

107013

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN POTEXVIRUS AISLADO DE PITAHAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus*) AFECTADA POR MOSAICO EN COLOMBIA

Helena Reichel¹, Rosalía Pérez² y Ana Karine Martínez³, Raúl Sedano³, Maritza Cuervo³, José Alejandro Arroyave³ y Francisco José Morales³

¹Laboratorio de Virología Vegetal, Programa Nacional de Recursos Genéticos Vegetales y Biotecnología Agrícola, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), A. A. 240142 Las Palmas, Bogotá, Colombia; ²Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Bioquímica y Nutrición, Cr. 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia; ³Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Unidad de Virología, A. A. 6713, Cali, Colombia.

RESUMEN

Observaciones al microscopio electrónico de extractos de plantas de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) afectada por un mosaico tenue, procedentes del municipio de Arbeláez, Cundinamarca, revelaron la presencia de partículas flexuosas de aspecto viral de aproximadamente 476 x 10 nm. Mediante IC-RT-PCR, se amplificó un fragmento de cerca de 370 pares de bases con una homología del 94% con el gen de la cubierta proteica del Virus X del cactus (CVX). Este es el primer reporte del CVX en pitahaya en Colombia.

Palabras claves: Virus X del cactus (CVX)

SUMMARY

Yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) plants showing mosaic symptoms, from the locality of Arbeláez, Cundinamarca, Colombia, were shown by electron microscopy to contain viral-like filamentous particles of ca. 476 x 10 nm. IC-RT-PCR amplified a fragment of ca. 370 base pairs, showing a 94% amino acid homology to the coat protein of *Cactus virus X* (CVX). This is the first report of CVX infecting yellow pitahaya in Colombia.

Keywords: *Cactus virus X* (CVX)

INTRODUCCIÓN

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) es una especie de la familia *Cactaceae*, aparentemente originaria del norte de Sur América (Rodríguez *et al.* 1993; Becerra, 1994). Colombia es el mayor productor de esta fruta en América Latina, principalmente los Departamentos de Valle, Cauca, Cundinamarca, Tolima, y Boyacá (Holmes *et al.*, 1995), Becerra, 1994). En 1990 existían aproximadamente 400 hectáreas de pitahaya amarilla para consumo interno y exportación, principalmente hacia el Japón (Zenner de Polanía, 1990). Desafortunadamente este mercado fue cerrado en 1989 debido a la presencia de la mosca de la fruta (Vidal y Abello, 1998). Actualmente existen en Colombia 180 hectáreas cultivadas de pitahaya amarilla, y se han reiniciado las exportaciones colombianas de pitahaya hacia el Japón, Europa y Estados Unidos (Agricultura y Ganadería, 2001).

Recientemente se observaron plantas de pitahaya amarilla con síntomas de mosaico tenue, cerca de plantaciones de *Musa sp.* donde se realizaba una prospección por la presencia de enfermedades virales. Teniendo en cuenta la importancia de la pitahaya amarilla en Colombia, se procedió entonces a determinar el agente causal del mosaico de la pitahaya amarilla y su posible relación con los virus aislados de *Musa spp.* en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y mantenimiento. Durante 1997 se observó un cultivo de pitahaya amarilla afectado por un mosaico tenue (Figura 1A) en la localidad de Arbeláez, Cundinamarca. Materiales propagativos de estas plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero en CORPOICA-Tibaitatá y posteriormente en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en Palmira, Valle.

Microscopía electrónica.

Se utilizó la técnica de maceración de tejido foliar y tefido negativo con acetato de uranilo, pH 4,0 al 2%, para su observación posterior en un microscopio electrónico (Hitachi 12 HU). Para estudios citológicos se produjeron secciones de tejido del tallo de una planta de pitahaya con síntomas de la enfermedad, utilizando un ultramicrotomo (Sorvall MT 6000). Las secciones se observaron con un microscopio electrónico (JEOL JEM-1010).

Síntesis y clonaje de ADN complementario (ADNc).

