

INVESTIGACIONES

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS CHILENOS DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA SANDÍA TIPO II¹

Identification and characterization of Chilean isolates of Watermelon Mosaic Virus II

Humberto Prieto E.^{2,3}, Alicia Bruna V.³, Patricio Hinrichsen R.³ y Carlos Muñoz S.³

ABSTRACT

Watermelon Mosaic Virus II (WMV-II) affects yield and fruit quality of several cultivated Cucurbitaceae species. This study reports upon its distribution in Chile and the purification and molecular characterization of some WMV-II isolates. Data suggests that WMV-II is distributed throughout the IV and VI Regions, being the most frequently found virus in melon, watermelon and squash. WMV-II identification was based upon symptoms obtained with indicator plants and immunoassays carried out with polyclonal antibodies (ELISA test). Purification of this virus demonstrated that the WMV-II Chilean isolates coincide with literature descriptions. It is a filamentous particle of 730 nm, formed by two main proteins of approximately 32 and 66 kDa. These proteins were positively recognized by polyclonal antibodies in Western analyses. The 260/280 nm absorbance ratio was 1.4, very close to the 1.2 value reported for this virus elsewhere.

Key words: melon, potyvirus, Cucurbitaceae, coat protein.

INTRODUCCIÓN

El Virus del Mosaico de la Sandía tipo II (WMV-II), se identificó y describió por primera vez en Chile en el año 1974 afectando a varias cucurbitáceas (Auger *et al.*, 1974). Este virus pertenece a la familia de los potyvirus (Purcifull *et al.*, 1984) y está constituido por partículas filamentosas de 730 a 750 nm de largo, que en el

citoplasma de las células del hospedero inducen la formación de inclusiones cilíndricas conocidas como "pinwheels" (Purcifull *et al.*, 1984). Se transmite en forma no persistente, por varias especies de áfidos. Su rango de hospederos está restringido principalmente a las cucurbitáceas y a algunas leguminosas, causando una sintomatología caracterizada por la presencia de mosaico, moteado y deformaciones de la lámina foliar y, en algunos casos, clorosis intervenal y acortamiento de los entrenudos (Matthews, 1993).

El genoma corresponde a ARN de hebra simple (ssRNA) presente en copia única, con un tamaño aproximado de 10 kilobases (kb) (Brakke y Van Pelt, 1970; Purcifull *et al.*, 1984; Riechmann *et al.*, 1992). El extremo 3' contiene una región

¹Recepción de originales: 3 de noviembre de 1997.
Trabajo financiado mediante Proyecto FONDECYT N° 1950017.

²Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Casilla 233, Santiago I, Chile.

³Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439-3, Santiago de Chile. E-mail: hprieto@platina.inia.cl

conservada no traducida que es característica de los potyvirus y una "cola" del tipo poli-A (poli-adeninas), símil a un ARN mensajero. Para su replicación, al igual que todos los miembros de la familia de los potyvirus, WMV-II genera una poli-proteína de aproximadamente 320 kDa que posteriormente se autoescinde en productos como la proteína de cápside (CP, de 32 a 34 kDa); proteínas de inclusión nuclear (NI a y b, entre 50 y 70 kDa) y diversas proteasas (entre 49 y 54 kDa). La secuencia nucleotídica de la CP corresponde a una región de aproximadamente 850 bases contiguas a la región 3' no traducida del genoma. Unas 1.700 a 2.000 subunidades de la CP cubren cada hebra de ssRNA, generando una partícula viral de masa molecular $6,5 \times 10^3$ kDa (Hollins y Brunt, 1981). A la fecha, se ha caracterizado el gen correspondiente a la CP de cuatro aislamientos diferentes, los cuales exhiben aproximadamente un 92% de similitud (Frenkel *et al.*, 1989; Quemada *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Gara *et al.*, 1997).

En Chile no existe mayor información sobre las características moleculares de esta partícula viral identificada como WMV-II, por lo que un conocimiento más profundo de éstas permitirá el diseño de estrategias de control de este patógeno, incluida la ingeniería genética. Para implementar esta última estrategia, se debe conocer la estructura molecular del virus y las secuencias de algunos de sus genes.

En este trabajo se caracterizaron molecularmente aislamientos chilenos del virus con el fin último de clonar el gen de la CP para utilizarlo en el diseño de genes quiméricos que, al ser introducidos en variedades de melón de interés económico, permitan incorporar algún grado de resistencia o tolerancia al virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Durante los meses de enero y febrero de 1995, se colectaron muestras con síntomas de virosis

en plantaciones comerciales de melón (*Cucumis melo*), zapallo de guarda (*Cucurbita maxima*), zapallo italiano (*Cucurbita pepo*), pepino de ensalada (*Cucumis sativus*), sandía (*Citrullus lanatus*) y alcayota (*Cucurbita ficifolia*), distribuidas entre la IV a la VI Región de Chile. Los síntomas buscados fueron los característicos de la infección con WMV-II, es decir, hojas con mosaico, moteado y deformación de la lámina, con ocasional aclaramiento de nervaduras y acortamiento de los entrenudos (Matthews, 1993; Escaffi y Auger, 1974; Gajardo y Apablaza, 1996). Las muestras, colectadas en bolsas de polietileno y almacenadas en contenedores con hielo, se llevaron al laboratorio para determinar la presencia del WMV-II y de otros tres virus que infectan cucurbitáceas: el Virus del Mosaico del Pepino (CMV), el Virus del Mosaico Amarillo del Zapallo (ZYMV) y del Virus del Anillado de la Papaya (PRV), inicialmente descrito como WMV-I.

