

DETECCIÓN DE VIRUS EN MATERIAL VEGETAL DESHIDRATADO POR MEDIO DE ARN VIRAL DE DOBLE HEBRA¹

Virus detection in dehydrated plant material by double-stranded RNA analysis

Paulina Sepúlveda R.²

S U M M A R Y

Among virus diagnostic techniques, double-stranded RNA (ds-RNA) analysis has been used for virus detection in fresh plant material, but its use in dehydrated leaves kept in freezer for several years, has not been mentioned. The objective of this study was to use ds-RNA analysis as a tool of diagnosis in the detection of virus infection in dehydrated bean leaves.

Bean leaves dehydrated in calcium chloride and maintained in freezer (-20 °C) for 10 years were subjected to ds-RNA extraction. The material (68 samples) was obtained from a survey of virus infected bean fields during 1982/83 season, in different locations of the metropolitan, VI and VII regions of Chile.

The results obtained from ds-RNA analysis showed characteristic bands of virus groups, either in simple (88%) or mixed (12%) infections in the bean samples. According to the information of the ds-RNA analysis and ELISA test, cucumber mosaic virus (CMV) was the virus found more frequently on the samples (66%); a virus belonging to the potyvirus group (BCMV or BYMV or both) was present in 31% of the samples.

The present study was useful to demonstrate the efficiency of ds-RNA analysis as a diagnostic technique for the identification of virus infection in dehydrated plant material, and also to establish the presence of CMV affecting bean fields in Chile from 1983.

Key words: virus detection, ds-RNA, virosis, bean, electrophoresis, CMV, BCMV, BYMV.

INTRODUCCIÓN

Diversos métodos han sido usados en el diagnóstico o detección de una enfermedad viral, entre ellos, Salazar (1994) señala aquellos tradicionales y poco precisos como son la sintomatología y la inoculación en plantas indicadoras. Sin embargo, últimamente se han desarrollado métodos de mayor precisión, como son la serología (inmunodiagnóstico), la microscopía electrónica, hibridación de ácidos nucleicos, técnica del PCR (polymerase chain reaction) (Henson y French, 1993) y el uso de técnicas no específicas tales como la detección electroforética de ácido ribonucleico de doble hebra (ARN-dh). Esta técnica, desarrollada por Morris y Dodds (1979), para la detección de virus en plantas y hongos, permite la identificación de virus nuevos o poco conocidos, además de detectar infecciones mixtas por más de un virus.

La prueba de ARN-dh se basa en la premisa que las plantas no infectadas con virus o agentes virales, normalmente no contienen cantidades fácilmente detectables de segmentos homogéneos de ARN de doble hebra de gran tamaño molecular (mayor a $0,1 \times 10^6$ daltons) (Dodds, Morris y Jordan, 1984), por lo tanto, la presencia de este tipo de ácido nucleico sugiere la infección de virus en las plantas. Las principales ventajas de esta técnica son que no se necesita hacer una identificación tentativa del virus *a priori*; el patrón de ARN dh es consistente para el mismo virus en plantas diferentes; permitiendo, además, la identificación de una amplia gama de virus en una sola prueba (Bennett, 1994).

El objetivo de este estudio fue utilizar la prueba de ARN-dh como una herramienta de diagnóstico en la detección de virus en hojas deshidratadas de fréjol.

¹Recepción de originales: 15 de febrero de 1995.

²Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 349, Correo 3, Santiago, Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este estudio se utilizaron hojas de fréjol deshidratadas en cloruro de calcio y mantenidas en congelador a -20 °C durante 10 años. Este material (68 muestras) provenía de una recolección de plantas con virus realizada la temporada 1982/83, en diversas siembras de fréjol ubicadas en áreas de la Región Metropolitana, VI y

VII Región del país. Las plantas al momento de la recolección presentaban típicos síntomas asociados a aquellos producidos por los virus del mosaico común del fréjol (BCMV) y mosaico amarillo del fréjol (BYMV), como son mosaico (caracterizado por áreas verde claro y verde oscuro), enaciónes, moteado, hojas pequeñas, necrosis sistémica, etc. (Cuadro 1).

