



02

Badnavirus, protocolo de diagnóstico, en las bananeras de El oro, Ecuador

Badnavirus, diagnostic protocol, in the banana plantations of El oro, Ecuador

Ing. Brian Juvenal Mocha Cuenca¹E-Mail: bmocha@utmachala.edu.ec¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

Cita sugerida (APA, sexta edición)

Juvenal Mocha Cuenca, B. (2018). Badnavirus, protocolo de diagnóstico, en las bananeras del Oro, Ecuador. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(3), 18-24. Recuperado de <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>

RESUMEN

El Virus del rayado del Banano (BSV) es un patógeno que se transmite a través de propagación vegetativa de material infectado y de sus insectos vectores, esta causa grandes pérdidas económicas y es un serio problema en programas de mejoramiento. La falta de un método de diagnóstico confiable, sensible y específico, ha permitido que este virus esté transmitiéndose continuamente en los campos. El virus del rayado del banano (BSV) miembro del género Badnavirus, causa pérdidas en la productividad de las plantaciones bananeras, entonces, como primer paso en la lucha contra este virus, se planteó el objetivo de: Determinar la presencia del virus del rayado del banano, en las bananeras de Machala, Provincia de El Oro. El ADN viral y vegetal fue extraído usando un método rápido con CTAB y que produce una muestra de ADN apropiada para el análisis de PCR. Utilizando un juego de iniciadores que amplifican un fragmento de 221 pares de bases correspondiente al gen de la transcriptasa inversa de los badnavirus, usando este método fue posible detectar la presencia de este virus en un determinado número de muestras, en la Provincia de El Oro.

Palabras clave:

Badnavirus, Diagnóstico, extracción de ADN.

ABSTRACT

Banana streak virus BSV is a pathogen which is transmitted through vegetative propagation of infected material and through its insect's vectors; this virus causes great economic losses and it is a serious problem in breeding programs. The lack of a reliable diagnostic protocol, sensitive and specific, has allowed that this virus is being transmitted continuously in banana farms. Banana Streak Virus (BSV) member of genus Badnavirus, is the responsible of yield losses in banana plantations, then, as first step for fight against this virus, this goal was established: to elaborate a diagnostic protocol for the detection of Banana Streak Virus, in the banana farms of Machala, province of El Oro. Viral and plant DNA was extracted using a rapid CTAB method which produces a suitable DNA sample for PCR analysis. Using a set of primers that amplified a 221 bp fragment corresponding to inverse transcriptase of Badnaviruses ORF 3, was possible to detect the presence of this virus in a determined number of samples at the El Oro province.

Keywords:

Badnavirus, Diagnostic, DNA extraction.

INTRODUCCIÓN

El banano es un cultivo de gran importancia económica para nuestra provincia, ya que representa su principal actividad agrícola y es una importante fuente de ingreso económico para los pequeños y grandes productores, y la principal para las familias que trabajan en las fincas donde se produce. En el Ecuador se cultivan alrededor de 200000 Ha de banano subgrupo Cavendish (AAA), el mismo que es atacado por una variedad de plagas y enfermedades, entre las cuales se encuentra la causada por el Virus del rayado del Banano, el cual es el virus de mayor importancia económica presente en las plantaciones de nuestro país.

Este virus puede llegar a ocasionar la pérdida de la productividad del cultivo entre el 7 y el 90 % (Lassoudiere, 1979) y se transmite primordialmente de forma vegetativa al 100 % de la progenie y por medio de las cochinillas. El virus pertenece al género Badnavirus, es cual está constituido por partículas baciliformes de 120-150 * 30 nm de diámetro, que encierra un genoma de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 7500 pares de bases.

La producción bananera en Ecuador, se encuentra amenazada por este virus, ocasiona severos daños a la plantación, a diferencia de las enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos, las enfermedades virales no se pueden controlar mediante productos químicos. La aplicación de este protocolo, ayudará al diagnóstico oportuno de este virus y evitará que la enfermedad sea propagada en los campos por medio de la reproducción de material infectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los materiales y métodos en lo que concierne al trabajo de campo se lo llevó a cabo en las plantaciones de banano de la provincia de El Oro, que comprenden los cantones: Machala, Pasaje, El Guabo, Santa Rosa y Arenillas. Geográficamente, los cantones estudiados se encuentran entre las siguientes coordenadas: Latitud: 03° 15' Sur y 03° 33' Sur, Longitud: 79° 51' Oeste y 80° 04' Oeste, Altitud: < 50 msnm.

