

TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO POR SEMILLA DE CAPACHO (*CANNA INDICA*)

Miriam Brito¹, Mario José Garrido¹, Alexander Mejías² y Edgloris Marys²

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Virología Vegetal y Bacterias Fitopatógenas, Apartado Postal 4579, Maracay 2101-A, britom@agr.ucv.ve; ²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Apartado Postal 20632, Caracas 1020-A, Venezuela.

Recibido: 30 de abril de 2012

Aceptado: 30 de junio de 2012

RESUMEN

Brito, M., Garrido, M.J., Mejías, A. y Marys, E. 2012. Transmisión del virus del mosaico del pepino por semilla de capacho (*Canna indica*). Fitopatol. Venez. 25:24-26.

Esta investigación se realizó con el propósito de determinar si el virus del mosaico del pepino (CMV) se transmitía en forma directa a través de la semilla de capacho (*Canna indica*). Para ello, se recolectaron 254 semillas provenientes de plantas infectadas y se sembraron de manera individual en envases plásticos contentivos de sustrato estéril. Las evaluaciones se realizaron durante un mes. A las nuevas plantas que mostraron síntomas virales se le extrajo savia y se inoculó mecánicamente en hojas cotiledonares de plantas sanas de frijol (*Vigna unguiculata*) cv Tuy en las cuales el CMV induce lesiones locales necróticas. La presencia del CMV en las nuevas plantas sintomáticas se corroboró a través de un ensayo de transcripción reversa acoplado a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Doce días después de la siembra se constató que habían germinado 117 plantas (46%), de las cuales 27 (23%) exhibían síntomas típicos de infección viral que se observaron a partir de las primeras hojas. La reacción del frijol al inóculo procedente de las plantas que expresaron síntomas virales fue típica del CMV. La presencia del virus en estas plantas sintomáticas se verificó por RT-PCR mediante la amplificación de fragmentos de ADN viral del tamaño esperado (500 pb). Estas pruebas evidenciaron la transmisión del virus a través de la semilla de capacho, la cual representa una fuente de inóculo primario y un medio de diseminación, lo que aumenta la probabilidad de que el virus sobreviva en la naturaleza.

ABSTRACT

Brito, M., Garrido, M.J., Mejías, A., and Marys, E. 2012. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in canna (*Canna indica*). Fitopatol. Venez. 25:24-26.

Seeds as a source of *Cucumber mosaic virus* (CMV) have been reported in several species of plants, but in the literature no results of this type of transmission were found in canna. For this reason, it was considered of interest this research in order to determine if CMV is transmitted directly through the seed of canna (*Canna indica*). To do this, were collected 254 seeds from infected plants and sown individually in plastic containers containing sterile substrate. Evaluations were performed for a month under greenhouse conditions. Sap from new plants showing viral symptoms was extracted and used to mechanically inoculate cotyledonary leaves of healthy cowpea (*Vigna unguiculata*) cv Tuy plants in which CMV induces necrotic local lesions. The presence of CMV in the new symptomatic plants was corroborated through a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Twelve days after sowing 117 plants had germinated (46%), of which 27 (23%) exhibited typical symptoms of viral infection that were observed on the first leaves. The reaction of cowpea plants to the inoculum from the plants that expressed viral symptoms was typical of the CMV. The presence of virus in these symptomatic plants was verified by RT-PCR amplification of viral DNA fragments of the expected size (500 bp). These tests demonstrated the transmission of the virus through the seeds of canna, which represents a source of primary inoculum. The seedborne characteristic increases the probability that the virus will survive in nature.

INTRODUCCIÓN

Los capachos o cannas (*Canna indica* L.) son plantas nativas de Centro y Sur América, ampliamente cultivadas como ornamentales en todo el mundo. En los últimos años, en Venezuela, así como en otros países, la popularidad por la siembra de capachos en jardines y parques ha tenido mucha aceptación, debido a su frondoso follaje, flores brillantes y buena adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y con déficit hídrico (6). Sin embargo, esta popularidad ha sido disminuida por un aumento en la incidencia de enfermedades virales. Esta situación se ha incrementado debido a que los capachos son propagados principalmente por rizomas (propagación vegetativa) y a través del frecuente intercambio internacional de material no analizado, lo que ha traído como consecuencia que los virus se hayan transformado en un problema en capachos cultivados en el ámbito mundial (7).

