

Identificación del virus del mosaico suave del ñame (YMMV) en muestras colombianas de *Dioscorea alata* Caracterización biológica, serológica y molecular

Identification of the yam mild mosaic virus (YMMV) in Colombian samples of *Dioscorea alata*. -Biological, serological and molecular approaches-

Mónica Guzmán*, Yovanni Bermúdez, Carlos Castro

RESUMEN

El virus del mosaico del ñame (YMV) y el virus del mosaico suave del ñame (YMMV) son patógenos que afectan el ñame (*Dioscorea* spp.). Enmarcado en un programa de fitosanidad, el presente trabajo reporta los resultados de un estudio biológico, serológico y molecular para el diagnóstico de potyvirus en muestras de campo y microcultivos. Con la técnica ELISA DAS Indirecto se detectó potyvirus en el 70% (175/250) en muestras de hojas, tubérculo, o microcultivos. Veinte malezas asociadas al cultivo de ñame fueron serológicamente positivas. En campo, las plantas expresaron síntomas de moteado con diferentes grados de clorosis y algunos casos de encrespamiento del borde de la hoja. Con la técnica de inmunosorbent electrón microscopy (ISEM), se identificó, en un extracto, un virus flexuoso de un tamaño estimado en 740 nm x 12 nm, que está dentro de los límites de potyvirus. Por Western Blot se determinó la proteína de la cápside (PC) con pesos de 26 Kd, 28 Kd y 31 Kd en diferentes aislados. Por RT-PCR y de IC-RT-PCR se amplificó el YMMV con primers específicos. Se obtuvo un fragmento de 250pb tanto a partir de hoja como de tubérculo, y además en tubérculos de dos generaciones obtenidas a partir de la planta Ñ22 (P, F1,F2). En una muestra se detectó el YMV. Los resultados demuestran la presencia de YMMV, YMV y mezcla de potyvirus en los aislados analizados. Este es el primer informe sobre la presencia de YMMV en Colombia y de su identificación con la técnica de IC-RT-PCR. Es el primer informe sobre potyvirus en malezas asociadas al ñame y se propone estas plantas como reservorios virales que incrementan el riesgo de infección de cultivos susceptibles circundantes. Los resultados fortalecerán los programas fitosanitarios del cultivo de ñame.

Palabras clave: YMMV, YMV, IC-RT-PC, potyvirus, fitosanidad

ABSTRACT

The yam mosaic virus (YMV) and the yam mild mosaic virus (YMMV) are pathogens affecting the yam (*Dioscorea* sp.). This work presents the results of a serological and molecular study for the diagnosis of potyvirus in field samples and micro cultures, within the framework of a phytosanitary programme. Potyvirus was detected in 70% (175/250) of leaf, tuber, or micro culture samples using the ELISA DAS indirect technique. Twenty weeds associated with yam growing were serologically positive. In the field, plants expressed mottling symptoms with different degrees of chlorosis and some cases of wrinkling at the edges of the leaf. A flexuous virus, having a size estimated as being 740nm x 12 nm, was identified in an extract which was within the limits for potyvirus using the immunosorbent electron microscopy (ISEM) technique. The coat protein (CP) was determined as having 26Kd, 28Kd and 31Kd weight in different isolates by Western Blott. YMMV was amplified by RT-PCR and IC-RT-PCR using specific primers. A 250pb fragment was obtained from leaves as well as tubers and also from tubers

* Profesora asociada, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. E-mail. moguzman@ibun.unal.edu.co

from two generations obtained from the N22 (P, F1, F2) plant. YMV was detected in one sample. Results show the presence of YMMV, YMV and a mixture of potyvirus in those isolates analysed. This is the first report concerning the presence of YMMV in Colombia and its identification by the IC-RT-PCR technique. This is the first report concerning potyvirus in weeds associated with yam, identifying such plants as being viral reservoirs and thus increasing the risk of infecting neighbouring susceptible crops. The results strengthen yam crop phytosanitary programmes.

Key words: YMMV, YMV, IC-RT-PCR, potyvirus, phytosanitary

INTRODUCCIÓN

El ñame es una planta herbácea, trepadora, dioica de la familia *Dioscoreaceae*, género *Dioscórrea* que comprende 603 especies (Degras 1993). Es ampliamente cultivado en África, donde se concentra la mayor producción mundial (90%), y el resto, en Norteamérica, Suramérica y Asia (FAO 1994). En Colombia, el ñame es uno de los cultivos promisorios para la costa atlántica. Las principales especies de consumo son *Dioscórrea alata*, *Dioscórrea rotundata* y *Dioscórrea trifida*. En 1999, se informó una producción de 70.560 toneladas en 20.000 hectáreas sembradas con un valor de 235,2 millones de pesos y un rendimiento de 9766 Kg/ha; se beneficiaron 10.000 campesinos de Córdoba (URPA-UMATAS Ministerio de Agricultura).

