

CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS ASOCIADOS A LAS VIROSIS EN AJO, CEBOLLA Y PIMIENTO EN EL ECUADOR.

Sergio Miguel Vélez Zambrano¹, Jefferson Bertin Vélez Olmedo^{2,3}

Jairo Johan Cedeño Dueñas¹

¹ Carrera de Ingeniería Agrícola, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, Km 2.7 Vía Calceta-El Limón.

² Departamento de Fitopatología, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brasil.

³ Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí. Portoviejo, Ecuador.

Resumen

La producción de hortalizas en el Ecuador representa una fuente importante de generación de ingresos para los agricultores y las personas relacionadas con esta actividad. Las enfermedades provocadas por virus ocasionan severos trastornos en el desarrollo de las plantas y afectan la capacidad productiva de las mismas. En el Ecuador se presentan diversas especies de virus afectando a las plantas hortícolas en las regiones productoras. Actualmente existe información científica que respalda estos trabajos y que se hace imprescindible presentarla de una manera más integrada. Por estas razones el motivo de este levantamiento de información está focalizado en agrupar la documentación existente sobre los virus que han sido reportados en los cultivos de hortalizas y así, poder tener una visión más integral de la realidad actual sobre las enfermedades virales de ajo, cebolla y pimiento en el Ecuador.

Palabras clave: virus, hortalizas, virosis, enfermedades

Introducción

El Ecuador es un país con una significativa producción de cultivos de hortalizas, las que principalmente son consumidas en estado fresco por la población. La producción de hortalizas representa unos de los principales rubros de ingreso

económico para muchas familias del Ecuador, destacándose el ajo, la cebolla y pimiento con una producción de 523; 41916; 5517 Tm respectivamente (Sinagap, 2012).

La productividad de estos cultivos hortícolas puede verse afectada drásticamente por problemas fitosanitarios, dentro de este tipo de fisiopatologías se destacan principalmente los virus, que son patógenos muy importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En general, los virus afectan el metabolismo de las células, alterando su desempeño normal provocando síntomas como achaparramiento, clorosis, mosaicos, moteados, reducción de la lámina foliar, lo que deriva en disminución del desarrollo y rendimiento de los cultivos (Zitter y Banik 1984) (Agrios, 2005).

En el Ecuador, uno de los primeros trabajos en los cuales se relató la ocurrencia de virus en pimiento fue el realizado por Chalá (1978), donde se encontro: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Potato virus Y* (PVY) y *Tobacco etch virus* (TEV) infectando plantaciones de provincias del Litoral ecuatoriano, para corroborar estos análisis fueron realizadas pruebas de Reacción Serológica.

En la actualidad, a más de las técnicas serológicas (DAS-ELISA), se están utilizando ampliamente otras metodologías como la identificación molecular de virus por medio de la RT-PCR (Reverse transcription- Polymerase Chain Reaction) y PCR (Polymerase Chain Reaction) que permiten una identificación más precisa en base al análisis de la secuencia de de amino ácidos de las partículas virales (Zerbini *et al.*, 2001).

En el Ecuador en los últimos años viene usándose masivamente estas técnicas para realizar la identificación de estos fitopatógenos, lo que ha permitido diagnosticar con mayor precisión la ocurrencia de virus en los cultivos de hortalizas en el país, pero aun así estos reportes no se encuentran agrupados en un solo trabajo investigativo, lo que puede generar cierta confusión y uso inadecuado de la información existente. Debido a estas razones el objetivo de esta revisión es recopilar con la mayor precisión posible, la información existente sobre las enfermedades ocasionadas por virus en los cultivos de ajo, cebolla y pimiento del Ecuador.

Materiales y Métodos

El método utilizado para realizar esta revisión fue la recopilación de material bibliográfico disponible en diversas fuentes de información como trípticos, memorias de congresos, tesis investigativas, libros, artículos científicos donde se encuentre información relevante sobre las enfermedades virales relacionadas en hortalizas, ya sea por medio del uso de técnicas clásicas de identificación como es detección serológica de virus Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), hasta el uso de herramientas moleculares RT-PCR y PCR, para el análisis de ácidos nucleicos (RNA y DNA)

Resultados

Técnica de Elisa

Este procedimiento consiste en que una enzima (Fosfatasa alcalina) está ligada a un anticuerpo que posee una capacidad discriminadora y reconoce un antígeno determinado, (Tortorello y Gendell 1997). Si el antígeno (Partícula viral que dio origen al anticuerpo) se encuentra presente, el complejo anticuerpo-enzima se unirá a él y la enzima catalizará la reacción sobre el sustrato incoloro. De esta manera, la presencia del producto colorido (cambio de color del sustrato) indica la presencia del antígeno (Goldsby *et al.*, 2000). La intensidad del color es proporcional a la cantidad del antígeno enlazado con el anticuerpo conjugado. De esta manera, mediante la intensidad de color producido se puede calcular la cantidad de antígeno en una muestra. Este método es eficiente debido a que permite detectar la cantidad de proteínas en nanogramos (Sadasivam y Manickam 1996).