Detección del Virus

Las muestras recolectadas se analizaron mediante "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA), con anticuerpos policlonales obtenidos de AGDIA (Elkhart, IN, USA) o de SANOFI Diagnostic Pasteur (Marnes la Coquette, Francia). Para ello se molieron hojas con síntomas en presencia de soluciones amortiguadoras apropiadas según el tipo de virus a detectar. Para WMV-II y ZYMV se utilizó un amortiguador compuesto de NaCO_3 , 1,59 g/L; NaHCO_3 , 2,93 g/L; NaN_3 , 0,2 g/L; polivinilpirrolidina (PVP) 20.000, 2% a pH 9,6. Para CMV y PRV, en tanto, se utilizó NaCl , 8,0 g/L; Na_2HPO_4 , 1,15 g/L; NaH_2PO_4 , 0,2 g/L; KCl , 0,2 g/L; t-octilfenoxipolietoxiatenol (Tween-20), 0,5 g/L; PVP 20.000, 2% a pH 7,4. Los ensayos se revelaron por detección espectrofotométrica a 405 nm, de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, conjugada a un segundo anticuerpo. Aquellas muestras que dieron los más altos títulos de WMV-II, se almacenaron a -70°C para su posterior utilización.

Traspaso de WMV-II a plantas indicadoras y mantención en invernadero

Los 47 aislamientos con síntomas de WMV-II colectados se traspasaron, mediante inoculación mecánica, a plantas indicadoras recientemente germinadas de *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Chenopodium quinoa*, *Phaseolus vulgaris* cv. Coscorrón, *Pisum sativum* cv. Perfection y *Nicotiana tabacum* 'Samsun'. Para ello se molieron aproximadamente 5 g de hojas infectadas con el virus en 10 mL de solución amortiguadora de fosfato 10 mM a pH 7,0, a la que se le adicionaron 10 mM de Na₂SO₃ y 10 mM dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), como agentes estabilizadores. La suspensión se frotó sobre los cotiledones de melón y zapallo italiano y sobre hojas recientemente expandidas de las plantas hospederas, todas las que habían sido previamente espolvoreadas con carborundum. Luego de la inoculación, las hojas se lavaron con agua destilada. Cada 15 a 20 días se hicieron nuevas inoculaciones con el objeto de mantener una alta concentración del virus. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a 20 ± 3°C. Para la mantención de los aislamientos sólo se utilizaron plantas de zapallo italiano y de melón. La efectividad de traspaso se verificó mediante ensayos ELISA, tal como se describió anteriormente.

Purificación del virus

Se utilizó un protocolo modificado del descrito por Purcifull *et al.* (1984). Brevemente, por cada 100 g de tejido vegetal se adicionaron 200 mL de una solución de extracción compuesta de amortiguador fosfato 0,5 M a pH 7,5; 0,2% Na₂SO₃; 10 mM de etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA) y 24 mL de n-butanol, agitando la mezcla por 2 h a 4°C. Luego la mezcla se centrifugó a 10.000 g por 20 min. Se separó el sobrenadante y se agregó 1% de Triton X-100 (v/v), 6% de polietilenglicol (PEG) 8.000 (p/v) y 100 mM de NaCl y se agitó la mezcla por 1 h a 4°C. Nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y el precipitado se separó

para resuspenderlo con la ayuda de una bagueta de vidrio en 30 a 50 mL de amortiguador fosfato 50 mM a pH 8,2 con 10 mM de EDTA. Una vez resuspendido el precipitado, se centrifugó a 10.000 g por 15 min y al sobrenadante se le adicionó 8% de PEG 8.000 (p/v) y NaCl 100 mM. En estas condiciones se agitó por 30 min a 4°C y se centrifugó a 27.000 g por 15 min. El precipitado se resuspendió con aproximadamente 4 mL de amortiguador fosfato 50 mM a pH 8,2 más EDTA 10 mM, depositando esta resuspensión sobre una solución de CsCl al 30% (p/v) (d = 1,23 g/mL). Estas columnas se centrifugaron a 55.000 r.p.m. por 18 h a 20°C en un rotor Beckman tipo 70 Ti. Luego se extrajeron las distintas fracciones correspondientes a las bandas de sedimentación del virus. A cada fracción de interés se le determinó la razón de absorbancia a 260 - 280 nm.

Cada fracción colectada se diluyó a razón de 1:2 con amortiguador fosfato 50 mM a pH 8,2 más EDTA 10 mM y se centrifugó a 12.000 g por 10 min. Al sobrenadante se adicionó PEG 8.000 10% (p/v) y NaCl 100 mM. Luego se agitó 1 h y se centrifugó a 27.000 g por 20 min. Finalmente, este último precipitado se resuspendió en 100 µL de amortiguador fosfato 50 mM a pH 8,2 más EDTA 10 mM.