La producción de ñame puede afectarse por diversos patógenos, en particular potyvirus. El más estudiado y perjudicial es el virus del mosaico del ñame (YMV), identificado por primera vez en *Dioscorea rotundata-cayenensis* en Costa de Marfil. En África, este virus ha reducido significativamente (27%) la producción (Touvenel y Fauquet 1979-1986; Brunt 1992). En Colombia, Torres (1997) detectó al YMV en algunas muestras de *Dioscorea alata* de la costa atlántica. Recientemente, se ha informado la presencia de virus relacionados al YMV, como el virus del mosaico suave del ñame (YMMV) (Boodu *et al.* 1999), un potyvirus que infecta la *Dioscorea alata* y difiere del YMV tanto en reacciones serológicas, en rango de huésped (Goudu-Urbino *et al.* 1996; Munford y Seal 1997; Touvenel y Fauquet 1979) y en secuencia de la proteína de la cápsida (PC). Por ejemplo, la PC del YMMV de Martinica tiene una homología de aminoácidos del 94.6% con el YMV de Nueva Guinea; entre 67 al 73% con 27 aislados del YMV de diferentes regiones (Bousalem y Dallot 2000) mientras que comparte el 72.2% con el aislado del virus del mosaico japonés (YMJV) (Fuji y Nakagone 1999). Los síntomas de infección viral en ñame son el moteado con diferentes grados de clorosis y algunos casos de encrespamiento del borde de la hoja y aclaramiento de venas. El diagnóstico es difícil puesto que son comunes las infecciones asintomáticas y la reducción del síntoma después de la infección; también,

los títulos virales son bajos debido a la presencia de sustancias inhibitoras como polisacáridos y fenoles (Brunt *et al.* 1990; Munford y Seal 1997) lo cual trae problemas en el diagnóstico serológico de rutina, utilizando sueros contra potyvirus o específicos para YMV (Clark y Adams 1977; Goudu-Urbino *et al.* 1996; Bousalem, comunicación personal). La técnica RT-PCR en la cual se utiliza fenol para la extracción del RNA (Pappu *et al.* 1994), trae problemas en cuanto a que se utilizan compuestos altamente tóxicos y de difícil eliminación. Recientemente se ha desarrollado una técnica "limpia" para amplificación de virus de ñame, llamada IC-RT-PCR (Munford y Seal 1997; Dallot *et al.* 1998). La técnica fue descrita inicialmente para la detección del Plum Mosaic Virus (PMV) (Wetzel 1992) y se ha implementado con éxito para la detección del virus de la tristeza de los cítricos (Nolasco *et al.* 1993; Guzmán 1998).

Dentro de un programa de fitosanidad de ñame es importante determinar si en Colombia está presente el YMMV en *Disocorea alata*, además del YMV informado con anterioridad. El presente trabajo muestra los resultados obtenidos en la detección de potyvirus e identificación del YMMV a través de ELISA, microscopía electrónica, Western Blot y PCR en muestras de campo y de microcultivo. Se comprueba por IC-RT-PCR, la transmisión de YMMV por tubérculo de una generación a otra y la transmisión a plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 250 muestras de ñame (hojas, tubérculos y material *in vitro*) con síntomas de virosis como moteado y pronunciamiento de venas, provenientes de las colecciones y laboratorios de la Universidad de Córdoba, la Universidad de Sucre, de CORPOICA-Turipana y del laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Se analizaron 20 malezas asociadas al cultivo de ñame. Las muestras se maceraron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C.

Tubérculos: El tubérculo de la planta sintomática Ñ22 (*Dioscòrea alata*) se recogió de campo y se llevó a laboratorio (18 °C) donde se mantuvo en agua destilada durante tres meses hasta romper dormancia y conseguir la germinación y desarrollo de la planta. De esta manera se obtuvieron las generaciones Ñ22 F1 y Ñ22F2. De igual manera se procedió con los tubérculos denominados 9508001, 9506002 Ñ285 y Ñ287, de los cuales se tuvo la primera generación.

Plantas indicadoras: Las plantas indicadoras de *Nicotiana benthamiana* se obtuvieron de semilla y por microcultivo en medios adecuados. Posteriormente se trasplantaron a tierra estéril y las hojas se inocularon con un macerado de los aislados Ñ290, Ñ294 y Ñ296 en *buffer* PBS (dilución 1: 5) en presencia de carborundum. Se realizaron duplicados. Se reportaron los síntomas y se realizaron pruebas de ELISA y de RT-PCR. Como controles se utilizaron plantas no inoculadas.