En la técnica de Elisa se deben seleccionar anticuerpos que pueden ser monoclonales o policlonales, el uso de anticuerpos monoclonales da como resulta mayor especificidad en el proceso, dentro de los métodos de ELISA, se destaca el Elisa sandwich que consiste en que un anticuerpo de un antígeno particular que es absorbido (sensibilización de la placa). Luego el antígeno es adicionado y se liga al anticuerpo (primero). Finalmente un segundo anticuerpo Conjugado a la enzima es adicionado (Jay *et al.*, 2006).

La técnica de ELISA en membranas de nitrocelulosa, es un método indirecto que se usa para la detección de virus de plantas en el cual se fija el virus objeto de identificación en una membrana de nitrocelulosa y unir los anticuerpos específicos con el virus. En un paso subsecuente se debe determinar la presencia del complejo

virus-anticuerpo contra los anticuerpos específicos del virus que han sido marcados con una enzima (Salazar 1995).

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis; con esta metodología se pueden producir varias copias de un fragmento de ADN específico en el laboratorio, incluso existiendo otras moléculas de ADN en la muestra. Como su nombre lo indica está basada en la actividad de la enzima ADN polimerasa para fabricar otra cadena de ADN que sea complementaria a la existente. Para que esto ocurra se necesita de la presencia de nucleótidos y un fragmento de ADN que sirva como iniciador de la amplificación, que se da en progresión geométrica, estos oligonucleótidos son conocidos como Primers (Langeveld *et al.*, 1991) (Hill y Stewart 1992) (Atawodi *et al.*, 2010).

Transcripción reversa de la Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de transcripción reversa (RT-PCR) combina la síntesis de ADN complementar con la reacción en cadena de la polimerasa para proporcionar un método rápido y que a su vez sea sensible durante el análisis de la expresión génica. Esta metodología se usa para cuantificar la expresión del ARN mensajero, frecuentemente de una pequeña concentración de ARN (Santos *et al.*, 2002) (Santos *et al.*, 2003).

Para la detección de virus de ARN, la transcripción reversa un paso extra que se debe realizar antes de la ejecución de la PCR. Como las polimerasas termoestables son ADN polimerasas dependientes de ADN, la hebra de ARN de virus se convierte en una hebra de ADN complementar (cDNA), Lo anterior es realizado por la enzima conocida como Transcriptasa reversa (Zerbini *et al.*, 2001).

La Muestra para RT-PCR puede ser ARN total o poli ARN seleccionado. Las reacciones de RT se pueden preparar con primers aleatorios, oligo (dT), o primers específico de gen (GSP) conocido usando una transcriptasa inversa. La RT-PCR puede realizarse en dos o en un solo paso. En la RT-PCR en dos pasos, cada paso se realiza bajo condiciones óptimas. La síntesis de cDNA se realiza primero en tampón RT y se elimina una décima parte de la reacción para PCR. En la RT-PCR

de un solo paso, la transcripción inversa y la PCR tienen lugar secuencialmente en un solo tubo en condiciones optimizadas para RT y PCR (Santos *et al.*, 2002).

Virus en plantas de la familia Amaryllidaceae

A partir de muestras con síntomas de rayado clorótico y enrollamiento foliar (leaf curling), provenientes de cultivos de las provincias: Pichincha, Chimborazo y Tungurahua. Mediante el uso de RT-PCR con primers específicos para *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), y *Shallot latent virus* (SLV). Para la detección de LYSV y OYDV, los primers usados fueron: L-F (5'-AAGRGTCAACACTTGGTTTG-3'); L - R (5'-GGTCTCAATCCTAGCTAGTC - 3'); O3 - F (5'-GAAGCACAYATGCAAATGA AG - 3'); y O3-R (5'-YGCCACARCTAGTGGTACAC-3'), respectivamente (Sumi *et al.*, 2001). Mientras que los primers usados para la detección de SLV, fueron: S-F (5'-GTGGTNTGGAATTAC-3') y S-R (5'-CAACATCGATTYTCTC-3'), (Majumder *et al.*, 2008).