CUADRO 1. Muestras de fréjol recolectadas la temporada 1982/83 entre Región Metropolitana y VII Región, según fecha, localidad, variedad y sintomatología observada

TABLE 1. Bean samples collected during 1982/83 season in the Metropolitan, VI and VII Regions of Chile, according to date, location, variety and symptomatology

Fecha	Región	Localidad	Variedad	Síntomas ¹
18.01.83	RM	INIA-La Platina	Amanda	MA
07.03.83	RM	INIA-La Platina	Orfeo-INIA	MA
11.01.83	RM	INIA-La Platina	Coscorrón	MA
07.02.83	RM	INIA-La Platina	Orfeo-INIA	MA
07.02.83	RM	INIA-La Platina	Apolo	MA
07.02.83	RM	INIA-La Platina	Apolo	MA
11.01.83	RM	INIA-La Platina	Apolo	MA
18.02.83	RM	Las Melosas	Orfeo-INIA	MA
17.02.83	RM	Las Melosas	Tórtola-INIA	MA
18.02.83	RM	Las Melosas	Apolo	NS
17.02.83	RM	Las Melosas	Apolo	MA
18.02.83	RM	Las Melosas	Orfeo-INIA	MA
10.01.83	RM	Calera de Tango	Apolo	MA
10.01.83	RM	Calera de Tango	Apolo	MA
10.01.83	RM	Calera de Tango	Apolo	MA
20.01.83	RM	Graneros	Apolo	MA y MC
20.01.83	RM	Graneros	Cristal Bayo	MC
20.01.83	RM	Graneros	Coscorrón	MC y MA
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Tórtola	MC y MA
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Tórtola	MC y MA
18.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Tórtola	MA
10.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Coscorrón	MA
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Coscorrón	MA y MC
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Coscorrón	MA y MC
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Tórtola	MA y MC
07.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Tórtola	MC
20.01.83	VI	Rengo-Lo de Lobos	Coscorrón	MA y MC
18.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MC
20.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MC
18.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MC
18.01.83	VI	Chimbarongo	Bayos	MC
12.01.83	VI	Chimbarongo	Apolo	MA
20.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MC
17.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MA
17.01.83	VI	Chimbarongo	Tórtola	MA
07.01.83	VII	Teno-La Montaña	Cristal Bayo	MA
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Tórtola	MA
07.01.83	VII	Teno-La Montaña	Apolo	MA
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Apolo	MA
17.01.83	VII	Teno-La Montaña	Tórtola	MC
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Tórtola	MA
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Cristal Bayo	MA
17.01.83	VII	Teno-La Montaña	Apolo	MA

(Continuación CUADRO 1. Muestras de fréjol.....)

Fecha	Región	Localidad	Variedad	Síntomas ¹
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Cristal Bayo	MA
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Orfeo-INIA	MA
18.01.83	VII	Teno-La Montaña	Tórtola	MA
07.01.83	VII	Teno-5 km costa	Negro Argel	MA
18.01.83	VII	Teno-5 km costa	Coscorrón	MA
18.01.83	VII	Teno-5 km costa	Tórtola Diana	MA
07.01.83	VII	Teno-5 km costa	Coscorrón	MC
08.01.83	VII	Teno-5 km costa	Coscorrón	MC y MA
17.01.83	VII	Teno-5 km costa	Orfeo-INIA	MA
08.01.83	VII	Teno-5 km costa	Apolo	MA
29.01.83	VII	Teno-5 km costa	Tórtola	MA
23.01.83	VII	Teno-5 km costa	Tórtola Diana	MA
17.01.83	VII	Teno-5 km costa	Tórtola	MC
18.01.83	VII	Talca	Apolo	MA
18.01.83	VII	Talca	Tórtola-INIA	MA
18.01.83	VII	Talca	Tórtola Diana	MA
18.01.83	VII	Talca	Apolo	MA
18.01.83	VII	Talca	Apolo	NS
18.01.83	VII	Talca	Tórtola-INIA	MA
20.01.83	VII	San Clemente	Tórtola Diana	MC
18.01.83	VII	San Clemente	Apolo	MA
17.01.83	VII	San Clemente	Tórtola Diana	MA
18.01.83	VII	San Clemente	Apolo	MA
17.01.83	VII	San Clemente	Apolo	MA
17.01.83	VII	San Clemente	Apolo	MA