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la prueba de ELISA, Western Blot y en IC-RT-PCR, fueron del kit comercial de Agdia (catálogo número Cab 27200), que reconocen una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside conservada entre potyvirus transmitidos por áfidos que incluyen por lo tanto el epítipo de reconocimiento de la caja DAG.

Prueba de ELISA Indirecto

Para la detección del potyvirus en utilizó la técnica de ELISA Indirecto siguiendo el protocolo del kit Agdia. El antígeno (extracto vegetal) se diluyó 1:10 en *buffer* de extracción 1X (Na₂CO₃ 0.159%; NaHCO₃ 0.293%; PVP 2%; pH 9.6). Se centrifugó a 8.000 r. p. m por minuto. Se incubaron 100µl de sobrenadante en una placa de ELISA (Nunc-Immuno™) toda la noche a 4°C; posteriormente se lavó tres veces con PBS-Tween 1X (NaCl 0.8% Na₂HPO₄ anh. 0.115%; KH₂PO₄ 0.02%; KCl 0.02%; Tween-20 0.05%). Se depositaron 100µl del anticuerpo anti-potyvirus en *buffer* ECI (BSA 0.2%; PVP 2%; pH 7.4) en dilución 1:200 durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS-Tween 1X. Se añadieron 100µl de anticuerpo conjugado a la fosfatasa alcalina (dilución 1:200) en *buffer* ECI durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS-Tween 1X. Se adicionaron 100µl de una solución (1ur/ul) de para-nitro-fenil fosfato en *buffer* de sustrato (MgCl₂0.01%

dietanolamina 9.7% pH 9.8). La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de ELISA (Biorad model 550) con un filtro de 405 nm.

Microscopía electrónica

Para la estimación del tamaño y forma de la partícula viral presente en un extracto vegetal se utilizó la técnica Inmunosorbent Electron Microscopy (ISEM) en un aislado de ñame. La celdilla recubierta con una membrana Fortram se incubó durante 8 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo antipotyvirus (dilución 1:200) en *buffer* carbonato. Se lavó con PBS-Tween. Se adicionó el extracto vegetal en dilución (1:10) en *buffer* de extracción. Se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Se lavó con PBS-Tween y se tiñó con acetato de uranilo al 2% en agua. Se observó al microscopio electrónico y se fotografió con película blanco y negro (Kodak).

Western Blot

Nueve muestras de ñame y una maleza fueron analizadas por Western Blot después de la electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según la técnica de Laemmli (1970). Entre 10 y 20 µl de muestra fueron cargados dentro del gel de poliacrilamida (4,5% de concentración, 12% de separación) a 100 voltios constantes durante tres horas en una cámara de electroforesis (Biorad Mini-protean® II cell). La transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Hybond-C) en un *buffer* de transferencia (Tris base 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%) durante 1 hora 15 minutos a 100 voltios constantes, en un equipo de transferencia (Biorad Mini Trans-Blot® cell). La membrana se expuso al anticuerpo antipotyvirus (dilución 1:150) durante dos horas. Luego se expuso al anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina (dilución 1:150) durante 1 hora. Se adicionó el sustrato Nitro Blue Tetrasodum Bromo Cloro Indol Phosphate y se determinó el peso de la proteína de la cápside con relación al marcador de peso molecular (Prestained Protein Marker, Broad Range Biolabs: kDa: 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25 16.5, 6.5).

Primers

Para la detección de potyvirus se utilizaron los primers propuestos por Colinet *et al.* (1993) (POT1: 5' ACC ACG

TAT CTT TTA CCT AGG TCA 3' reverse) (POT2: 5' GAC GAA TTC TGT GAT GCT GAT GGT TC 3' forward), los cuales son degenerados y amplifican regiones conservadas entre potyvirus. Los primers amplifican un fragmento de hasta 1.3 Kb. Para la identificación del YMV se utilizaron los primers propuestos por Dallot *et al.* (1998) (POLY1: 5' TGC GGA ACT CAA AAG AAC 3') (POLY2: 5' TGC CAT CAA ATC CAA ACA 3'), diseñados a partir de la secuencia de 30 aislados de YMV de diferentes lugares del mundo. Los primers amplifican un fragmento de 196 pb. Para los aislados YMMV se utilizaron los primers propuestos por Munford y Seal (1997) (CP2R: 5' GGC ACA CAT GCA AAT GAA AGC 3') (UTR2F 5' CAC CAG TAG AGT GAA CAT AG 3'), diseñados a partir de la secuencia de dos aislados YMMV de Nigeria. Los primers amplifican un fragmento de 250 pb.