Las secuencias amplificadas usando primers para LYSV, OYDV y SLV (Accesiones de GenBank KF906255, KF906256 y KF906257, respectivamente) mostraron una identidad de secuencia de nucleótidos del 96%, 94% y 95% con secuencias de GenBank previamente publicadas (Accesiones AY007693, JN127344 y AJ409316) de Argentina, Australia y China, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio fueron considerados como el primer reporte de LYSV, OYDV, y SLV afectando plantas de ajo en Ecuador (Oleas y Arahana, 2016).

En un estudio realizado por (Granda *et al.*, 2017), en Alausí (Chimborazo), quienes colectaron muestras sintomáticas y asintomáticas de varios cultivos de ajo, mediante el uso de pruebas serológicas (DAS-ELISA) usando anticuerpos para ShVX (DSMZ AS-1042), la misma que dio reacción positiva. Posteriormente a partir de las mismas muestras colectadas, realizaron la extracción de tRNA, para luego usar la técnica de RT-PCR, usando primers degenerados para ShVX 5'-CYGCTAAGCTATATGCTGAARGG-3' y 5'-TGTTTRCAARGTAAGTTTAGYAATATCAACA-3' por (Dovas *et al.*, 2017). Se obtuvo un amplicón esperado de ~ 200 pb. Después se llevó a cabo la RT-PCR usando primers específicos previamente diseñados para amplificar un fragmento de ~ 910 pb de ShVX que incluye el gen de la capa proteica (CP) (ShVX-CPF: 5'-

ATTTAGGGGTGAAGGTCTGT-3 ', ShVX-CPR: 5'-GAGTTTTGAGGTCGTTGG-3 '), (Perez-Egusquiza *et al.*, 2008). Los resultados permitieron comprobar que el aislado ecuatoriano de ShVX mostró un 94 % de identidad de las secuencias de nucleótidos similares a un aislado ruso de ShVV (JX310755.1) y de 92 a 94 % con un aislado de Nueva Zelanda (EU835197.1, EU835196.1). En base a este sustento, se permite mencionar que es el primer reporte de ShVX infectando plantas de ajo en Ecuador.

En el año 2015 plantas de cebolla con síntomas como amarillamiento, enrollamiento foliar y achaparramiento fueron observadas en Tungurahua, se colectaron muestras a las que se les realizó la prueba de DAS-ELISA, con anticuerpos policlonales OYVD, todas las muestras sintomáticas dieron resultado positivo para los anticuerpos de OYVD. Se extrajo el tRNA y mediante el método de RT-PCR se amplificó un fragmento de cDNA usando primers universales diseñados para Potyvirus de dominio Nlb (Zheng *et al.*, 2008). El amplicón fue secuenciado y se comprobó que la secuencia parcial del gen Nlb OYDV-Ecuador mostró una identidad máxima de 91.1% y 98.1% en los niveles de nucleótidos y aminoácidos con aislados de Alemania ((JX433020) e Italia (KF623533) respectivamente, así mismo presentó una estrecha relación con aislados de Argentina (JX433019) y USA (NC005029). Tomando como referencia este análisis, se puede mencionar que este es el primer reporte de OYVD en plantas de cebolla en Ecuador (Sivaprasad *et al.*, 2017).

Virus en el cultivo de Pimiento.

En el Ecuador, uno de los primeros trabajos en los cuales se relató la ocurrencia de virus en pimiento fue realizado por medio del análisis por reacción serológica y se registró los virus *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Potatp virus V* (PVY) y *Tobacco etch virus* (TEV) infectando plantaciones de provincias del Litoral ecuatoriano, cabe destacar que PVY y TEV fueron considerados los de mayor importancia y se encuentran distribuidos en las zonas productoras muestreadas (Chalá 1978).

En un trabajo posterior, se realizaron pruebas para confirmar la presencia de estos virus en muestras de pimiento colectadas en Manabí, mediante la técnica plantas indicadoras y de DAS-ELISA. Se usaron antisueros de TEV, PVY, TMV, PTV, PeMV, PVX, CMV, AMV. En base a los resultados obtenidos en esta investigación se

descarta la presencia de TEV, PVY y TMV en las muestras estudiadas (Mendoza *et al.*, 2017).