¹Síntomas: MA = hojas con moteado amarillo, hojas acartonadas; MC = hojas con mosaico, englobamiento; NS = necrosis sistémica.

La extracción y purificación de los ARN-dh a partir del material deshidratado fue realizado usando el método descrito por Valverde, Nameth y Jordan (1990) y FAO (1992), con algunas modificaciones. Se molieron 0,05 g de hojas de fréjol deshidratadas, en un mortero de porcelana, en presencia de 1,3 ml de tampón de extracción (10 ml de STE 10X (0,05 M Tris HCl; 0,1 M NaCl; 1mM EDTA; pH 7,0), 15 ml de SDS 10%, 250 µl de bentonita 25 mg/ml, volumen final 50 ml), 0,7 ml de fenol saturado con STE 2X y 0,7 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se traspasó a un tubo de ensayo y se homogeneizó, luego se dejó reposar por 20 min. a temperatura ambiente con agitación ocasional. La mezcla fue centrifugada a 8.000 rpm por 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregó etanol 95%, en una proporción de 21 µl/100 µl de fase acuosa (concentración final de etanol = 16,5%). El ARN-dh purificado se pasó por una microcolumna de celulosa, fibra media (SIGMA), equilibrada con STE/16,5% etanol. La columna fue lavada cuatro veces sucesivas con 1 ml de STE/16,5% etanol y finalmente se recuperó el ARN-dh con 500 µl de tampón STE sin etanol. El ARN-dh fue concentrado agregando 1/20 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol 95%, manteniéndose a -20 °C por toda la noche. Posteriormente, se

precipitó por centrifugación a 8.000 rpm por 15 min. y el "pellet" se resuspendió en 40 µl de tampón EG (5 ml tampón electroforesis (BE) 20X (0,04 M Tris; 0,02 M acetato de sodio y 0,001 M EDTA, pH 7,8), 20 ml glicerol 20%; 0,01 gramos de azul de bromofenol y aforado a 100 ml con agua destilada).

Las muestras (40 µl) se analizaron en geles verticales (160 x 140 x 1 mm) de poli(acrilamida al 6% (30: 0,8 = acrilamida: bisacrilamida), preparado en tampón de electroforesis (BE) 1X; y se sometieron a electroforesis (a temperatura ambiente) por un período de 3 horas a 110 volts, 60 mA, en el tampón BE (1X). Los geles se tiñieron con nitrato de plata (Igloi, 1983). Como controles positivos de virus se utilizaron hojas de plantas de fréjol inoculadas artificialmente con BCMV (Potyvirus), con un tamaño molecular de $3,1 \times 10^6$ daltons para el ARN de hebra simple (Walkey, 1985); y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Cucumovirus), con un tamaño molecular para los diferentes ARN-dh de: CMV-1 = $2,3 \times 10^6$, CMV-2 = $2,0 \times 10^6$, CMV-3 = $1,4 \times 10^6$, CMV-4 = $0,7 \times 10^6$ y CMV-satélite = $0,2 \times 10^6$ daltons (Dodds, 1993).

La prueba de ELISA, según lo descrito por Clark y Adams (1977), fue utilizada para la identifica-

ción de un virus en forma específica, considerando los resultados de la prueba de ARN-dh. En dichas pruebas se consideraron como valores positivos, todos aquellos que superaran en dos veces el valor de los controles sanos utilizados en cada prueba (Sepúlveda, 1989). Específicamente se utilizó la prueba de ELISA para el grupo Potyvirus y para el virus del mosaico del pepino.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de ARN-dh permitieron determinar la presencia de bandas electroforéticas características de grupos de virus en un 83% de las muestras (Figura 1). De éstas un 88% presentaba presencia de un solo grupo de virus, mientras que en un 12% de ellas se encontró una mezcla de dos grupos de virus.