Las muestras fueron recogidas en fincas bananeras de los cantones Machala, Pasaje, El Guabo, Santa Rosa y Arenillas, donde se produce banano en la

provincia de El Oro, para el muestreo las fincas fueron clasificadas como Tecnificadas, Semitecnificadas y No Tecnificadas, dentro de esta clasificación de las fincas por nivel de tecnificación se siguió el criterio siguiente:

Una finca tecnificada es aquella que consta de riego a presión, sistemas de cable vía, buen control de malezas y un Técnico encargado de la misma. Una finca semitecnificada es la que puede tener riego a presión o cable vía, pero carece de un técnico encargado. La finca no tecnificada es la que carece de todos los componentes tomados en cuenta en las dos categorizaciones anteriores.

Estas muestras cubrieron los principales clones que son cultivados en la provincia, como son los del subgrupo Cavendish, entre ellos Cavendish gigante, Cavendish enano y Valery, en menor número Filipino y Grand naine, todos estos pertenecientes al grupo genómico AAA. Las muestras de hojas fueron tomadas de plantas que expresaron síntomas de BSV, tal como los descritos anteriormente (Daniells, Smith & Hamill, 1999). La muestra correspondió a una parte de la hoja que mostraba síntomas de rayado clorótico de aproximadamente 10 x 40 cm. En las plantas que no mostraron síntomas sobre las hojas, pero tenían otros síntomas como los descritos en Daniells, et al. (1999), se tomó la muestra de la tercera hoja totalmente abierta. Para cada muestra el sitio, nombre de la finca, nivel de tecnificación, área, la variedad de banano y el tipo de síntomas fueron registrados.

Las muestras fueron envueltas en papel periódico humedecido y colocadas dentro de una funda plástica como lo recomendado por Caruana (1998). Luego estas muestras serán guardadas a -20 oC y examinadas posteriormente.

El protocolo de diagnóstico se realizará mediante la recolección de la muestra a partir de plantas que se sospecha están infectadas por el virus del rayado del banano, de acuerdo con los síntomas, la extracción de ADN de dichas muestras y posterior análisis de PCR, utilizando los iniciadores diseñados a partir de regiones conservadas del virus, para luego en base a los resultados diagnosticar la infección por el Virus del rayado del banano. Las técnicas moleculares requieren de la extracción de ADN genómico de apropiada pureza. El aislamiento de ADN de buena

calidad es el prerequisite para la investigación molecular. Aplicaciones exitosas de PCR requieren la eficiente recolección de un ADN de buena calidad y cantidad. Los miembros del orden Zingiberales, entre ellos Musa, contienen una gran cantidad de polisacáridos y de polifenoles. Los metabolitos secundarios y los polisacáridos intervienen con los procedimientos de extracción de ADN y aplicaciones de PCR, es por esto que la remoción de estos contaminantes requiere de complicados protocolos (Khumallambam, 2013).

Para la extracción de ADN se realiza lo siguiente: precalentar el búfer de extracción que contiene (2 % CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 % mercaptoetanol), Se tomo aproximadamente 1 cm2 de tejido foliar y se lo introdujo en un microtubo de 1.5 ml. Se agregó N2 líquido hasta cubrir la muestra y se maceró directamente en el tubo hasta que se consumió el nitrógeno, en los casos que fueron necesarios se volvió a agregar nitrógeno a la muestra. Se agregó 800 ml de CTAB buffer precalentado a 60 oC a los tejidos macerados y se mezcló en un vortex. La mezcla entera fue mantenida a 60 oC por 20 min. Durante la incubación la mezcla fue puesta en el vortex varias veces. Después de la incubación se agregó 600 ml de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) helado, se agito vigorosamente la mezcla en un vortex, y se centrifugo a 13000 rpm por 5 min. Se transfirió 400 ml del sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de isopropanol helado y se colocó la mezcla en hielo durante 10 min. Se centrifugo a velocidad máxima por 8 min y se descartó la fase acuosa. Se enjuagó el pellet con etanol al 80 %, se dejó secar al ambiente y luego se resuspendió en 50- 100 ml de agua ultrapura o en TE. Esta preparación fue usada para PCR (Zhang, Uyemoto & Kirkpatrick, 1998).