Se colectaron muestras sintomáticas de *Capsicum pubescens* (rocoto) en Ecuador. El análisis filogenético reveló que este fue el primer representante de una nueva especie denominada provisionalmente *Ecuadorian rocoto virus* (ERV) (aún no acepta como una nueva especie de potyvirus por parte del ICTV). La reconstrucción de la filogenia mostró que este aislado se agrupó con el *Potato virus V* (PVV), *Peru tomato virus* (PTV) y *Wild potato mosaic virus* (WPMV) en un grupo monofilético, y fue más cercano al PVV. El aislamiento mostró ser infeccioso en el tabaco, el tomate y a diferencia del PVV, en el pimiento (Berenger *et al.*, 2008).

Durante un estudio de la presencia de enfermedades virales en cultivos de pimiento en la provincia de Imbabura, fue observada sintomatología correspondiente a mosaicos, clorosis, hojas deformadas, enanismo. Se colectaron muestras sintomáticas y fueron analizadas mediante hibridación Dot Blot y RT-PCR, con la finalidad de determinar la presencia de agentes virales. Luego del análisis de la proteína de la cubierta de los virus se pudo definir que dos de las muestras analizadas estaban infectadas por AMV y una por PVX y PVY; a más de estos una de las muestras presentaba una infección múltiple por los 3 virus analizados; los aislados ecuatorianos presentaron una similitud del 95 % con otros aislados Latinoamericanos. De esta manera se determinó que este es el primer reporte de Alfalfa mosaic virus en plantas de Pimiento Rojo en Ecuador (Dávila 2016) (Colimba *et al.*, 2016).

En una plantación de pimiento en Puembo, Pichincha; se observaron plantas con mosaico foliar, hojas con manchas necróticas y tallos con brotes y frutos necróticos. Sobre la base de la sintomatología, se confirmó la presencia de PVY (*Potato yellowing virus*) (aún no acepta como una nueva especie del género Ilarvirus por parte del ICTV) en muestras sintomáticas por medio de la técnica de DAS-ELISA con un antisuero específico y RT-PCR utilizando cebadores universales para miembros de la familia Bromoviridae (Untiveros *et al.*, 2010). Posterior al análisis se pudo obtener como resultado que el aislado ecuatoriano PVY de *Capsicum* estaba estrechamente relacionado con el aislado Loja 2 de *S. phureja* en Ecuador (HQ141056). *Solanum* aislados Canete (HQ141057), Rusia (KM244740), Loja 1

(HQ141053) y Azuay (HQ141054) Hasta donde se sabe, este es el primer informe de PYV sobre *Capsicum* en Ecuador (Sivaprasad, *et al.*, 2015).

Conclusiones

Los virus que actualmente bajo las condiciones de Ecuador afectan el cultivo de ajo son: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Shallot latent virus* (SLV) y *Shallot Virus X* (ShVX), mientras que en cebolla se ha reportado sólo OYDV hasta el momento.

De los virus que por medio de reacción serológica eran considerados que afectaban al pimiento sólo el *Potato virus Y* (PVY) se ha identificado molecularmente; a más de este virus se han identificado *Potato virus X* y *Alfalfa mosaic virus*, y *Ecuadorian rocoto virus* (ERV).

Bibliografía

Agrios G. (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. USA. 724-822 p.

Atawodi S., Atawodi J., Dzikwi A. (2010). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. Sahel Medical Journal, Vol. 13 No. 2. 54-63 p.

Berenger, J., Fabre, M., Palloix, A., Moury, B. (2008). Characterization of new Potyvirus infecting pepper crops in Ecuador. Arch. Virology. 153:1543–1548.

Colimba J., Falcón E., Castro ER., Dávila-Aldas D., Pallas V., Sánchez-Navarro J., Gomez G. (2016). First Report of *Alfalfa mosaic virus* in Red Pepper Plants in Ecuador. Plant Disease. Vol. 100 (5). 1026 p.

Chalá V. (1978). Determinación de los Virus que atacan al Pimiento (*Capsicum annum* L.) en el Litoral Ecuatoriano y Evaluación de Resistencia Varietal. Facultad de Ingeniería Agronómica, UTM. Portoviejo, Ecuador. 40 p.

Dávila W. (2016). Detección y caracterización de tres aislados virales presentes en plantas de pimiento (*Capsicum annum*) de Ecuador. Máster en biología molecular y celular de plantas. Universidad Politécnica de Valencia, España. 58 p.

