

IDENTIFICACIÓN DE POTIVIRUS PRESENTES EN PLANTAS DE LULO (*Solanum quitoense* Lam)

IDENTIFICATION OF POTIVIRUS PRESENT IN LULO (*Solanum quitoense* Lam)

Vaca J¹, Torres I¹, Peñaranda J², Aristizábal F^{1 y 3}.

RESUMEN

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), siendo una planta nativa de la región andina con gran potencial comercial, aún está en proceso de domesticación y presenta problemas fitosanitarios de importancia. La enfermedad del Amarillamiento de la hoja que causa pérdidas importantes fue descrita por Zuluaga (1996); de acuerdo con su sintomatología (enanismo, muestras de patrones de amarillamiento o de mosaico en hojas, las que a su vez sufren enrollamientos de los bordes hacia la parte baja), se atribuía a la acción de un virus no identificado. Dada la especificidad mostrada por los virus y la semejanza de la enfermedad con la causada por potivirus en otras solanáceas, se planteó que debía ser un virus de este género el causante de la enfermedad. El presente trabajo buscó determinar la presencia de virus del tipo potivirus en muestras recolectadas en localidades del Departamento de Cundinamarca (municipios de Albán y Pasca) y sin pretender hacer estudios de tipo epidemiológico, se trató de establecer si la presencia de potivirus pudiese estar relacionada con la aparición de la sintomatología típicamente descrita. Se aplicaron dos metodologías que han demostrado tener buena sensibilidad y reproducibilidad: análisis de RNA de doble cadena (dsRNA) (Morris y Dodds, 1979) y ensayos de RT-PCR empleando "primers" específicos diseñados por Langeveld et al (1991). Fue posible detectar la presencia de potivirus en algunas de las muestras estudiadas, sin embargo, no se encontró correlación entre su aparición y el desarrollo de sintomatología por parte de las plantas.

Palabras claves: Potivirus, *Solanum quitoense* Lam, Patologías de Lulo, dsRNA, RT-PCR.

SUMMARY

The Solanaceous fruit *Solanum quitoense* Lam, is originally from Andean region of South America. This fruit has commercial prospective. The Leaf Yellowing Disease in Lulo (*Solanum quitoense* Lam) was first described by Zuluaga in 1991. It causes economically losses and has been associated with a virus attack. The disease's symptoms included stunting, yellow streaking or

mosaic patterns in leaves, often with a curling of the leaf margins. In order to diagnostic the presence of virus, we applied two different strategies. The first one consisted of a modified technique of RNA double strand isolation (Morris and Dodds, 1979). The second one consisted on applying RT-PCR system using specific "primers" designed to amplify cDNA fragments spanning the 3'-terminal part of the Nlb cistron and the 5'-terminal part of the potyvirus CP cistron (Langeveld et al 1991). By applying the modified method of Morris and Dodds, it was possible to observe characteristic bands of double strand RNA. Amplification with "primers" POT1 and POT2 yielded a fragment of about 1 Kpb, whose length was in agreement with the known sequences of potyvirus. Here we report by the first time a potyvirus presence in Lulo plants affected with leaf yellowing disease, identified by dsRNA analysis and RT-PCR procedure.

Keywords: Potyvirus, *Solanum quitoense* Lam, phytopathology, dsRNA, RT-PCR

INTRODUCCIÓN

Los potivirus constituyen el género más grande y el de mayor importancia económica por las pérdidas que causan, de los cuarenta y siete reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV de su nombre en Inglés); fue propuesto en 1959 con tan solo 14 miembros llegando a alcanzar en 1992, un total de 180 (ICTV, 1993; Martelli, 1996; Matthews, 1991; Shulka y Wald, 1989; Zaccorner, 1995). Su morfología es bastante uniforme ya que semejan varillas "flexuosas" de entre 11 a 12 nanómetros (nm) de diámetro y cuya longitud oscila entre los 680 a 900 nm. La estructura resulta de la organización que adopta la molécula de ácido nucleico de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA +) alrededor de la cual se encuentran enrolladas proteínas de un solo tipo

¹ Centro Internacional de Física ²⁻³ Universidad Nacional de Colombia

² Facultad de Medicina y ³ Dpto. Farmacia, Facultad de Ciencias.