Microscopía electrónica

Para el análisis morfológico de las partículas purificadas, se realizó microscopía electrónica utilizando grillas de Cu de 300 mesh cubiertas con Colodion, sobre las que se depositó la muestra, la que contrastó con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 7,5) por 2-5 min. Las preparaciones se visualizaron con un microscopio electrónico Zeiss EM900.

Caracterización bioquímica del virus purificado

Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturilizantes.

Cada precipitado final se resuspendió en un mínimo volumen de amortiguador fosfato 50 mM a pH 8,2 más EDTA 10 mM. De este material, se cargaron 10 µL en un gel de poli(acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) (10%) que posteriormente se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Western-blot

Para identificar como proteínas virales de WMV-II a aquellas previamente separadas por electroforesis, éstas se electrotransfirieron a membranas Immovilon-P (Millipore). Para ello, los geles y las membranas se pusieron en contacto por 50 min a 4°C y 100 V bajo una solución de transferencia compuesta de Tris-HCl 25 mM, glicina 92 mM, 10% metanol a pH 8,3. Posteriormente estas membranas se incubaron por 3 h con solución de bloqueo compuesta de Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, 1% de seroalbúmina de bovino (BSA), 0,05% de Tween 20 a pH 7,6. Luego se adicionó en el mismo amortiguador el anticuerpo policlonal anti-WMV-II y se incubó por 2 h. Finalmente, se lavaron las membranas 3-5 veces con solución de bloqueo y se incubó por 2 h con los mismos segundos anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina utilizados en los ensayos ELISA. Como reactivo de coloración para revelar la unión del anticuerpo, se utilizaron 33 µL de azul de nitro-blue-tetrazolium (50 mg/mL) y 16,5 µL de bromocloroindolil fosfato (50 mg/mL en dimetilformamida) en presencia de 25 µL de MgCl₂ (1 M) en un volumen final de 5 mL de amortiguador Tris 100 mM (pH 9,6) + NaCl 100 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se resumen los resultados obtenidos mediante los ensayos de ELISA de las 47 muestras recolectadas, para la detección del WMV-II y de otros tres virus que también infectan cucurbitáceas: el potyvirus del mosaico del zapallo (ZYMV), el cucumovirus del mosaico del pepino (CMV) y el potyvirus del ani-

lado de la papaya (PRV), conocido originalmente como potyvirus del mosaico de la sandía tipo I (Purcifull *et al.*, 1984).

Todas las muestras recolectadas de melón, zapallo, pepino y zapallo italiano resultaron positivas para la presencia del WMV-II, alcanzando algunas de ellas un valor de absorbancia superior a 2,0. De siete muestras de sandía con síntomas analizadas, sólo una resultó negativa a la prueba de ELISA para el WMV-II. La única muestra de alcayota (*Cucurbita ficifolia*) evaluada, también resultó negativa para este mismo virus. Tres muestras de zapallo (N^{os} 12, 29 y 38) y una de melón (N^o 31) presentaron, además, una reacción positiva para el ZYMV y una muestra de sandía (la N^o 40) presentó sólo reacción al ZYMV, virus cuya presencia en Chile hasta ahora no ha sido reportada. Trabajos posteriores han permitido confirmar la presencia de ZYMV en nuestro país el que también ha sido caracterizado a nivel molecular (manuscrito en preparación).

En cuanto a la factibilidad de traspaso a hospederos herbáceos, en el caso del WMV-II todos los aislamientos causaron síntomas de bandeado de las nervaduras, moteado, mosaico y deformación de las hojas en plantas de *Cucumis melo* y *Cucurbita pepo*. En *Chenopodium quinoa*, se produjeron lesiones locales cloróticas y necróticas, en tanto que no hubo reacción en *Nicotiana tabacum* "Samsun", *Phaseolus vulgaris* cv. Coscorrón y *Pisum sativum* cv. Perfection (estos dos últimos resistentes a WMV-II). Esto corresponde a lo esperado para este virus de acuerdo a Smith *et al.* (1992). Todos estos resultados se verificaron mediante ensayos ELISA de muestras correspondientes a hojas de estos hospederos herbáceos.