Se utilizó una sección del tallo de pitahaya con síntomas de mosaico como fuente de material para el presente estudio. Para amplificar parte del gen de la cubierta proteica (CP) y la región viral 3' no codificante, conocida en inglés como 'untranslated region'

(UTR), se utilizó el método de inmunocaptura y transcripción reversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (IC-RT-PCR) según Sharman *et al.* (2000). La síntesis del ADNc a partir del ARN viral se realizó mediante el uso de 200 Unidades de transcriptasa reversa Super Script II (GIBCO, BRL) en presencia de 10 pmoles del iniciador degenerado Poty 1 (5'-GGATCCCGGGTTT TTTTTTTTTTTTTT-3') para el extremo poliadenilado de ARN, 30 pmoles del iniciador degenerado DCCP (5'-TATGCNGCNTT YGAYTTCTTRGAYG-3'), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen, CA, USA), y 1 Unidad de polimerasa *Taq* (Ampli *Taq* DNA polymerase, Perkin Elmer). La PCR se realizó en un termociclador PTC-100 TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., USA), con el siguiente programa: 94 °C/1 min; 94 °C/20 s; 56 °C/1 min.; 72°C/1 min; por 35 ciclos y un ciclo final de 72°C/3 min.

El producto de la PCR se purificó usando el Kit 'Magic PCR System' siguiendo las instrucciones del productor (Promega, WI, USA) y posteriormente fue clonado en la cepa de DH5α de *E. coli* utilizando como vector el plásmido pCR® 2.1 del Kit TA Cloning (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Las colonias de *E. coli* fueron establecidas en el medio selectivo LB-agar con ampicilina, X-GAL, y el inductor IPTG para seleccionar los clones recombinantes. El ADN plasmídico se purificó usando el Kit

"Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification Systems" (Promega) y se observó en un gel de agarosa usando bromuro de etidio.

Análisis de secuencia. Se utilizó un secuenciador automático ABI Prism 377 (Perkin-Elmer). Las reacciones de secuenciación se hicieron con el juego de reacción de secuencias con terminadores "Big-Dye" de ABI prism y el iniciador M13. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa BLAST de la base de datos del GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microscopía electrónica.

Los tallos sintomáticos de pitahaya contenían partículas filamentosas con un diámetro de aproximadamente 10 nm y una longitud de 476 nm (Figura 1 B). En las células infectadas se observaron haces de partículas filamentosas en el citoplasma. La morfología y citopatología (Figura 1C) de estas partículas observadas son similares a las descritas para especies del género *Potexvirus* (Francki *et al.*, 1985; Brunt *et al.*, 1990).

Análisis moleculares.

Se amplificó un fragmento de ca. 370 pares de bases, pb (Fig. 2). Tres clones obtenidos de este fragmento se secuenciaron mediante el iniciador M13. El fragmento secuenciado tiene una homología del 94% con la proteína de la cubierta del Virus X del cactus (CVX), perteneciente al género de los *Potexvirus* (GenBank Af308158).

Estos resultados demuestran que el CVX se encuentra en Colombia infectando plantas de pitahaya amarilla. Este virus se puede diseminar mediante la propagación vegetativa, al sembrar estacas de pitahaya provenientes de plantas infectadas, así como por contaminación mecánica. Como medida de control se recomienda utilizar material de siembra certificado, libre del CVX.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por el Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola (ASHOFRUCOL) y por la Dra. Margarita Perea (Universidad Nacional de Colombia). Agradecemos al Sr R. Zerda (Fundación Santa Fé de Bogotá) por su colaboración en EM; Sra Clemencia de La Rotta (MIP, CORPOICA) por las muestras de pitahaya utilizadas en este estudio; y Sr. Antonio Rios (Produmedios) por su colaboración en fotografía.