Extracción del RNA viral

La extracción del RNA viral se realizó por el método de fenol-cloroformo y posterior purificación en columna de "sephadex- G50" según lo propuesto por Pappu *et al.* (1993) y por extracción con TRIZOL® (GIBCO-BRL).

RT-PCR

El cDNA se sintetizó a partir del RNA viral según la metodología propuesta por Torres (1997). Se utilizó buffer de first strand 1X; 0,8 ul de una mezcla de dNTP (10 mM), 10 U de RNA inhibitor, 5U de AMV (CPG), 25 pmoles de primer reverse, completado a volumen con agua despirogenizada. La reacción se llevó a cabo durante 45 minutos a 42 °C. La mezcla de reacción utilizada para PCR constará de buffer de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM MgCl₂, 0.01% Triton x-100) (CPG); dNTP (10 mM) (CPG); 2,5 mM MgCl₂ (Gibco); 25 pmoles de cada primer (forward y reverse); 2UTaq (CPG) y 10 µl de cDNA. La reacción se llevó a 94 °C durante tres minutos, y se amplificó durante 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 52 °C – 55 °C – 58 °C durante un minuto; 72 °C durante un minuto). Y una etapa de extensión de 72 °C durante 10 minutos. Dependiendo de la T_m del primer, se definió la temperatura de "annealing". Posteriormente se mezclaron 10 µl del producto de amplificación con 5 µl de buffer de carga que contiene 58 µg/ml de bromuro de etidio. Se cargó en un gel de agarosa de 1.5% y se corrió en buffer TAE 1 (tris, acetato de sodio, EDTA) a 100 v durante 1 hora. Los fragmentos se visualiza-

ron en un transiluminador y se tomaron fotografías con cámara polaroid.

IC-RT-PCR

El anticuerpo antipotyvirus se fijó en un tubo eppendorf durante tres horas a temperatura ambiente. El antígeno (extracto vegetal) se aplicó durante 12 horas a 4 °C. Se lavó con PBS-Tween y se colocó la solución de transcriptasa reversa (buffer de first strand 1X; 0,8 µl de una mezcla de dNTP (10 mM), 10 U de RNA inhibitor, 5U de AMV (CPG), 25 pmoles de primer reverse, completado a volumen con agua despirogenizada). La reacción se llevó a cabo durante 45 minutos a 42 °C. A 5 µl de cDNA se adicionaron 20 µl de una solución de amplificación *buffer* de PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH8.8, 1 mM MgCl₂, 0.01% Triton x-100) (CPG); dNTP (10 mM) (CPG); 2,5 mM MgCl₂ (Gibco); 25 pmoles de cada primer (forward y reverse); 2UTaq (CPG), según lo propuesto en Munford y Seal (1997) y Guzmán (1998).

RESULTADOS

Expresión de síntomas

Las plantas de campo presentaron síntomas de moteado y manchas cloróticas con diferentes grados de intensidad en forma vertical o pronunciamiento de venas en forma horizontal (figura 1). Las malezas asociadas al cultivo presentaban síntomas de moteado con diferentes grados de intensidad. En el laboratorio las plantas Ñ22F1 y F2 presentaron moteado. Las plantas indicadoras inoculadas con el aislado Ñ296 presentaron moteado leve.

Detección de potyvirus por ELISA Indirecto

De las 250 muestras de ñame analizadas y 20 malezas asociadas al cultivo, el 70% (175/250) presentó reacción positiva para potyvirus, con densidades ópticas (D.O) entre 0.350 y 3.5. Solamente el 30% (12/40) de los cultivos *in vitro* fueron serológicamente positivo. Los tubérculos 9508001, 9506002 y Ñ285 también fueron positivos, pero no se obtuvo positividad en las plantas indicadoras de un mes de inoculadas con los aislados Ñ291, Ñ294, Ñ296. Las muestras se consideraron positivas cuando los valores de D.O_{405nm} eran dos veces mayor que el promedio del control negativo y superiores a 0.1.



Figura 1. Expresión de síntomas en ñame por infección viral. A la izquierda, síntoma vertical; a la derecha, síntoma horizontal.

Detección viral por microscopía electrónica

Se encontró un virus flexuoso filamentososo de un tamaño estimado en 740 nm x 12 nm para la muestra de ñame (Ñ22). En la figura 2, se ilustra la partícula viral obtenida.