(Kojima et al, 1969 Hill y Benner 1976; Matthews, 1991; Riechmann et al, 1992).

El cultivo de Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) está ampliamente distribuido en pequeñas parcelas, por toda Colombia. Sin embargo, las plagas, enfermedades y su restringida adaptación ecológica son serios limitantes para su producción masiva. Dentro de las patologías que más lo afectan está la denominada "Amarillamiento de la hoja u hoja en abanico" (Zuluaga, 1996), cuya sintomatología se asemeja a las causadas por virus en otras Solanáceas. Puesto que la mayoría de los agentes virales tienen un rango de hospedero relativamente estrecho, se sugiere que los mismos tipos de virus causen patologías semejantes entre plantas del mismo género como en el caso de la papa (*Solanum tuberosum* L.) que es afectada por el potivirus (PVY) y potexvirus (PVX) mostrando la aparición de mosaicos tanto suaves como severos y un encrespamiento y desarrollo de rugosidades en la superficie de las hojas, síntomas semejantes a los descritos para la enfermedad descrita por Zuluaga (1996). La presente investigación planteó emplear metodologías de Biología Molecular y Bioquímica ampliamente conocidas, para el estudio de muestras recolectadas en el Departamento de Cundinamarca, que exhiben la sintomatología característica descrita, con miras a establecer una asociación entre la aparición de estos síntomas y la posible presencia de virus del género potivirus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de material vegetal. Se recolectaron muestras de hojas jóvenes de plantas de Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) que mostraran la sintomatología descrita para la patología "Amarillamiento de las hojas", y que estuvieran localizados en cultivos del Departamento de Cundinamarca (Municipios de Albán y Pasca). Las muestras fueron almacenadas de manera adecuada y conservadas a 4 °C durante el transporte.

Aislamiento y análisis de los RNAs de doble cadena (dsRNA): para el diagnóstico de virus de plantas se emplea la metodología propuesta por Morris and Dodds (1979) y modificada por Valverde et al (1986). Durante todos los procedimientos el material de vidrio y plástico a emplear se trata con dietilpirocarbonato (DEPC 0.1%) (Farrell, 1993). Se toman entre 7 y 14 gramos de material vegetal (hojas) en un mortero, empleando nitrógeno líquido se pulveriza. Se homogeniza con 14 mililitros (ml) de tampón STE (2X) (0.2 M de NaCl; 100 mM de Tris; 2mM de EDTA pH 6.8) preenfriado (4 °C). Adicionar 20 ml de fenol saturado con tris 0.1 M pH 7; 2 ml de SDS (10%); 1 ml de dietilditiocarbamato (3.5 M); 1 ml de sulfito de sodio 0.01 M y 14 mg de bentonita, agitando la mezcla durante una hora manteniendo a 4 °C. El homogenizado es sometido a centrifugación durante 15 minutos a 4 °C y 6750 gravedades (g). Se toma la fase acuosa y ajusta al 16.5% con etanol absoluto, se adiciona 1 gramo de celulosa CF-11 que actúa como absorbente.