Para la realización de la Reacción en cadena de la polimerasa PCR se utilizaron juegos de iniciadores basados sobre secuencias conservadas de la transcriptasa inversa presente en el ORF 3 de los badnavirus y que producen un amplicon de aproximadamente 221 pares de bases, estos son: ScBV F5 5' TCA AAG TTT GAT TTG AAG AGC GGG 3' ScBV R5 5' CTC CGA GAA AAC CAA TAT GTC ATC 3', el mix de PCR contenía 5 ml de Buffer (10 x), 8 ml del Cl2Mg (25 mM), 4 ml de dNTPs, 0,2 ml de Taq

polimerasa, más la mezcla de los iniciadores y el ADN en un volumen final de 50µl. El programa de PCR utilizado será el siguiente: 1 ciclo 94 0C por 7 min; 3 ciclos 94 0C por 30 seg, 50 0C por 30 seg, 72 0C por 1 min; 37 ciclos, 94 0C por 30 seg, 55 0C por 30 seg, 72 0C por 1 min; 72 0C por 10 min, 10 0C por ∞.

Los productos de PCR fueron migrados en un gel de agarosa de 1,5 % teñido con 0.8 uL de Bromuro de Etidio (15 mg/ml).

RESULTADOS y DISCUSION

Se realizó el muestreo en 5 Cantones de la provincia El Oro, donde se visitaron varias fincas con diferentes niveles de tecnificación (Tabla 1)

Tabla 1. Detalles acerca del número y nivel de tecnificación de las fincas visitadas en cada Cantón.

Nivel de Tecnificación	Machala	Pasaje	El Guabo	Santa Rosa	Arenillas	Total
Tecnificadas	4	7	6	1	1	19
Semitecnificadas	7	2	0	3	0	12
No-tecnificadas	11	2	0	1	2	16
Total	22	11	6	5	3	47

Los síntomas observados en el muestreo oscilaron desde leves a severos con rayas cloróticas, vainas foliares exteriores partidas y distorsión general de la filotaxia siendo los vistos con mayor frecuencia, seguidos por rayado necrótico, rayas color marrón, hoja cigarro necrótica, líneas anchas de color amarillo a lo largo de la hoja, también se observó otros síntomas como rayado clorótico-necrótico, margen púrpura de las hojas, manchas color café en el peciolo, tejido necrótico en la sección transversal del pseudotallo, pecíolos partidos, hipertrofia de la nervadura secundaria, racimo deforme y puntas de las hojas arrugadas. Asimismo, se pudo constatar que no todas las hojas mostraban síntomas, y en algunos casos los síntomas sobre las hojas no fueron evidentes, pero lo fueron síntomas como vainas del pseudotallo partidas y distorsión general de la filotaxia.

En cuanto a la extracción de ADN de todas las muestras se observó una cantidad y calidad de ADN apropiadas para el análisis por PCR como se

muestra en la figura 1. Los análisis de PCR fueron realizados a partir de las extracciones de ADN realizadas con este protocolo.