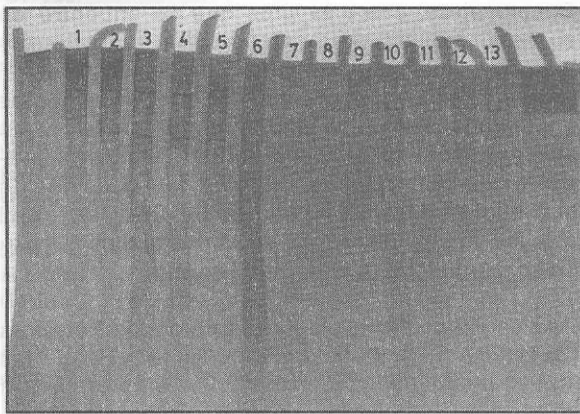


FIGURA 1. ARN-dh de hojas de fréjol deshidratado en geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata. Se observan bandas características de los diferentes grupos de virus encontrados, carriles 1, 2, 3 y 9. Se observa una banda superior típica del grupo Potyvirus; carriles 1, 2, 4, 5, 10, 12 y 13 se observa el patrón de bandas de CMV; carriles 7, 8 y 11 no se observan bandas.

FIGURE 1. ds-RNA of bean leaves dehydrated in silver nitrate-stained polyacrilamide gel. Typical bands of virus groups found shown, channels 1, 2, 3 and 9, an upper band typical of Potyvirus group; channels 1, 2, 4, 5, 10, 12, and 13 showed the characteristic pattern of CMV; no bands are shown on channels 7, 8 and 11.

Los resultados también indicaron que un 63% de las muestras positivas para virus presentaban un patrón de bandas bien características con 4 bandas y con una movilidad relativa de 0,09; 0,10; 0,135 y 0,27 y un 21,2% de las muestras presentaban un patrón que correspondió a una sola banda y con una movilidad relativa de 0,04. Los dos tipos de patrones mencionados anteriormente se relacionaron con los controles positivos (Potyvirus, BCMV, y virus del mosaico del pepino, CMV) y sugirió la presencia del virus del mosaico del pepino y un potyvirus (BCMV o BYMV) en las muestras. Además, las bandas presentes en las

muestras fueron similares a las encontradas por Romero *et al.* (1988) y Valverde *et al.* (1990) para muestras de tabaco y pepino, respectivamente, inoculadas con CMV, lo que sugiere la presencia de dichos virus en las muestras. También se encontró que un 2% de las muestras con virus presentaba una mezcla de los patrones antes señalados, sugiriendo la presencia de ambos grupos de virus en las plantas. Otro porcentaje de muestras reflejaron bandas que no fue posible asociar con grupos de virus conocidos, tanto en infecciones aisladas (3,5%) como en mezclas con potyvirus o CMV (8%). En la Figura 2 se observa un resumen de los diferentes grupos de virus encontrados en las muestras, tanto en infecciones aisladas como mixtas.

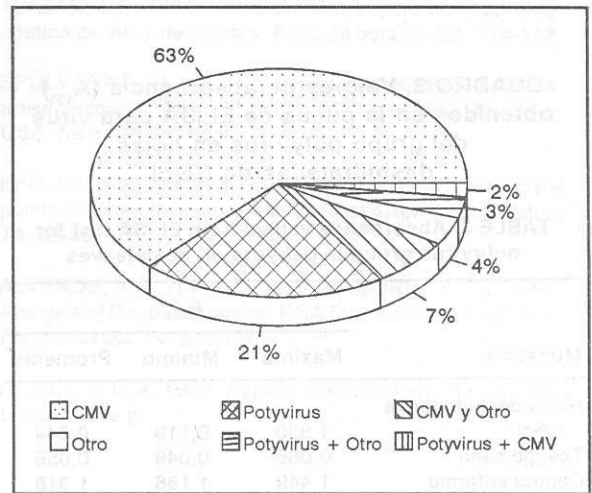


FIGURA 2. Distribución de virus (%) en muestras deshidratadas de fréjol. Temporada 1982/83; Región Metropolitana a VII Región.