Continuar la agitación de la mezcla durante toda la noche y finalmente para retener el sólido, se hace pasar a través de una jeringa plástica de 20 ml, se lava la columna 2 veces con 30 ml de solución STE (1X) al 16% de etanol preenfriado (4 °C). Los dsRNA son eluidos con 14 ml de STE (1X) sin etanol y sometido a precipitación a 4 °C durante 12 horas, por adición de dos volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de solución de acetato de sodio 3 M pH 5.5, se centrifuga durante 15 minutos a 4 °C a 9540 g. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el sólido al medio ambiente durante al menos 45 minutos. Resuspender en 10 microlitros de TAE (0.04 M Tris-acetato; 0.001 M de EDTA pH 8) almacenando a 4 °C hasta que se realice el análisis electroforético, el cual se lleva a cabo en geles de poliacrilamida al 6%, de 0.75 mm de espesor en cámara SE 250 Mighty (Hoeffer®), empleando como tampón de corrido TAE, aplicando 100 voltios constantes durante 3 horas. Las muestras se revelaron mediante tinción con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante 10 minutos (Farrell, 1993) y/o con plata (Blum et al, 1987). Los pesos moleculares aproximados se calcularon según el método gráfico de Bozart y Harley (1976) utilizando como marcador de peso molecular el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III.

Extracción de RNA total: Otra de las técnicas útil para la detección de virus fitopatogénicos es mediante el aislamiento de RNAs totales, su transformación a DNA y posterior amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando "primers" específicos para potivirus. Para tal fin se aísla el RNA total a partir de 100 mg de material fresco empleando TRIzol® (Gibco-BRL). Las muestras aisladas son resuspendidas en 25 ml de agua tratada con DEPC. La síntesis de la primera cadena se realizó partiendo de volúmenes diferentes de RNA total aislado (2.5 y 51), mediante el Kit SUPERSRIPTII según la metodología descrita por el fabricante.

Amplificación mediante reacción de PCR: Empleando los "primers" degenerados POT1 (5'-ACCACGTATCTTTTA-3') y POT2 (5'-TGTGATGCTGATGGTTC-3'), diseñados porque amplifican de manera específica parte de la secuencia más conservada de potivirus (Langeveld et al, 1991). Las condiciones de amplificación empleadas fueron: 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de: 1 min a 94 °C; 1 min a 58 °C; 30 segundos a 72 °C, y al final se aplica una rampa de 5 min a 72 °C. La reacción una vez terminada se almacena a 4 °C.

Inoculación mecánica de plantas indicadoras: Empleando 4 gramos de material recolectado sobre el cual previamente se había demostrado la presencia de potivirus, el cual se maceró en mortero empleando tampón fosfato 10 mM preenfriado (4 °C) junto con aproximadamente 8 gramos de carborundum®. El extracto fue colocado sobre las hojas de plantas indicadoras de *Nicotiana tabacum* cv, White barley y Xanthi de dos meses de edad y posteriormente se mantuvieron en invernadero a una temperatura promedio de 20 °C y máxima promedio de 25 °C.

^QC con fotoperiodo normal de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se llevaron a cabo observaciones diarias durante los siguientes 20 días con el fin de registrar las posibles manifestaciones patogénicas.

- *Pruebas de especificidad para los "primers" POT1 y POT2:* Esta prueba se llevó a cabo con el fin de determinar el grado de conservación de las regiones potivirales a partir de las cuáles POT1 y POT2 fueron diseñadas. Por medio de Internet, se adquirieron alrededor de 107 secuencias de poliproteínas de potivirus reportadas hasta el mes de Mayo de 1998, las cuáles estaban almacenadas en diversos bancos de genes. Dichas secuencias fueron sometidas a un proceso de alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTALW versión 1.7 que se encuentra disponible dentro de la batería de herramientas del Servidor del Instituto Pasteur (Francia). Los resultados de dicho procedimiento fueron analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

- *Características observables del material vegetal recolectado:* Las hojas jóvenes recolectadas en los diversos muestreos, presentaban en la gran mayoría de los casos y con diferente intensidad, a nivel de su haz, zonas amarillentas y el enrollamiento del limbo hacia adentro acompañado de rugosidades en la superficie de las mismas, las plantas muestreadas tenían un tamaño, inferior al promedio de altura presentado por otras plantas de lulo aparentemente sanas de las mismas plantaciones. Es importante anotar que durante los muestreos sucesivos se detectó una mayor incidencia de la sintomatología descrita para el amarillamiento de la hoja en el municipio de Pasca, comparado con la zona de Albán.