Para el caso del ZYMV, el traspaso de las muestras de zapallo N^{os} 12, 29 y 38 y de las de sandía N^{os} 31 y 40 a *Luffa acutangula*, produjo en este hospedero síntomas sistémicos de mosaico y aclaramiento de nervaduras, lo que también indicaría la presencia de este virus en estas

Cuadro 1. Muestras analizadas mediante ELISA para la presencia del Virus 2 del Mosaico de la Sandía (WMV-II), del Virus del Mosaico del Pepino (CMV), del Virus del Mosaico Amarillo del Zapallo (ZYMV) y del Virus del Anillado de la Papaya (PRV)

Table 1. Samples analyzed by ELISA for the presence of watermelon mosaic virus type II (WMV-II), cucumber mosaic virus (CMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and papaya ringspot virus (PRV)

Nº	Muestra	Procedencia	WMV-2	ZYMV	CMV	PRV
1	Melón	Paine-El Copihue	+	-	-	-
2	Sandía	Lampa-El Porvenir	+	-	-	-
3	Melón	Lampa-C. Lovarga	+	-	-	-
4	Melón	Nancagua	+	-	-	-
5	Melón	Chépica	+	-	-	-
6	Melón	Los Tilos	+	-	-	-
7	Melón	Paine-N. Oriente	+	-	-	-
8	Melón	Paine	+	-	-	-
9	Melón	Paine	+	-	-	-
10	Zapallo	Los Tilos	+	-	-	-
11	Zapallo	Hospital	+	-	-	-
12	Zapallo	La Serena	+	+	-	-
13	Zapallo	La Serena	+	-	-	-
14	Melón	Colina-Santa Marta	+	-	-	-
15	Melón	Colina-Lo Arcaya	+	-	-	-
16	Melón	Pichidegua-Santa Carmen	+	-	-	-
17	Melón	Pichidegua-Santa Carmen	+	-	-	-
18	Sandía	Pichidegua-Santa Carmen	+	-	-	-
19	Melón	Pichidegua	+	-	-	-
20	Melón	Pichidegua-Los Romos	+	-	-	-
21	Melón	Patagua-Cerro	+	-	-	-
22	Melón	Patagua-Cerro	+	-	-	-
23	Melón	Patagua-Cerro	+	-	-	-
24	Melón	Patagua-Abajo	+	-	-	-
25	Melón	Patagua-Abajo	+	-	-	-
26	Melón	Colina	+	-	-	-
27	Melón	Colchagua	+	-	-	-
28	Melón	Palmilla	+	-	-	-
29	Zapallo	Nancagua	+	+	-	-
30	Melón	Nancagua	+	-	-	-
31	Sandía	Nancagua	+	+	-	-
32	Sandía	Colchagua	+	-	-	-
33	Melón	Cunaco	+	-	-	-
34	Zapallo	Colchagua	+	-	-	-
35	Zapallo	Cunaco	+	-	-	-
36	Sandía	Palmilla	+	-	-	-
37	Zapallo	La Platina-Santiago	+	-	-	-
38	Zapallo	Nancagua	+	+	-	-
39	Melón	Cunaco	+	-	-	-
40	Sandía	Cunaco	-	+	-	-
41	Zapallo	Nancagua	+	-	-	-
42	Sandía	Nancagua	+	-	-	-
43	Zapallo	La Serena	+	-	-	-
44	Pepino	La Serena	+	-	-	-
45	Alcayota	La Serena	-	-	-	-
46	Melón	La Serena	+	-	-	-
47	Zapallo Italiano	Curacaví	+	-	-	-

especies (Lisa *et al.*, 1981), tal como se confirmó por análisis de ELISA. Como se mencionó más arriba, estos resultados han sido confirmados mediante la caracterización molecular de este virus.

Dado que las muestras N^{os} 3 y 7 presentaron los mayores niveles de absorbancia en las pruebas de ELISA, se utilizaron éstas para purificar el WMV-II. En la Figura 1, se presenta una fotografía obtenida por microscopía electrónica (aumento 20.000 x) de la purificación obtenida a partir de la muestra N^o 7, donde se puede observar la presencia de partículas filamentosas de aproximadamente 730 nm de largo. La morfología general de estas partículas corresponde a un potyvirus y la longitud determinada tras la medición de 30 de ellas, también está dentro del rango de 730-750 nm dado por Purcifull *et al.* (1984) para el WMV-II. La determinación de la razón entre la absorbancia a 260 y 280 nm, valor que es una constante característica para todos los virus, resultó ser 1,4, un valor similar al de 1,2 dado para otras purificaciones de este mismo virus (Purcifull *et al.*, 1984).

Para confirmar que la partícula aislada efectivamente correspondía a la del WMV-II, se procedió a determinar la composición proteica de las partículas virales purificadas. Para ello se realizó un análisis del patrón electroforético de las proteínas presentes en dicha purificación, utilizando tinción con azul brillante de Coomassie R-250 de geles tipo PAGE-SDS al 10% del polímero. En la Figura 2, se observan los patrones del bandeo de las proteínas correspondientes a alícuotas del material obtenido de la Muestra N^o 7 (carril 3 de la Figura 2). Además, en el carril 5 de la misma Figura 2 aparece el mismo aislamiento, pero obtenido luego de ser traspasado a un hospedero herbáceo y posteriormente purificado. Las zonas contiguas a la banda principal del virus obtenida en la gradiente de densidad en CsCl prácticamente no contenían proteínas (carril 4), confirmando el equilibrio discreto del

virus en la forma de una sola banda en la gradiente de densidad. Como referencia, se muestran estándares de peso molecular alto (carriles 1 y 6) y bajo (carriles 2 y 7).