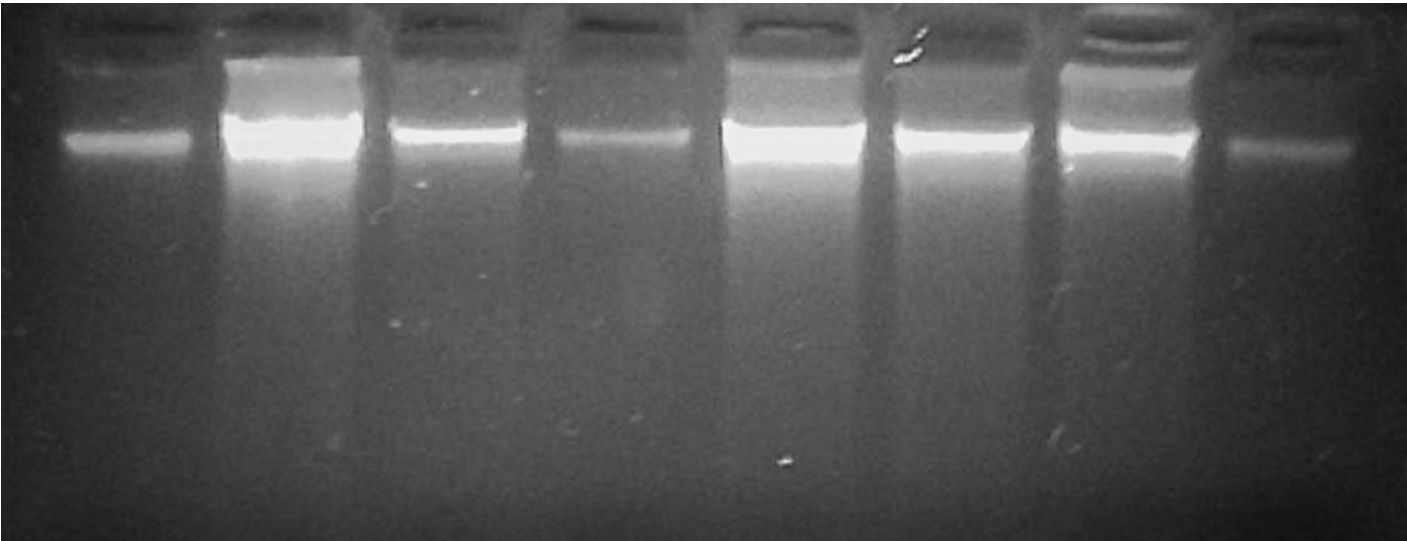


Figura 1. Migración de los extractos totales de ácidos nucleicos teñidos con bromuro de etidio (BE) de varias muestras de banano (*Musa sapientum*,) extraídos con el protocolo descrito, sobre un gel de agarosa de 1.5 %.

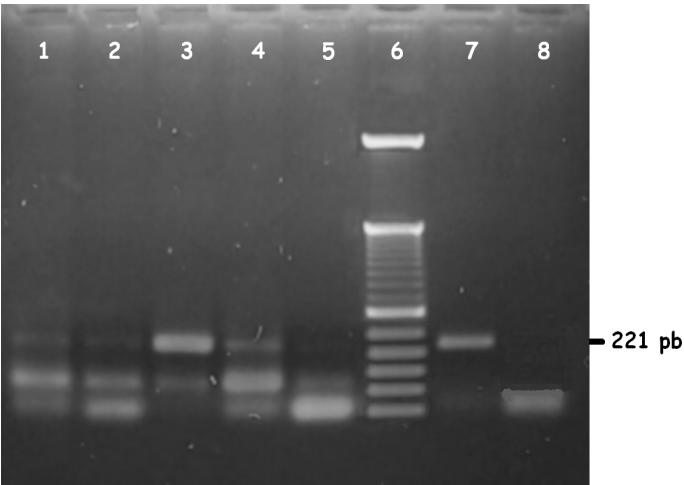


Figura 2. Foto de un gel de electroforesis de 1.5 % de agarosa en el que se muestra la migración de los amplicones de una PCR con los iniciadores ScBV F5 y ScBV R5, y el fragmento de amplificación esperado de 221 pares de bases.

Se pudo confirmar que, de 103 muestras colectadas en el campo, correspondientes a plantas que mostraban síntomas de estar infectadas por BSV, solo 72 dieron resultados positivos a la infección por el virus BSV, como se aprecia en la figura 2, lo cual representa el 69.9 % del total. De las 47 fincas visitadas en la zona bananera de la provincia de El Oro se encontró la presencia de BSV en 42 de estas lo que representa el 89,36 % del número total de fincas, como se aprecia en la tabla 2, de las cuales 19 eran tecnificadas, 12 Semitecnificadas y 16 no tecnificadas.

Tabla 2. Resultados epidemiológicos de BSV, de las muestras colectadas en la provincia de El Oro, luego de realizada la PCR.

	Número	Positivo	Negativo
Fincas	47	89,36%	10,64%
Muestras	103	69,90%	30,10%

En la tabla 3 se puede observar la frecuencia con que fueron encontrados los síntomas sobre plantas que dieron positivo a la infección por un Badnavirus.

Tabla 3. Síntomas encontrados con más frecuencia sobre plantas que dieron resultados positivos a la infección por un Badnavirus.