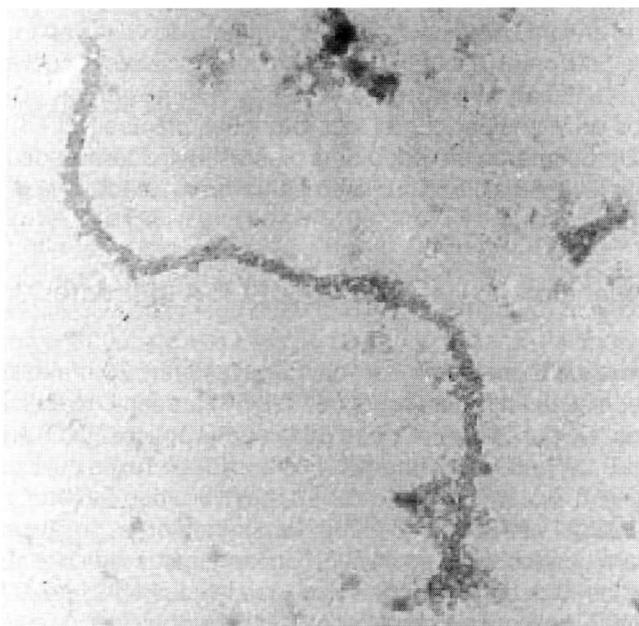


Figura 2. Microfotografía electrónica de un potyvirus de ñame. Fijación de la partícula viral con anticuerpo monoclonal antypotyvirus. Aumento 50.000x.

Detección de la proteína de la cápside viral por Western Blot

Se analizaron 9 muestras de ñame, entre ellas los tubérculos (9805001, 9506002), y una maleza mediante Western Blot. Se encontraron dos movilidades electroforéticas estimadas en 26 Kd y 31 Kd para algunos aislados de ñame, y 28 Kd para la maleza. Los procedimientos se realizaron más de una vez para cada muestra. En la figura 3, se ilustra la PC de potyvirus con evidencia de mezcla viral en los aislados.

Identificación del YMMV por RT-PCR y IC-RT-PCR

En un estudio preliminar se analizaron 11 muestras de ñame de hojas sintomáticas (Ñ22, Ñ95, Ñ200, Ñ210, Ñ250, Ñ296, Ñ294, Ñ235), de tubérculo (Ñ22F1, Ñ285y 9506002) y de *Nicotiana benthamiana* inoculada con los aislados Ñ294 y Ñ296. En todas las muestras analizadas se obtuvo amplificación de fragmentos virales con primers POT1 y POT2 y la técnica de RT-PCR; sin embargo, los fragmentos obtenidos fueron estimados entre 800 y 250 pb, mucho menores de lo esperado (1,3 Kb). No se disponía de oligos dT para la síntesis de cDNA. Por otra parte, se encontró una banda estimada de 250 pb, con las técnicas de RT-PCR y de IC-RT-PCR, utilizando los primers específicos para YMMV. El fragmento corresponde a lo esperado (250 pb). Para una sola muestra se

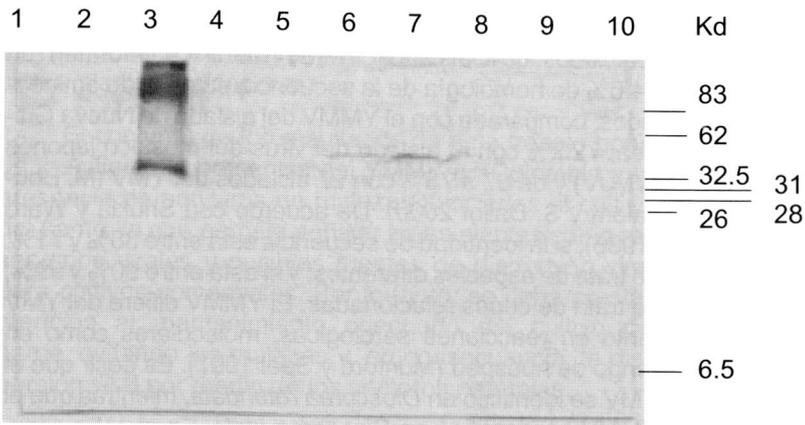


Figura 3. Detección de la proteína de la cápside de potyvirus. Carril 1: *Nicotiana bethamiana* sana; carril 3: maleza; carriles 4-5: tubérculos; carriles 2, 6-9: muestras de campo (hoja); carril 10: Marcador de Peso Molecular.

obtuvo una banda estimada de 240pb con los primers YMV, mientras que lo esperado es 196 pb. En la figura 4 se ilustra el fragmento de 250 pb correspondiente al YMMV obtenido por RT-PCR (a) y por IC-RT-PCR (b)