Tanto en la purificación hecha del material obtenido directamente en el campo como en aquella procedente de un hospedero herbáceo, pueden observarse principalmente dos proteínas: una de aproximadamente 66 kDa y otra de aproximadamente 32 kDa. Ellas corresponden, probablemente, a las proteínas de inclusión y de la cápside, respectivamente. Los pesos moleculares reportados por la literatura para la proteína de la cápside son de 29 a 32 kDa (Purcifull *et al.*, 1984).

Conocido este patrón electroforético, se procedió a caracterizar las proteínas visualizadas por la tinción mediante técnicas inmunológicas. Para esto, los geles obtenidos anteriormente se electrotransferieron a membranas con alta capacidad adherente para proteínas y sobre éstas se realizó su detección mediante los mismos anticuerpos policlonales anti-WMV-II utilizados para los ensayos ELISA. La Figura 3 muestra los resultados de este experimento, donde las dos proteínas separadas por PAGE-SDS reaccionaron específicamente con este anticuerpo policlonal. Los carriles 3 y 5 de la Figura 3 corresponden a purificaciones obtenidas de las muestras N^{os} 3 y 12. El carril 4 corresponde a una purificación de la muestra N^o 7, apreciándose una mucho mayor concentración del virus. Puede observarse la alta reactividad inmunológica de la proteína de 66 kDa (p66), especialmente si se considera su baja concentración relativa comparada con la proteína de 32 kDa. Esta mayor reactividad posiblemente se deba a una particular inmunogenicidad de esta proteína, dado que estos anticuerpos policlonales son preparados a partir de extractos virales totales, es decir, proporcionalmente se inmunizan los animales con una muy baja proporción de p66.

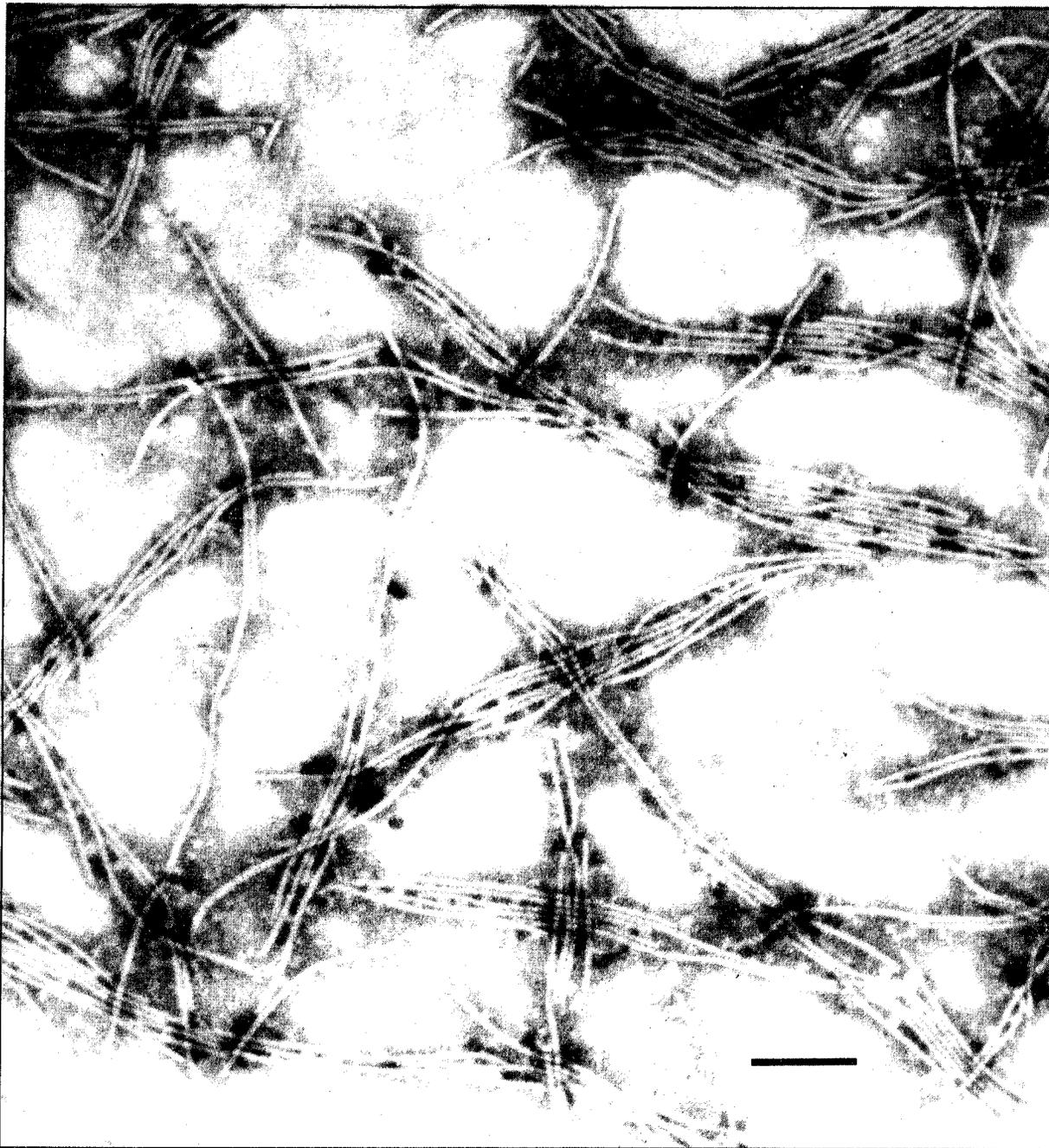


Figura 1. Partículas de WMV-II contrastadas con ácido fosfotúngstico y visualizadas mediante microscopía electrónica (aumento 20.000x). La barra mide 200 nanómetros.