Síntoma	Frecuencia
Rayado clorótico	56
Distorsión general de la filotaxia	28
Vainas del pseudotallo partidas	27
Rayado color café del pseudopecíolo	13
Rayas color marrón	13
Rayado necrótico	11
Hoja cigarro necrótica	6
Hojas arrugadas	6
Líneas amarillas anchas a lo largo de la nervadura central	4
Manchas necróticas	3
Tejido necrótico en la sección transversal	3
Rayado clorótico-necrótico	2

En el estudio se diagnosticó la infección por el Virus del Rayado del Banano BSV en las plantaciones

bananeras de la provincia de El Oro, utilizando como método una poderosa herramienta como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) realizada a partir de extractos totales de ácidos nucleicos. Los síntomas observados sobre las plantas muestreadas fueron muy variables como se puede observar en la tabla 3, pero se enmarcaron dentro de los descritos por los autores citados (Lockhart & Olszewski, 1993; Lockhart, 1995; Diekmann, et al., 1996; Daniells, et al., 1999; Jones, et al., 2000; Harper, Hart, Moulton & Hull, 2002).

Aunque existe evidencia de la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR cuando esta se realiza a partir de purificaciones de ADN no apropiadas para este proceso en esta investigación hemos sido capaces de superar este inconveniente, y otro, que es la utilización de tediosos y largos procesos de purificación de ADN, con el uso del procedimiento de Zhang, et al., (1998). Lo primero es demostrado por la consistente amplificación del fragmento de ADN esperado y lo segundo por el corto tiempo utilizado en la extracción de ADN de cada muestra.

La amplificación con los iniciadores no fue acorde con los síntomas observados en el campo, esto podría deberse a la incapacidad que tienen los iniciadores preparados para una cepa de detectar otras cepas (Dietzgen, Thomas, Smith & Maclean, 1999), lo cual también se puede constatar con la muy amplia heterogeneidad genética de BSV encontrada en Uganda (Harper, Hart, Moulton & Hull, 2004). Aunque en el trabajo de Caruana (1998), solo obtuvo amplificación a partir de minipurificaciones de partículas virales, nosotros hemos sido capaces de hacerlo a partir de extractos totales de ácidos nucleicos, evitando el tedioso proceso de la minipurificación. En tanto que la integración del genoma de BSV en el genoma de Musa ha sido publicada (Harper, Osuji, Heslop-Harrison & Hull, 1999; Ndowora, et al., 1999; Geering, Olszewski, Dahal, Thomas & Lockhart (2001), el hecho de no existan reportes de BSV integrado en el genoma las plantas del subgrupo Cavendish AAA, más lo demostrado, de que la forma integrada completa está en el genoma B y este se encuentre ausente de los clones del subgrupo Cavendish, el cual es el que se cultiva en nuestra provincia, la no-amplificación del control negativo y la existencia de muestras negativas es evidencia de que no estamos amplificando secuencias integradas en el genoma A. Ya se ha hablado de que los síntomas de BSV pueden ser confundidos por los causados por otros virus (Lockhart, et al., 1993; Diekmann & Putter, 1996; Jones, et al., 2000), los síntomas observados sobre muestras que resultaron ser negativas, son característicos de BSV, sin embargo, no

se descarta que estos pudieran ser atribuidos a la infección por otro virus.

Ya que el origen de los bananos cultivados en El Oro es muy diverso, y la propagación clonal es un factor muy importante en la diseminación de la enfermedad, sumado a que es un cultivo que ha estado establecido durante más de 40 años, entonces, surge la posibilidad de que se encuentren numerosos aislados de BSV infectando banano y que al igual que en Uganda (Harper & Hull, 1998) la variabilidad genética pueda ser muy grande, lo cual impida que seamos capaces de detectar todas las cepas.

Asimismo se ha indicado que las cochinillas vectores de Badnavirus incluyen especies de *Pseudococcus*, *Planococcus*, *Planococcoides*, *Ferrisia*, *Saccharicoccus* y *Dysmicoccus* (Lockhart, 1995, 1998) y de acuerdo al estudio realizado por Armijos & Silva (2004), especies de los géneros *Dysmicoccus* y *Pseudococcus* son encontradas en las bananeras del Ecuador, y con la observación hecha en nuestro País, de que estas son llevadas por hormigas (Jones, et al., 2000), aumenta el riesgo de un brote de BSV, entonces el verdadero rol que juegan las cochinillas y las hormigas en la diseminación de BSV en una plantación de Banano en el Ecuador debe ser establecido. Entonces para poder lograr un diagnóstico confiable de Badnavirus en las bananeras del Ecuador es necesario, como lo mencionado por Lockhart (1995), tener la capacidad de detectar todos los aislados existentes en el campo, y para llegar a hacerlo se necesita realizar una caracterización genómica de los aislados presentes en las plantaciones bananeras, para de esta forma poder tener un conocimiento de la variabilidad genética de BSV en el Ecuador y constatar si la variabilidad genética presente en Uganda ocurre también en otras partes.