DISCUSIÓN

Los síntomas de moteado observado en plantas de campo y en las desarrolladas en laboratorio a partir de tubérculo, así como en las plantas indicadoras, son síntomas que han sido informados para plantas infectadas por potyvirus, y particularmente para plantas de ñame infectadas por el YMV o YMMV (Brunt 1992; Thouvenel y Fauquet 1979 - 1986). En nuestro caso particular, no pudimos estimar la acción de cada virus. Utilizando la técnica de ELISA, se encontró que el 70% de las muestras de *Dioscòrea alata* (240) estaban infectadas por potyvirus transmitidos por áfidos ya que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce una parte de la región conservada de la proteína de la cápside de potyvirus que incluye la caja DAG (Atreya *et al.* 1990). Previamente, Torres (1997) detectó potyvirus (YMV) en 11 accesiones de ñame colombiano. En el presente trabajo se confirmó, mediante las técnicas de ELISA y PCR, que los potyvirus de ñame se propagan a través de tubérculo, como ha sido previamente informado (Munford

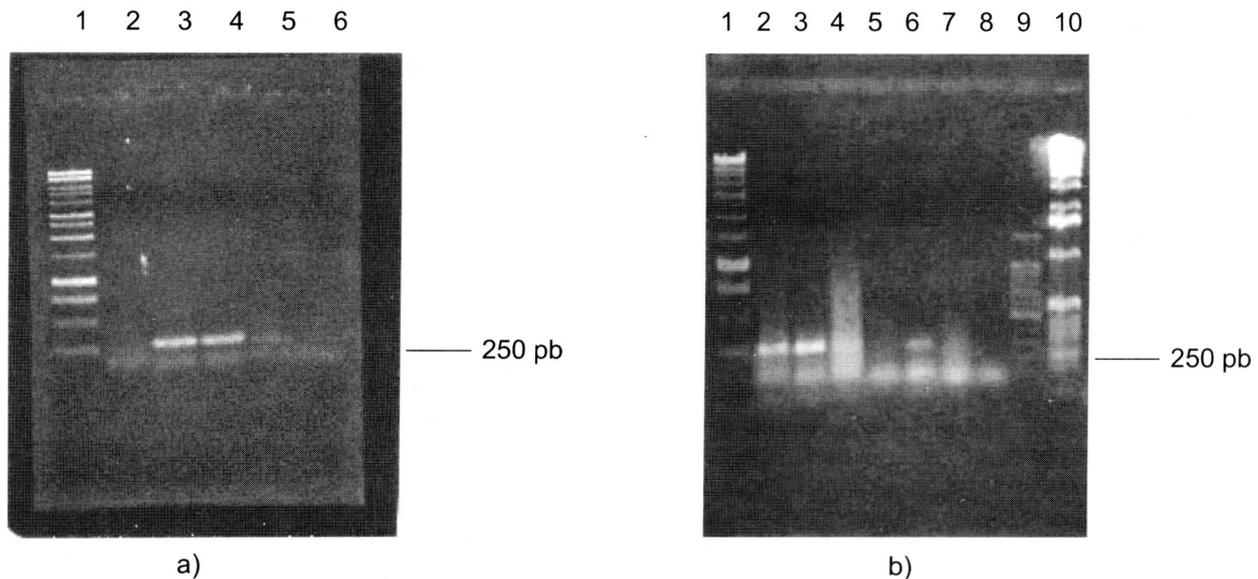


Figura 4. Identificación de YMMV con primers específicos. a) RT-PCR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (1Kb); carril 2: buffer; carril 3: Ñ22F1; carril 4: Ñ296; carril 5: *Nicotiana bethamiana* inoculada con Ñ296 y carril 6 *Nicotiana bethamiana* sana. b) IC-RT-PCR. Carriles 1, 9 y 10: Marcadores de Peso Molecular (1 Kb Promega; 100 pb y 1 Kb Gibco, respectivamente); carril 2: Ñ22F1; carril 3: Ñ296; carril 4: Ñ285; carriles 5 y 7: Muestras negativas; carril 6: 9506002 (tubérculo) y carril 8: *Nicotiana bethamiana* sana. Fragmento estimado en 250 pb. Gel en agarosa al 1,5%; tinción con bromuro de etidio. Migración: 1 hora a 100v.

y Seal 1997), y se transmiten por inoculación a las plantas indicadoras de *Nicotiana benthamina*. La misma situación se determinó para las malezas asociadas al cultivo de ñame, las cuales pueden actuar como reservorios virales (Guzmán y Fontanilla 2000). Resultados similares han sido informados por López-Moya y García (1999), quienes encuentran la presencia de potyvirus en malezas asociadas a otros cultivos.

Por tal razón, es importante establecer programas amplios de control fitosanitario que incluyan la erradicación de las malezas. Los resultados son importantes en cuanto a la alta incidencia de potyvirus en ñame cultivado en la costa atlántica colombiana, al riesgo de movimiento indiscriminado de los tubérculo y al posible efecto aditivo de contaminación del ñame a través de las malezas por la vía de los vectores naturales.