FIGURE 2. Virus distribution (%) in dehydrated bean samples. Metropolitan, VI and VII Regions, Chile. 1982/83 season.

La prueba de ELISA realizada en algunas muestras con bandas similares a CMV (Cuadro 2), reflejó valores de absorbancia positivos para todas ellas, lo que indica la presencia de CMV en las muestras anteriormente señaladas. En el Cuadro 3, se observan los valores de absorbancia de la prueba de ELISA (para el grupo de los Potyvirus) realizada con algunas muestras que presentaron bandas características de este grupo, comprobándose la presencia de este grupo de virus en las muestras.

El uso de la prueba de ARN-dh permitió determinar que un 10% de las muestras presentaban infección mixta, situación que es factible de determinar con el uso de esta técnica; esto concuerda con lo mencionado por varios autores (Bennett, 1994; Salazar, 1994; Dodds *et al.*, 1984).

CUADRO 2. Valores de absorbancia (A_{405}) obtenidos en la prueba de ELISA para virus del mosaico del pepino en muestras de hojas deshidratadas de fréjol

TABLE 2. Absorbance values from ELISA test for cucumber mosaic virus in dehydrated bean leaves

Muestras	A_{405} ¹		
	Máximo	Mínimo	Promedio
Hojas deshidratadas fréjol ²	0,877	0,153	0,309
Testigo sano	0,072	0,060	0,065
Control enfermo	0,476	0,368	0,422

¹Valores obtenidos luego de 3 horas de colocado el sustrato.

²Valores de 10 muestras y dos repeticiones.

CUADRO 3. Valores de absorbancia (A_{405}) obtenidos en la prueba de ELISA para virus del grupo potyvirus en hojas deshidratadas de fréjol

TABLE 3. Absorbance values from ELISA test for potyvirus group in dehydrated bean leaves

Muestras	A_{405} ¹		
	Máximo	Mínimo	Promedio
Hojas deshidratadas fréjol ²	1,830	0,119	0,644
Testigo sano	0,066	0,049	0,056
Control enfermo	1,449	1,186	1,318

¹Valores obtenidos luego de 3 horas de colocado el sustrato.

²Valores de 10 muestras y dos repeticiones.

Los resultados de este estudio permitieron establecer la presencia de CMV en nuestro país desde 1983, situación que era desconocida, ya que la primera mención de la presencia de ese virus afectando fréjol en Chile fue realizada por Sepúlveda (1993). Esta información, es de gran relevancia para los trabajos de mejoramiento genético y las evaluaciones de resistencia de los genotipos en el campo, debido a lo señalado anteriormente en relación a la similitud de los síntomas entre CMV, BYMV y BCMV.

CONCLUSIONES

La prueba de ARN-dh resultó ser una herramienta muy adecuada para diagnosticar virus en las muestras deshidratadas de fréjol. Las pruebas de ARN-dh y ELISA permitieron identificar al virus del mosaico del pepino, perteneciente al grupo de los Cucumovirus, como el virus que se encontró en el mayor número de muestras (66%), infectándolas tanto en forma aislada como en mezcla. Al respecto, es importante señalar que los síntomas encontrados en las plantas, durante la recolección en la temporada 1982/83, se asociaron a la presencia de un potyvirus como BCMV o BYMV, lo que sugiere que los síntomas de CMV en fréjol son fácilmente confundibles con aquellos producidos por los virus antes mencionados.