CONCLUSIONES

Se diagnosticó la presencia del Virus del rayado del Banano en las plantaciones bananeras de la provincia de El Oro, utilizando como método una poderosa herramienta como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) realizada a partir de extractos totales de ácidos nucleicos

Los síntomas observados sobre las plantas muestreadas son muy variables, pero se enmarcan dentro de los descritos por los autores citados.

El protocolo de extracción de ADN utilizado dio como resultado una buena cantidad de ADN, libre de sustancias inhibitoras, y por lo tanto apropiado para su uso en PCR.

Se identificaron las plantas infectadas con el Virus del Rayado del Banano, ya que luego de la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, a partir de las extracciones de ADN de las mismas y posterior separación de los fragmentos de ADN, productos de dicha reacción, sobre geles de Agarosa, estas produjeron un fragmento de ADN de 221 pares de bases, acorde al tamaño esperado para la región del ADN del virus que flanquean dichos iniciadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armijos, F., & Silva, D. (2004). *Ciclo de vida de los piojos harinosos (cochinillas harinosas) del banano y plátano en el Ecuador*. Guayaquil: INIAP-PROMSA.
- Caruana, M. L. (1998). *Activities of CIRAD virus indexing centre*. Montpellier: INIBAP.
- Daniells, J. W., Smith, M. K., & Hamill, S. D. (1999). *Banana streak disease. An illustrated field guide*. Brisbane: Department of Primary Industries.
- Diekmann, M., & Putter, C. A. J. (1996). *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. Rome: IPGRI.
- Dietzgen, R. G., Thomas, J. E., Smith, G. R., & Maclean, D. J. (1999). PCR-based detection of viruses in banana and sugarcane. *Current topics in Virology*, 1, 105-118.
- Geering, A. D., Olszewski, N. E., Dahal, G., Thomas, J. E., & Lockhart, B. E. (2001). Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak Virus in a range of Musa cultivares. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 207-213. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573008>
- Harper, G. H., & Hull, R. (1998). Cloning and sequence analysis of banan Streak Virus DNA. *Virus Genes*, 17(3), 271-278. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926402>
- Harper, G. H., Hart, D., Moul, S., & Hull, R. (2002). Detection of banana streak virus in field samples from Uganda. *Ann. Appl. Biol.*, 141, 247-257. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00216.x>
- Harper, G. H., Hart, D., Moul, S., & Hull, R. (2004). Banana streak virus is very diverse in Uganda. *Virus Research*, 100(1), 51-60. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036835>
- Harper, G. H., Osuji, J. O., Heslop-Harrison, J. S., & Hull, R. (1999). Integration of Banana streak virus into the Musa genome: Molecular and cytogenetic evidence. *Virology*, 255(2), 207-213. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069945>
- Jones, D. (2000). *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. Worcestershire: Jones, D.R.
- Khumallambam, D. K. (2013). *An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales- suitable for diverse PCR based downstream applications*. Berlin: Springer.
- Lockhart, B. E. (1995). *Banana streak badnavirus infection in Musa: Epidemiology, diagnosis and control*. Food and Fertilizer Technology Center. Recuperado de <http://www.fttc.agnet.org/library.php?func=view&id=20110712183756>
- Lockhart, B. E. (1998). *Management of viral streak in banana and plantain: Understanding a new challenge*. Davao: INIBAP.
- Lockhart, B. E., & Olszewski, N. E. (1993). *Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detections in Musa germplasm*. Montpellier: CIRAD- FLHOR.
- Ndowora, T., et al. (1999). Evidence that badnavirus infection in Musa can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology*, 255(2), 214-220. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069946>
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., & Kirkpatrick, B.C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71(1), 45-50. Recuperado de <https://eurekamag.com/research/045/114/045114021.php>