En Venezuela, han sido detectados tres virus afectando capacho en los estados Aragua y Yaracuy: virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus del moteado amarillo de la canna (*Canna yellow mottle virus*, CaYMV) y virus del mosaico amarillo de la caraota (*Bean yellow mosaic*

virus, BYMV) (8). El CMV constituye la especie tipo del género *Cucumovirus* en la familia *Bromoviridae*; tiene una amplia gama de hospedantes que abarca unas 1.200 especies en más de 100 familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo muchas hortalizas y ornamentales (9,12). Es transmitido de manera no persistente por más de 80 especies de áfidos y a través de la semilla en unas 20 especies de plantas, con valores de transmisión que oscilan entre 2,5 y 40% (5,12). Sin embargo, en la literatura consultada no se encontraron resultados de este último tipo de transmisión en capacho, por lo que se consideró de interés realizar esta investigación con el objetivo de determinar si el CMV se transmite en forma directa a través de la semilla de capacho.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de capacho infectadas con el CMV (8) y mantenidas en el Laboratorio de Virología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en Maracay, creciendo en invernadero, libre de insectos, en condiciones parcialmente controladas (27 °C, 78%

HR), mostraban síntomas característicos inducidos por este virus: mosaico, bandas cloróticas, necrosis y disminución del tamaño de las plantas, hojas y flores (Fig. 1A). A partir de sus rizomas estas plantas fueron propagadas y mantenidas durante seis meses para su evaluación y posterior cosecha de sus semillas para los bioensayos de transmisión.

Para determinar si el virus se transmitía a través de la semilla sexual proveniente de plantas de capacho infectadas a las nuevas plantas, se recolectaron 254 semillas, se almacenaron en condiciones de laboratorio durante 15-25 d, y posteriormente se escarificaron parcialmente en forma mecánica y se sembraron de manera individual en envases plásticos de 476 mL de capacidad contentivos de un sustrato (turba + tierra + arena) estéril y se colocaron bajo las condiciones de invernadero antes mencionadas. Las evaluaciones se realizaron cada cinco días durante un mes. A las nuevas plantas que mostraban síntomas de la enfermedad o evidenciaban algún rasgo de infección viral se le extrajo savia en presencia de buffer fosfato 0,1 M + 1% sulfito de sodio, pH 7,3 (relación 1:5; p/v) y se inoculó mecánicamente en hojas cotiledonares de plantas sanas de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv Tuy de seis días de edad previamente espolvoreadas con carborundum 600, en las cuales el CMV induce lesiones locales necróticas (3,9). La evaluación se realizó hasta 10 d después de la inoculación.

La presencia del CMV en las nuevas plantas sintomáticas se corroboró a través de un ensayo de transcripción reversa (RT) acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para ello, se extrajo ARN total a partir de plantas de capacho con síntomas de CMV transmitido a través de la semilla y ARN de plantas sanas. Como control positivo se utilizó ARN extraído de un aislamiento del CMV perteneciente a la colección de virus del Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Posteriormente, el ARN se convirtió en ADNc con cebadores al azar, utilizando un kit de transcripción reversa según el método sugerido por la casa comercial Invitrogen. La PCR se realizó empleando como cebadores los oligonucleótidos específicos CMV-5 y CMV-3, de acuerdo al protocolo descrito por Bariana *et al.* (2). Los amplicones fueron analizados a través de electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados utilizando el sistema Foto/Analyst Investigator (Fotodyne).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Doce días después de la siembra se constató que habían germinado 117 plantas (46%), de las cuales 27 (23%) exhibían síntomas típicos de infección viral (mosaico, enanismo y deformación foliar) que se observaron a partir de las primeras hojas (Fig. 1B, D y E). La reacción del frijol al inóculo procedente de las plantas que expresaron síntomas virales fue de pequeñas lesiones locales necróticas (Fig. 1C), típicas del CMV (3,9,10). La presencia del CMV en las plantas sintomáticas se verificó mediante la amplificación del virus



Fig. 1. Síntomas inducidos por el virus del mosaico del pepino (CMV). A) Plantas de capacho (*Canna indica*) con síntomas característicos del CMV; B, D y E) Plántulas con síntomas del CMV transmitido por la semilla de capacho; C) Hoja cotiledonar de frijol (*Vigna unguiculata*) cv Tuy mostrando numerosas lesiones locales necróticas inducidas por el CMV.

por RT-PCR con cebadores específicos (Fig. 2), obteniéndose fragmentos de ADN del tamaño esperado (500 pb). Estas pruebas evidenciaron la transmisión del virus a través de la semilla en una proporción relativamente alta.

El CMV ha sido señalado infectando *Canna* spp. (4,8,10,11), pero en la literatura consultada no hay referencias que evidencien su transmisión a través de la semilla sexual. La detección del CMV en lotes de semilla o en plantas germinadas de semillas provenientes de plantas infectadas ha sido documentada para varias especies de fabáceas, tomate, pimentón y calabaza (5). Los porcentajes de transmisión reportados son generalmente muy bajos (menores de 2,5%), aunque suficientes para iniciar una epidemia; sin embargo, han sido citados valores de transmisión más altos para lenteja (9,5%), tomate (8%), espinaca (15%), pimentón (10-14%) y *Stellaria media* (40%) (1,5,12).