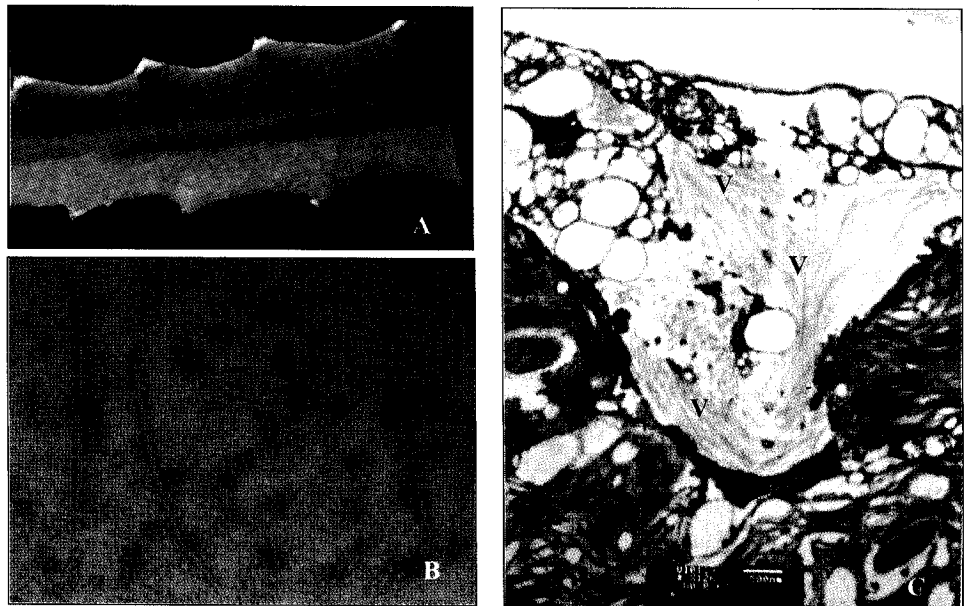


Figura 1. A. Síntomas de mosaico sistémico en tallo de pitahaya amarilla procedente de la localidad de Arbeláez, Cundinamarca. B. Partículas del Virus X del cactus (CVX) observadas en extractos de tallos de pitahaya amarilla de Arbeláez, Cundinamarca. C. Citopatología de células infectadas por CVX. Inclusiones fibrilares (V)

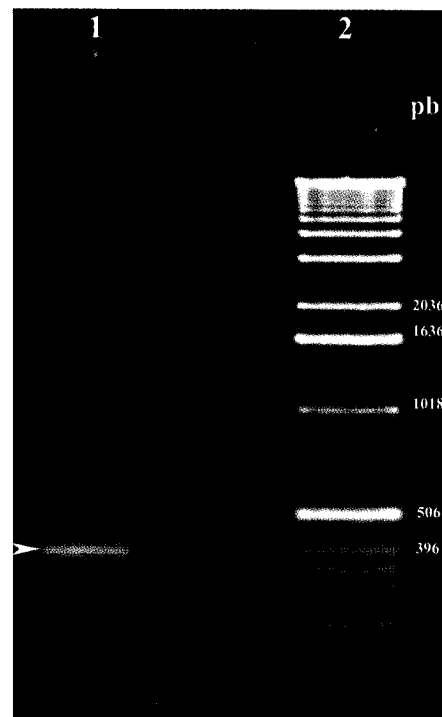


Figura 2. Carril 1= Producto amplificado por IC-RT-PCR, de una muestra de pitahaya infectada por el *Cactus virus X*; carril 2= Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (GIBCO, BRL).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agricultura y Ganadería, 2001. Aumentan exportaciones colombianas de pitahaya. *En: Periódico del Sector Agropecuario.* Año 3, No. 18.
- Becerra, L. A. 1994. El cultivo de la pitaya (*Selenicereus megalanthus*). In: Primera reunión internacional y segunda reunión nacional: Frutales Nativos e Introducidos

con demanda nacional e internacional. XXXV Aniversario Colegio de posgraduados en ciencias agrícolas. Montecillo, México. 1994. Pp.123-131.

- Brunt, A., Crabtree, K., y Gibbs, A. 1990. *Viruses of Tropical Plants.* CAB International. UK. Pp. 151.
- Francki, R. I. B., Milne, R. G., y Hatta, T. 1985. *Potexvirus Group, in: Atlas of Plant Viruses, Volume II.* Pp. 159-170.

Holmes Varela, C., Sánchez, M. de P. y Bravo, N. 1995. Estudio etiológico de la enfermedad "pudrición seca de la penca" en pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Fitopatología Colombiana* Vol.19 (1): 40-47.

Rodríguez Canto, A., Cruz García Alvarado, J., González Santarosa, Ma. G., Jiménez Ramos, C., Moreno, García, M. C., Pallares, Hernández, L. J., Ramírez, Lazo, V., Rosas, Medina, L., Rueda, Rodríguez, R., Trejo, Torres, E., Velasco, García, S., y Zárate Eloísa, E. 1993. El cultivo de la pitahaya en Yucatán. Universidad Autónoma Chapingo, Gobierno del Estado de Yucatán. Pp. 7-53.

Sharman, M., Thomas, J. E., y Dietzgen, R. G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of Virological Methods* 89: 75-99.

Zenner de Polanía, I. 1990. Biología y manejo de una nueva plaga en el cultivo de pitaya. In: ICA-informa. Revista trimestral del Instituto Colombiano Agropecuario, Vol. XXIV, No.1, pp5-8.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 26(1-2): 61-66, Copyright 2002.