• *Patrones de RNA de doble cadena:* En la figura 1 se observan algunos de los resultados de los ensayos para determinar patrones electroforéticos de dsRNA en muestras de lulo recolectadas en las localidades de Pasca y Albán. En la muestra colocada en el carril 6 (fig 1), obtenida a partir de 14g de material vegetal recolectado en Pasca, fue posible evidenciar cinco bandas definidas: cuatro entre 0.5 Kbp y los 4.3 Kbp y una última banda muy difusa con peso mayor de 6.5 Kbp. En las restantes muestras analizadas no se detectó bandeo alguno con excepción del obtenido con la muestra del virus del moteado del clavel (CMV), el cual fue utilizado como control positivo y en donde es posible observar la banda de 1.2 Kbp, una de las cuatro comúnmente reportadas para este virus (0.9; 4; 1.2 y 8 Kbp) (Rodríguez, 1998). Solamente en algunos de los ensayos realizados con 14 g de hojas de lulo procedentes de Pasca fue visualizado bandeo tenue, lo que podría indicar un bajo título viral o incluso a la posibilidad de que en el material aparentemente sintomático no estén presentes virus de éste tipo. Para las muestras procedente de Albán no fue posible detectar presencia de bandeo en ninguno de los casos, lo cual

puede atribuirse no sólo a la posibilidad de tener un bajo título viral. Además si tenemos en cuenta que sintomatologías similares pueden presentarse asociadas a diferentes factores que van desde deficiencias nutricionales hasta por el ataque por nemátodos y otros patógenos, por tanto queda planteada la posibilidad de

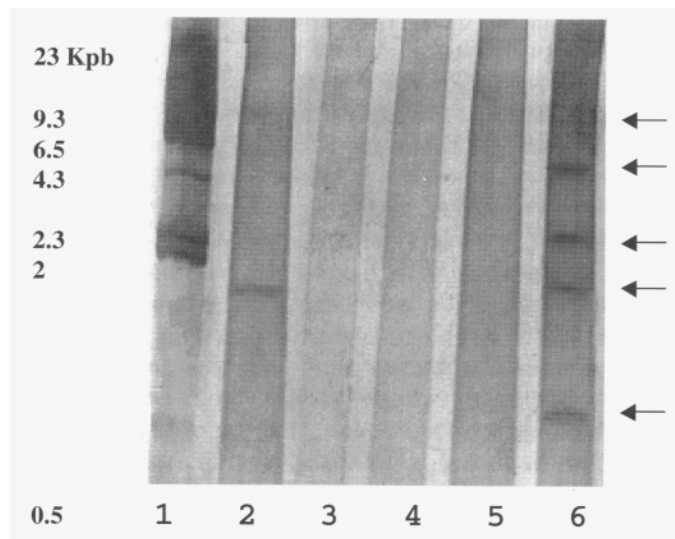


Figura 1. Electroforesis en gel de Poliacrilamida de dsRNA.

I Hind III (1); Virus del Moteado del Clavel (2); extractos de Albán (3); Albán 14g (4); Pasca (5); Pasca 14g (6) (Tinción en Nitrato de Plata).

que en las plantas muestreadas en los alrededores de esta localidad, no haya presencia de agente virales.