Por otra parte, se detectaron dos movilidades electroforéticas de la proteína de la cápside (PC) en las muestras de ñame (26 KDa y 31 KDa), diferentes de la movilidad de la PC de maleza (28 KDa). Goudu Urbino *et al.* (1996) determinaron dos serogrupos, con migraciones de CP diferentes. La diversidad de los aislados del YMV ha sido demostrada también por Alemán *et al.* (1997). Esta variabilidad se debe posiblemente a deleciones e inserciones que puede sufrir la secuencia de la PC por eventos de recombinación (Pappu *et al.* 1994; Alemán *et al.* 1997). Estas diferencias demuestran variabilidad y mezcla viral entre los aislados potyvirales. También Torres (1997) sugirió mezcla viral. Una PC de 31 Kda ha sido informada para YMMV en aislados de Nueva Guinea (S. Fuji *et al.* 1999), lo que estaría de acuerdo con los resultados de este estudio, que sugieren la presencia del YMMV. En los aislados analizados no se detectó una PC de 34 KDa informada para YMV (Touvenel y Fauquet 1986; Goudu Urbino *et al.* 1996).

Se amplificó un fragmento de 250 pb con primers YMMV, utilizando las técnicas de RT-PCR y de IC-RT-PCR. Los resultados preliminares sugieren una alta incidencia del YMMV en los cultivos de ñame de la costa atlántica colombiana. Por otra parte, se detectó YMV en una sola muestra; por tanto es necesario realizar más estudios serológicos y moleculares comparativos entre el YMV y el YMMV encontrado en las muestras de ñame colombianas, tanto del presente estudio como las informada por Torres (1997).

Posiblemente el YMMV tenga un menor efecto en los cultivos de ñame, comparado con lo reportado en otras regiones del mundo donde las pérdidas son grandes por la acción del YMV (Thouvenel y Fauquet 1979). En Colombia no se cuenta todavía con un estimativo de la pérdida de la producción debida a los virus, sea el YMV o el

YMMV. No es claro aún si el YMV y el YMMV son cepas relacionadas o son virus diferentes, aunque los estudios realizados con aislados YMMV Martinica informan un 94.6% de homología de la secuencia putativa de aminoácidos, comparada con el YMMV del aislado de Nueva Guinea; 72.2% con el aislado del virus del mosaico japonés (YMJV) y de 67 a 73% con 27 aislados del YMV (M. Bousalem y S. Dallot 2000). De acuerdo con Shukla y Ward (1988), si la identidad de secuencia está entre 38% y 71%, se trata de especies diferentes, y si está entre 90% y 99%, se trata de cepas relacionadas. El YMMV difiere del YMV tanto en reacciones serológicas, moleculares como en rango de huésped (Munford y Seal 1997). Es decir que el YMV se identificó en *Dioscorea rotundata*, mientras que el YMMV se identificó en *Disocorea alata*. En nuestro caso, tanto el YMV como el YMMV se amplificaron en el aislado Ñ22, lo que fue corroborado por Bousalem (comunicación personal) en el CIRAD (Montpellier, Francia). Es decir que en Colombia se encuentran los dos tipos de potyvirus, pero todavía no hay claridad sobre la incidencia de cada uno de ellos, su relación con el huésped y la sintomatología, la comparación molecular y los efectos sobre el rendimiento y la producción del tubérculo de ñame.

La implementación por primera vez en Colombia de la IC-RT-PCR para el diagnóstico de virus de ñame es ventajosa por la sencillez de la misma, sus características limpias (sin fenol) para el operario y el medio ambiente. Además, se fija directamente el virus a pesar de los bajos títulos debidos a la presencia de sustancias inhibidoras en el ñame (Brunt *et al.* 1990). Por lo tanto, la técnica de IC-RT-PCR combina una ventaja de PCR (sensibilidad) con una ventaja de ELISA para la detección de potyvirus de ñame (Munford y Seal 1997).

CONCLUSIONES

Se determinó que el 70% de las muestras analizadas de la costa atlántica colombiana estaban infectadas por potyvirus. Las diferentes movilidades electroforéticas de la PC sugieren mezcla de potyvirus en los aislados analizados, y sugieren la presencia del YMMV con una PC de 31 Kda. Por otra parte, en una maleza con síntomas de moteado asociada al cultivo de ñame, se estimó una PC de 28 Kda. Los resultados sugieren que existe variabilidad y mezcla viral en las muestras estudiadas. Utilizando las metodologías de RT-PCR y de IC-RT-PCR en un estudio preliminar, se pudo identificar en varios aislados un fragmento de 250 pb con primers específicos para YMMV, mientras el YMV se identificó en un solo aislado. Los resultados preliminares sugieren que existe una incidencia alta del YMMV, considerada una especie viral di-

ferente y posiblemente menos severa que el YMV. Se demostró la transmisión del virus por medio de tubérculo, de una generación a otra, y la transmisión por inoculación a plantas indicadoras.