Figure 1. WMV-II particles contrasted with phosphotungstic acid and observed under electronic microscopy (20,000x). Bar size is 200 nanometers.

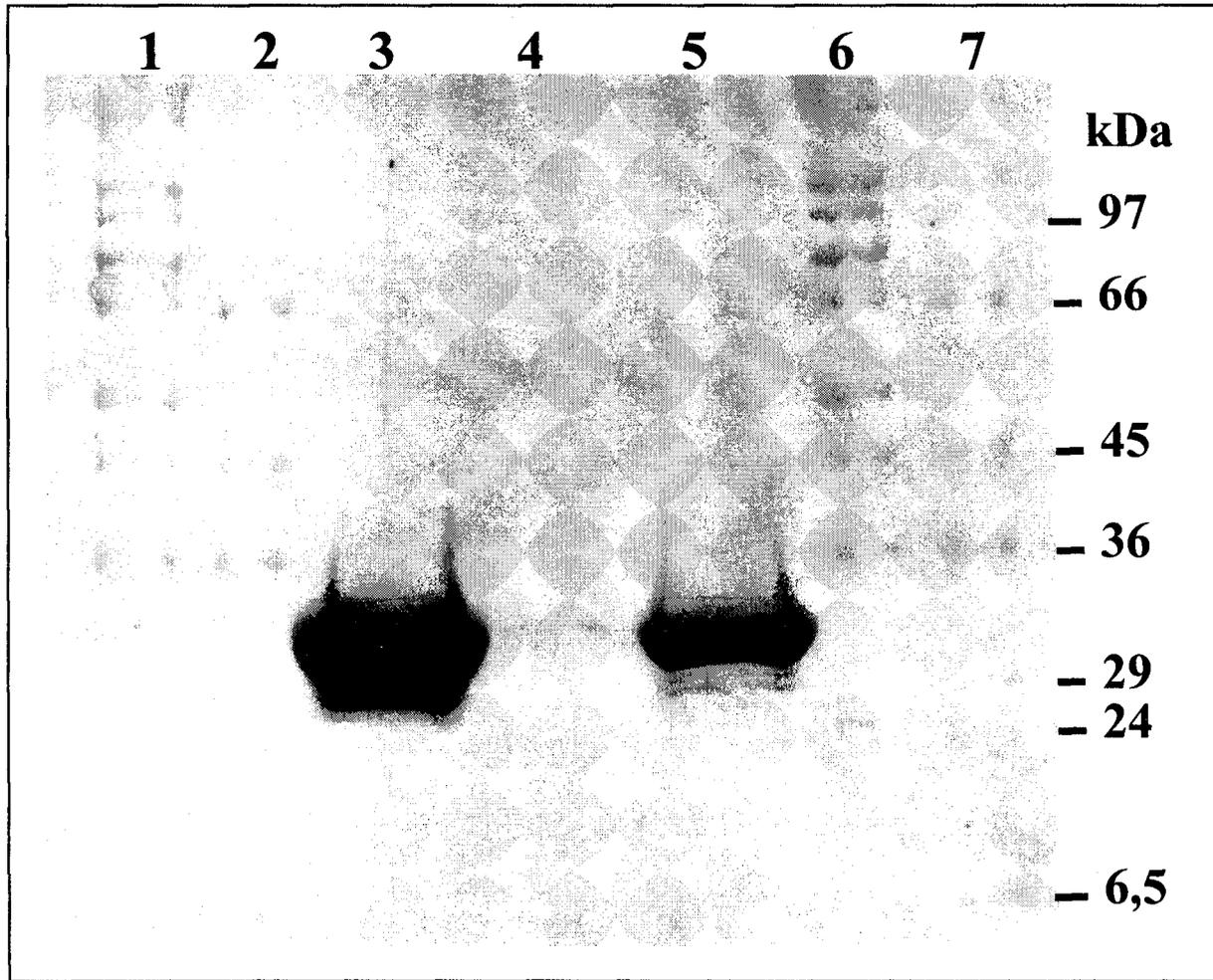


Figura 2. Electroforesis en geles al 10% de poliacrilamida-SDS de dos aislamientos de WMV-II teñidos con Coomassie Blue R250. Se indica a la derecha el tamaño en kDa de las bandas del estándar de peso molecular (carriles 1, 2, 6 y 7). Carriles 3 y 5: virus purificado desde la muestra Nº 7 directamente de campo o de hospedero herbáceo, respectivamente. Carril 4: zona contigua a la banda viral en la gradiente de CsCl.