Una banda perteneciente al grupo de los Potyvirus (BYMV y/o BCMV) se encontró en el 21% de las muestras en infección simple y 9% en mezcla con otros virus. También, se encontró un pequeño porcentaje de muestras que presentaban bandas de virus que no fue posible asociarlas con grupos conocidos.

RESUMEN

Dentro de las técnicas de diagnóstico de virus, la prueba de ARN-dh ha sido utilizada en la detección de virus en plantas a partir de material fresco, sin embargo, su uso en hojas deshidratadas y mantenidas por varios años en congelador, no ha sido mencionado.

El objetivo de este estudio fue utilizar la prueba de ARN-dh, como una herramienta de diagnóstico en la detección de virus en hojas deshidratadas de fréjol.

La extracción de los ARN virales de doble hebra fue realizada a partir de hojas de fréjol deshidratadas en cloruro de calcio y mantenidas en congelador por 10 años. Este material (68 muestras) provenía de una recolección de plantas con virus

realizada la temporada 1982/83, en diversas siembras de fréjol ubicadas en áreas de la Región Metropolitana, VI y VII Región.

Los resultados de las pruebas de ARN-dh indicaron que un 88% de las muestras infestadas presentaban sólo un grupo de virus mientras que en un 12% de ellas se encontró una mezcla de dos grupos de virus. Mediante la prueba de ELISA, y de acuerdo a la información generada en la prueba de ARN-dh, se identificó el virus del mosaico del pepino (CMV), como el de mayor incidencia (66%). Uno o más virus pertenecientes al grupo de los potyvirus (el virus del mosaico común del fréjol y/o el virus del mosaico amarillo del fréjol), se encontró en el 31% de las muestras.

El presente estudio permitió demostrar la eficiencia de la prueba de ARN-dh en el diagnóstico de virus en material deshidratado, como también establecer la presencia de CMV en siembras de

fréjol en Chile desde el año 1983, situación que era desconocida.

Palabras claves: detección de virus, virosis, ARN-dh, fréjol, electroforesis, CMV, BCMV, BYMV.

LITERATURA CITADA

- BENNETT, D. 1994. El rol de la fitopatología para satisfacer la demanda de alimentos de la creciente población mundial. *Fitopatología* 19(3) : 167-171.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virology* 34: 475-483.
- DODDS, J.A., MORRIS, T.J. and JORDAN, R.L. 1984. Plant viral Double-Stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathology* 22: 151-168.
- DODDS, J.A. 1993. ds-RNA in diagnosis, In: Matthews, R.E. F. (ed.). *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press Inc., USA. 374 p.
- FAO, 1992. Técnicas de biología molecular aplicables en el diagnóstico de virus de las plantas. FAO. Serie RLAC/92/04 REDBIO-2. 44 p.
- HENSON, J.M. y R. FRENCH. 1993. The polymerase chain reaction and plant diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathology* 31: 81-109.
- IGLOI, G.L. 1983. A silver stain method for detection of nanogram amounts of tRNA following two dimensionals electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 134: 184-188.
- MORRIS, T.J. and DODDS, J.A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopatology* 69: 854-858.
- ROMERO, J., BLAS, C. CASTRO, S. y G. CARAZO. 1988. Double stranded RNA isolation: Kinetics of ds-RNA production and analysis of working conditions in the detection of plant viruses. *Fitopatología* 23 (1): 5-9.
- SALAZAR, L.F. 1994. Actualización: Importancia del diagnóstico de virus de plantas. *Fitopatología* 29 (2): 116-118.
- SEPÚLVEDA R., P. 1989. Studies on bean mild mosaic virus, a new disease of bean in Michigan. Michigan State University, USA. 59 p. (M.S. Thesis).
- SEPÚLVEDA R., P. 1993. Nuevos virus afectan al cultivo del poroto en Chile. *Investigación y Progreso Agrícola La Platina* 74: 30-33.
- VALVERDE, R.A., NAMETH, S.T. and JORDAN, R.L. 1990. Analysis of Double-Stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
- WALKEY, D.G.A. 1985. *Applied plant virology*. Heinemann, London. 329 p.