Dovas Cl., Hatziloukas E., Salomón R., Barg E., Shibolet Y., Katis NI. (2017). Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY. Vol. 149 (11-12). 731-737 p.

Granda R., Landázuri G., Arkhipov A. (2017). First Report of *Shallot virus X* in Garlic in Ecuador. Plant disease. Vol. 101 (6). 1066 p.

Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kubi J. (2000). Kuby immunology. Fourth edition. W.H. Freeman and company. 162 p.

Hill P., Stewart G. (1992). The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Microbiology. Biotechnology and Genetic Engineering reviews. Vol. 10. 36 p.

Jay J., Loessner M., Golden A. (2006). Modern Food Microbiology. Seventh Edition. Food Science Text Series. USA. 254-255 p.

Langeveld S.A., Dore J.M., Memelink J., Derks A.F.L.M., Van der vlugt C.I.M., Asies C.J., BOL J.F. (1991). Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. Journal of General Virology 72:1531-1541 p.

Majumder S., Baranwal VK., Joshi S. (2008). Simultaneous detection of *Onion yellow dwarf virus* and *Shallot Latent virus* in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. Journal of Plant Pathology. Vol. 90 (2). 371-374 p.

Mendoza R., Sánchez G., Vélez J. (2017). El Virus Y de la Papa, el Virus del Grabado del Tabaco (TEV), el virus del Mosaico del Tabaco Aún presentes en Manabí?. Memorias del Congreso Internacional de Agricultura Sustentable. Latacunga, Ecuador. 30 p.

Oleas A., Arana F. (2016). First Report of *Leek yellow stripe virus*, *Shallot latent virus*, and *Onion yellow dwarf virus* in Garlic From Ecuador. Plant disease. Vol. 100 (1). 232 p.

Perez-Egusquiza Z., Ward L., Clover G., Van der vlugt R. (2009). First report of *Shallot virus X* in shallot in New Zealand. Plant pathology. Vol. 58 (2). 407 p.

Tortorello M., Gendel S. (1997). Food Microbiology and Analytical Methods: New Technologies. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 79-82 p.

Sadasivam S., Manickam A. (1996). Biochemical Methods. Second edition. New Age International Publishers. Nueva Delhi, India. 89-91 p.

Salazar L. (1995). Los Virus de la Papa y su Control. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 226 p.

Santos CF., Oliveira EB., Salgado MCO., Greene AS. (2002). Molecular cloning and sequencing of the c DNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. J Cardiovasc Pharmacol; Vol. 39 (5). 628-35 p.

Santos CF., Caprio MAV., Oliveira EB., Salgado MCO., Schippers DN., Munzenmaier DH., Greene AS. (2003). Functional role, cellular source and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. Am J Physiol (Heart Circ Physiol); Vol. 285 (2). 775-83 p.

Sinagap (2012). Reporte de Resultados de Censo Nacional Completo. Disponible en <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/estadisticas>.

Sivaprasad Y., Garrido P., Mendez K., Garrido A., Ramos L. (2015). First report of *Potato yellowing virus* infecting pepper in Ecuador. Journal of Plant Pathology 2015. 67-77 p.

Sivaprasad Y., Garrido P., Mendez K., Pachacama S., Garrido A., Ramos L. (2017). First report of *Onion yellow dwarf virus* infecting onion in Ecuador. Journal of Plant Pathology 2017, Vol. 99 (1). 287-304 p.

Sumi S., Tsuneyoshi T., Suzuki A., Ayabe M. (2001). Development and Establishment of Practical Tissue Culture Methods for Production of Virus-Free Garlic seed bulbs, a novel field cultivation system and convenient methods for detecting garlic infecting viruses. Plant biotechnology. Vol.18 (3). 179-190 p.

Untiveros M., Perez-Egusquiza Z., Clover G. (2010). PCR assays for the detection of members of the genus Ilarvirus and family Bromoviridae. Journal of Virological Methods. 165-197 p.

Zerbini F., Zambolim M., Carvalho G. (2001). Caderno Didático: Introdução a Virología Vegetal. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 109-116 p.

Zheng L., Wayper P.J., Gibbs A.J., Fourment M., Rodoni B.C., Gibbs M.J. (2008). Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. PLoS ONE 3. 186 p.

Zitter T., Banik M. (1984). Virus disease of cucurbits (en linea). Dept. of Plant Pathology, Cornell University. New York, US. Consultado el 10 de sept. 2017. http://www.vegetabledomline.ppath.cornell.edu/factsheets/Viruses_cucrbits.