El conjunto de los resultados de este trabajo pone de manifiesto la presencia del YMMV en Colombia y la presencia de potyvirus en malezas asociadas al cultivo del ñame, lo que permite señalar estas plantas como reservorios virales y posibles fuentes de dispersión viral para cultivos comerciales. Por lo tanto, se debe prestar atención al mantenimiento adecuado del cultivo de ñame, evitando las malezas y, en consecuencia, la dispersión viral por medio de los vectores naturales.

La implementación de metodologías rápidas y seguras, como IC-RT-PCR, permitió una visión de la variabilidad y diversidad viral en las muestras de ñame colombianas. Estos trabajos sobre detección del YMMV son nuevos para Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Marina Caro, (Laboratorio de Cultivos Vegetales del IBUN) por suministrar las plantas indicadoras de *Nicotiana benthamina*. A Margarita Perea por suministrar los cultivos *in vitro* de ñame y Gustavo Buitrago por su gestión dentro del Programa de Agricultura Biotecnológica para Ñame (PBA-Ñame). Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología y fue financiado en parte por CEGA.

BIBLIOGRAFÍA

- Aleman-Verdaguer, M.E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N. and Fauquet, C. 1997. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecific molecular diversity of potyvirus. *Journal of General Virology* 78, 1253-1264.
- Atreya, C.D., Raccah, B. and Pirone, T.P. 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178:161-165.
- Bousalem, M. and Dallot, S. 2000. First report and molecular characterization of mild mosaic virus in *Dioscorea alata* on the island of Martinique. *Plant Disease* Vol. 84 No. 2.
- Brunt, A., Crabtree, K., Gibbs, A. 1990. *Viruses of tropical plants*. CAB International, Wallingford. U.K.
- Dallot, S., Bousalem, M., Malaurie, B. 1998. A highly sensitive IC-RT-PCR test for the detection of yam mosaic potyviruses in both leaves and tubers of yam species. Poster présenté au 7^{ème} symposium de la société des tubercules et des racines, branche Afrique (ISTRC-AB).
- Degras, L. 1993. *The yam*. A tropical root crop. Edited by R. Coste. London and basingstoke: Macmillan/CTA.
- FAO 1994. Production yearbook for 1993. Vol. 47. FAO, Rome.
- Fuji, S. and Nakamae, H. 1999. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a Japanese yam mosaic virus: a New Potyvirus in Japan. *Archives of Virology*. 144: (2) 231-240.
- Goudou-Urbino, C., Givord, L., Quiot, J.R., Boeglin, M., Konate, G. and Dubern, J. 1996. Differentiation of yam virus isolates using symptomatology, western blot assay and monoclonal antibodies.
- Guzmán, M. 1998. Caractérisation biologique, serologique et moléculaire des isolats du virus de la tristezza des agrumes en Corse. Ph. D. Thesis, Université Victor Segalen Bordeaux II.
- Guzmán, M y Fontanilla, M. 2000. Algunos virus vegetales y del ñame. En: Ñame: producción de semillas por biotecnología. Guzmán y Buitrago editores. Unibiblos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, pp. 71 - 101.
- López-Moya, J. and García, J. 1999. Potyviruses (Potyviridae). Encyclopedia of virology. Vol 3. Academic Press Segunda Edición, pp. 1361-1997.
- Munford, R.A. and Seal, S.E. 1997. Rapid single tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*. 69:73-79.
- Pappu, S.S., Pappu, H.R., Lastra, R. and Niblett C.L. 1994. Variability in the length of the amino terminal sequence contributes to the capsid protein diversity among dasheen mosaic potyvirus isolates. *Archives of Virology*. 136:407-413.
- Fuji, S., Mitobe, I., Nakamae, H. and Natsuaki, K. 1999. Nucleotide sequence of coat protein gene of yam mild mosaic virus, isolated in Papua New Guinea. *Archives of Virology*. 144:1415-1419.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. and Manitis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor. 1659 p.
- Shukla, D.D. and Ward, C.W. 1988. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology*. 106:171-200.
- Thouvenel, J.C. and Fauquet, C. 1979. Yam Mosaic: a new potyvirus infecting *Dioscorea Cayenensis* in the Ivory Coast. *Ann. Appl. Biol.* 93:279-283.
- Torres, A.M.I. 1997. Engineering resistance in *Dioscorea alata* L. Yams using genetic transformation of *Nicotiana benthamiana* as Model. Ph.D. Thesis, Wye University of London, London, U.K. 243p.