Figure 2. Gel electrophoresis on 10% PAGE-SDS for two WMV-II isolates stained with Coomassie Blue R250. Molecular weight standards (in kDa) are indicated on the right side of each sample (lanes 1, 2, 6 and 7). Lanes 3 and 5: virus purified from sample Nr 7, directly from the field or after transmission to herbaceous host. Lane 4: sample obtained from the vicinity of the viral band on the CsCl gradient.

Los carriles 1 y 2 de la Figura 3, corresponden a alícuotas de extractos totales de hojas de hospedero herbáceo, es decir, sin aplicar un protocolo de purificación y posterior concentración por gradiente en CsCl; aquí se observó que, a pesar de la sensibilidad del método de detección inmunológico, no se logró detectar la presencia de los antígenos virales. De esta manera, un ensayo de este tipo ("Western blot") no tiene la sensibilidad necesaria como para realizar una detección directa del virus y una caracterización

inmediata de las proteínas que lo componen; por ello, es necesario realizar al menos una etapa previa de concentración que implique al menos la obtención de un extracto crudo mediante centrifugación diferencial con polietilenglicol (ver protocolo de purificación en Materiales y Métodos). Finalmente, la correspondencia de las dos proteínas visualizadas por PAGE-SDS con las detectadas por los anticuerpos en el "Western blot", indicó que la banda de equilibrio asignada al WMV-II correspondió a

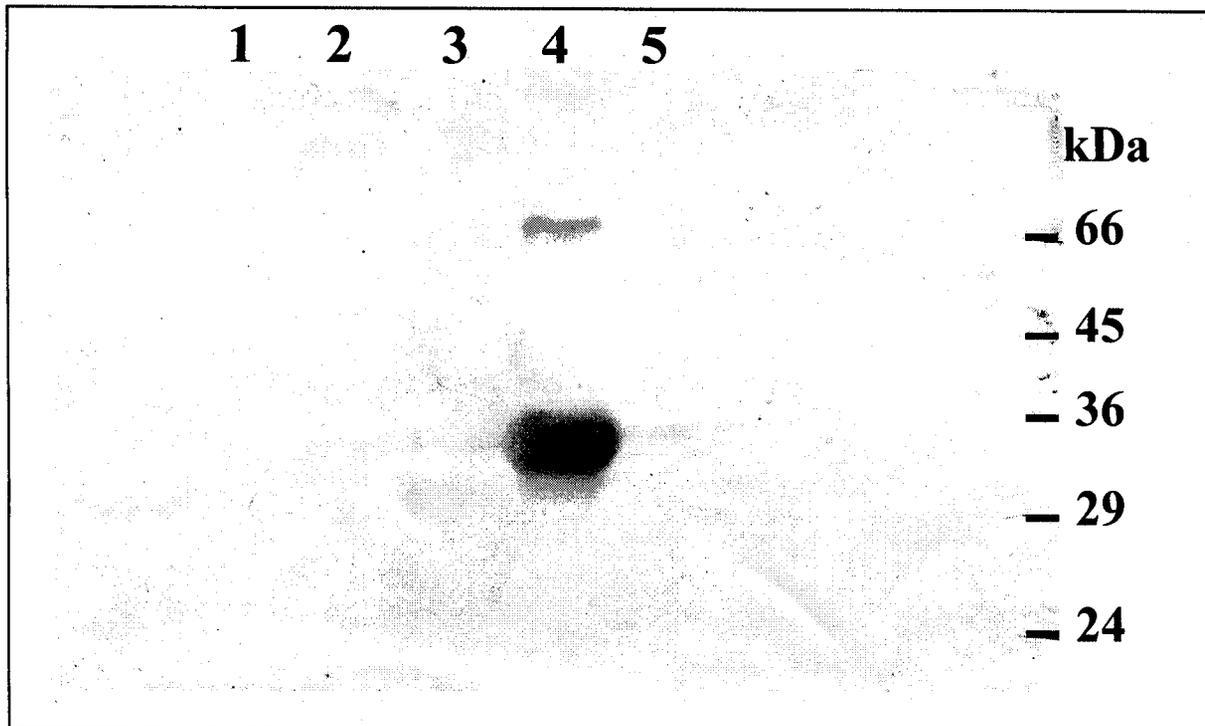


Figura 3. Western-blot de WMV-II. Se utilizó un primer anticuerpo anti-WMV-II de conejo y un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las barras negras representan la migración de estándares de peso molecular (Sigma). Carriles 1 y 2: extractos crudos de hojas de hospederos herbáceos. Carriles 3, 4 y 5: virus purificado de las muestras N° 3, 7 y 12, directamente de campo.

Figure 3. Western-blot using rabbit anti-WMV-II anti-body and a second antibody conjugated with alkaline phosphatase. Black bars indicate molecular weight standards (Sigma). Lanes 1 and 2: crude sap from herbaceous hosts carrying viral samples Nr. 3 and 12. Lanes 3, 4 and 5: virus purified from samples Nr. 3, 7 and 12 which were directly taken from the field.

este virus, descartando una probable contaminación con otras partículas virales en la purificación.

