiérrez**

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Tecnológica de Pereira-Colombia  
ubioteve@utp.edu.co

**Javier Romero Cano**

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria Departamento de Protección Vegetal-INIA-España  
romero@inia.es

**Manuel G. Moreno Pérez**

Universidad Politécnica de Madrid UPM-España  
biotecol@gmail.com

**Leonardo Mariño Ramírez**

National Center for Biotechnology Information (NCBI)-United States of America  
marino@ncbi.nlm.nih.gov

**Jorge L. Benavides Ranilla** Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA- Perú  
jbenavides@inia.gob.pe

**Ciro Barrera Rojas**

Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA-Perú  
cbarrera@inia.gob.pe

**Jorge Evelio Ángel Díaz**

Líder proyecto Instituto Colombiano Agropecuario  
Jorge.angel@ica.gov.co

**Jaime Dueñas Narváez**

Integrante Proyecto-Colombia  
jadunar@hotmail.com

**Julián Martínez Henao**

Integrante Proyecto-Colombia  
ornatus30@gmail.com

**Erick Geovanni Hernández**

Integrante Proyecto-Colombia  
erickufps@gmail.com

**Edisson Chavarro Mesa**

Integrante Proyecto-Colombia  
bioedicha@gmail.com

**Walther Turizo Álvarez**

Integrante Proyecto-Colombia  
bio.molecular1208@gmail.com

**Silverio Alonso González Flórez**

Federación Nacional de Plataneros- FEDEPLATANO-Colombia  
silveriogonzalez2003@yahoo.es

**Javier García González**

Dirección Técnica de Análisis y diagnóstico Instituto Colombiano Agropecuario  
Javier.garcia@ica.gov.co

**Julio E. Sierra Jarma**

Instituto Colombiano Agropecuario-Seccional Magdalena  
julio.sierra@ica.gov.co

**John Jairo Alarcón**

Dirección Técnica de Regulación Sanitaria y Fitosanitaria Instituto Colombiano Agropecuario  
Jhon.alarcon@ica.gov.co

**Efraín Torres Ariza**

Dirección Técnica de Regulación Sanitaria y Fitosanitaria Instituto Colombiano Agropecuario  
efrain.torres@ica.gov.co