Las plantas de capacho que no evidenciaron síntomas no se les practicó ningún tipo de prueba para detectar el virus. Este aspecto es importante considerarlo en futuras investigaciones, ya que en algunos trabajos se ha comprobado recientemente que plantas de caraota y pimentón infectadas a través de sus semillas con el CMV pueden ser asintomáticas (5).

En conclusión, se comprobó la transmisión directa del CMV a través de la semilla de capacho, la cual representa una fuente de inóculo primario y un medio de diseminación, lo que aumenta la probabilidad que el virus sobreviva en la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de Universidad Central de Venezuela por la subvención parcial de esta investigación a través de los Proyectos PI-01-7340-2008/1 y PI-01-7335-2008/1. Asimismo, al Lic. Jorge Rivas (IVIC) por su apoyo en la edición de las fotografías.

LITERATURA CITADA

1. Ali, A. and Kobayashi, M. 2010. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. *J. Virol. Methods* 163: 234-237.
2. Bariana, H. S., Shannon, A. L., Chu, P. W. G., and Waterhouse, P. M. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology* 84:1201-1205.
3. Debrot, E. 1980. Infección del pimentón con el virus del mosaico del pepino (VMP) en Venezuela. *Agronomía Tropical* 30: 295-303.

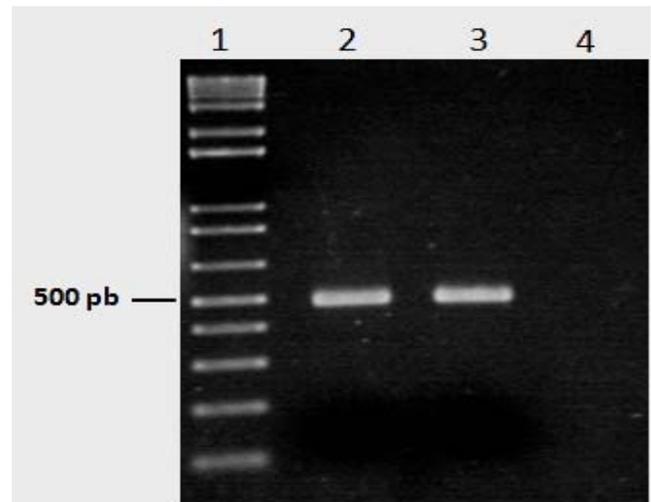


Fig. 2. Electroforesis en un gel de agarosa de productos amplificados por RT-PCR a partir de plantas de capacho (*Canna indica*) infectadas con el CMV transmitido por semilla. 1) Marcadores de peso molecular; 2) CMV purificado; 3) Extracto foliar de planta de capacho infectada a través de la semilla; 4) Extracto foliar de planta de capacho sana.

4. Fisher, J. R., Sanchez-Cuevas, M.C., Nameth, S. T., Woods, V. L., and Ellett, C. W. 1997. First Report of *Cucumber mosaic virus* in *Eryngium amethystinum*, *Canna* spp., and *Aquilegia* hybrids in Ohio. *Plant Dis.* 81:1331.
5. Jacquemond, M. 2012. *Cucumber mosaic virus*. In *Viruses and virus diseases of the Vegetables of the Mediterranean Basin*. Advances and Virus Research Vol. 84. G. Loebenstein and H. Lecoq (eds.). San Diego. Academic Press. pp. 439-493.
6. Miller, J. 1998. Cannaceae. In *Flora of the Venezuelan Guayana*. J.A. Steyermark, P. Berry and B. Holst (eds.). St. Louis. Missouri Botanical Garden Press. p.130.
7. Monger, W. A., Harju1, V., Skelton, A., Seal, S. E. and Mumford, R. A. 2007. *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in canna. *Arch. Virol.* 152: 1527-1530.
8. Ordosgoitti, A., Garrido, M. J. y Lockhart, B. E. 2003. Enfermedades virales del capacho (*Canna edulis*) en los estados Aragua y Yaracuy, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 16: 74. (Resumen).
9. Palukaitis, P. and García-Arenal, F. 2003. *Cucumber mosaic virus*. Descriptions of Plant Viruses, No. 400. Association of Applied Biologists. Wellesbourne, Warwick, UK.
10. Saidi, A. and Safaeizadeh, M. 2012. First report of *Cucumber mosaic virus* on *Canna indica* in Iran. *Australasian Plant Dis. Notes* DOI 10.1007/s13314-012-0062-x.
11. Samuitienė, M. and Navalinskienė, M. 2008. Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture* 95: 135-143.
12. Zitter, T. A. and Murphy, J. F. 2009. *Cucumber mosaic virus*. *APSnet, The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01.