CONCLUSIONES

En este estudio se ha logrado la purificación y caracterización molecular del WMV-II presente en Chile. Mediante los análisis realizados en este trabajo, se confirmaron los informes realizados por Auger *et al.* en 1974, quienes describieron una alta prevalencia y amplia distribución geográfica del virus en los cultivos de cucurbitáceas a través del país.

A nivel molecular, los resultados indicaron que el aislamiento local de WMV-II no difiere

mayormente de aislamientos de otras partes del mundo en cuanto al tamaño y morfología de la partícula viral. Del mismo modo, el patrón proteico del virus purificado y la inmunoreactividad específica de las proteínas cuantitativamente más importantes confirmaron la identidad del virus, encontrándose una proteína de 32 kDa que correspondería a la CP del virus y otra de 66 kDa, tamaño descrito para la polimerasa viral.

La purificación y caracterización de una cepa local de WMV-II constituye la primera etapa de un trabajo conducente a obtener variedades de melón transgénicas, en las cuales se pretende introducir el gen viral que codifica para la CP, con el propósito de otorgar algún grado de resistencia o tolerancia a este virus.

RESUMEN

El Virus del Mosaico de la Sandía Tipo II (WMV-II) afecta el rendimiento y la calidad de la fruta en varias cucurbitáceas cultivadas. En el presente trabajo se estudió la distribución de este virus en el país y se purificaron y caracterizaron molecularmente algunos aislamientos. Los resultados indican que el WMV-II está ampliamente distribuido en Chile (desde la IV a la VI Región) y que es el virus más común presente en los cultivos de melón, sandía y zapallo. El virus se identificó en base a la sintomatología producida en plantas indicadoras herbáceas y por inmunoensayos con anticuerpos policlonales (ELISA). Purificaciones del virus permitieron

demostrar que los aislamientos chilenos corresponden con las descripciones dadas por la literatura para este virus, es decir, que se trata de un potyvirus poseedor de partículas filamentosas de 730 nm, constituidas por dos proteínas de aproximadamente 32 y 66 kDa. Estas proteínas fueron reconocidas positivamente por anticuerpos policlonales luego de ser electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. La razón de absorción a 260 y 280 nm fue de 1,4, valor cercano a 1,2 dado para este virus.

Palabras clave: melón, potyvirus, cucurbitáceas, proteína cápside.

LITERATURA CITADA

- AUGER, J.; ESCAFFI, O. AND NOME, F. 1974. Occurrence of watermelon mosaic virus 2 on cucurbits in Chile. *Plant Dis. Rep.* 58: 599-602.
- BRASSE, M. AND VAN PELT, N. 1970. Properties of infectious ribonucleic acids from wheat streak mosaic virus. *Virology* 42: 699-706.
- ESCAFFI, O. Y AUGER, J. 1974. Determinación del virus mosaico de la sandía (watermelon mosaic virus 2) en cultivos de cucurbitáceas en Chile. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía. *Boletín Técnico* Nº 38.
- FRENKEL, M.; WARD, C. AND SHUKLA, D. 1989. The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70: 2775-2783.
- GAJARDO, I. Y APABLAZA, G. 1996. Reacciones de tres cultivares de melón (*Cucumis melo* L.) al Virus del Mosaico de la Sandía, cepa 2 (WMV 2). *Fitopatología* 31: 173 (resumen).
- GARA, I.; KONDO, H.; MAEDA, T.; INOUE, N. AND TAMADA, T. 1997. Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of watermelon mosaic virus 2. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 113-117.
- HOLLINS, M. AND BRUNT, A. 1981. Potyvirus group. CMI/AAB descriptions of plant viruses Nº 245. Kew, Surrey, England.
- LISA, V.; BOCCARDO, G.; D'ANGOSTINO, G.; DELAVALLE, G. AND D'AQUILIO, M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71: 668-672.
- MATTHEWS, R. 1993. *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 375 p.
- PURCIFULL, D.; HIEBERT, E. AND EDWARDSON, J. 1984. Watermelon mosaic virus 2. CMI/AAB descriptions of plant viruses Nº 293 (Nº 63 revised). Kew, Surrey, England.

- QUEMADA, H.; SIU, L.; SIEMIENIAK, D.; GONSALVES, D. AND SLIGHTOM, J. 1990. Watermelon mosaic virus 2 and zucchini yellow mosaic virus: cloning 3'-terminal regions, nucleotide sequences and phylogenetic comparisons. *J. Gen. Virol.* 71: 1451-1460.
- RIECHMANN, J.; LAÍN, S. AND GARCÍA, J. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. AND MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2nd edition.
- SMITH, I.; DUNEZ, J.; LELLIOTT, R.; PHILLIPS, D. Y ARCHER, S. 1992. *Manual de Enfermedades de las Plantas*. Mundi-Prensa. Madrid. 671 p.
- WANG, Y.; BECK, D.; GARDNER, R. AND PEARSON, M. 1993. Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of watermelon mosaic virus 2. *Arch. Virol.* 129: 93-103.