- Los resultados expuestos nos indican que es muy factible que haya presencia de virus vegetales en muestras recolectadas en las vecindades del municipio de Pasca. Ahora bien aunque la técnica propuesta por Morris y Dodds (1979) y modificada por Valverde y Dodds (1987) permitía detectar la presencia de virus en vegetales no parecía posible que se pudiera emplear para identificarlos plenamente. Sin embargo otros trabajos, como los realizados por Dodds y Bar-Joseph (1983), Dodds et al (1984; 1987), Moreno et al (1990), Valverde et al (1991) entre otros, han permitido establecer de manera general, la existencia de perfiles electroforéticos de dsRNA característicos para algunos de los géneros más importantes de virus vegetales. Esto significa que se puede hacer una comparación aproximada de los patrones de movilidad dsRNA detectados en un estudio, con aquellos preestablecidos para algunos géneros vírales, pudiendo delimitar el género ó géneros al cuál un virus puede pertenecer. Con tal fin se llevó a cabo la comparación de la movilidad electroforética del dsRNA obtenidos en lulo (fig. 1-carril 6) con perfiles estándar antes mencionados, en donde se puede afirmar tentativamente, que las bandas de dsRNA obtenidas con pesos mayores de 6.5kbp podrían estar correlacionadas, con el valor preestablecido para aquellas entidades vírales pertenecientes al género de los

potivirus, dado que el tamaño de su genoma, RNA de hebra simple (ssRNA) tiene un peso promedio entre 4.5 y 7.5 Kb, a partir del cuál se concluye que la forma replicativa del mismo, que es bicatenaria (dsRNA), tendría aproximadamente el mismo peso pero expresado en pares de bases (Kpb) (Valverde et al, 1986; Valverde et al, 1991). Además según lo reportado en la literatura se puede sugerir que las 4 bandas de baja intensidad y pesos moleculares inferiores a 4.3 Kpb (fig. 1 -carril 6), podrían corresponder a moléculas de RNA subgenómicas muy comunes en estos virus y cuya función biológica hasta hoy es desconocida, pero que dada su localización singular y repetitiva se han convertido en marcadores moleculares útiles ya que permiten diferenciar entre virus y cepas de virus particulares (Acosta et al, 1994; Moreno et al, 1990; Valverde y Dodds, 1987). Moreno et al (1990), proponen la existencia de dos agrupaciones de virus vegetales según las bandas de RNA subgenómicas que presentan. Un primer grupo constituido por closteovirus, tobamovirus y timovirus en los cuáles son fácilmente detectables RNAs tanto de alto peso molecular (alrededor 20 Kpb), como de bajo (0.6 Kpb aproximadamente) y, una segunda agrupación que abarcaría los carlavirus, potexvirus y potivirus que presentan RNAs subgenómicos de bajos pesos moleculares (0.6 a 7.5 Kpb) (Valverde et al, 1986).

- De un total de 65 muestras recolectadas en campo, 50 fueron analizadas con la técnica de dsRNA y sólo en dos ocasiones y sólo cuando se partió de 14 g de material vegetal, hubo claros resultados positivos, es decir bandas de dsRNA. La razón para usar 14 g y no 7 g como lo sugería la técnica inicialmente, se fundamentó en que en muchos ensayos realizados con 7 g, no fue posible evidenciar bandeo alguno en los geles (Valverde et al, 1986). Por otro lado se sabe que la metodología de diagnóstico basada en el dsRNA, es mucho más efectiva para la detección de carlavirus, tobamovirus y potexvirus, algunos de los cuáles tienen títulos tan altos en sus hospederos que tan sólo con 1,5 g de tejido es posible llevar a cabo el diagnóstico contundente. Sin embargo en determinados casos, principalmente asociados a luteovirus y potivirus, caracterizados por tener, en la gran mayoría de los casos, bajas concentraciones en los tejidos por ellos infectados, esta metodología de detección puede ser poco eficiente (Valverde y Dodds, 1986; Hu et al 1995; Valverde et al, 1991). Dado que sólo para unas pocas muestras de las plantas de lulo sintomáticas recolectadas, se detectaron bandas típicas de dsRNA, cuyo patrón podría corresponder al reportado como característico del género de los potivirus, se hacia necesario experimentos que permitieran corroborar la hipótesis de que la sintomatología descrita en Lulo está asociada a la presencia de potivirus

- RT-PCR utilizando "primers" degenerados específicos para potivirus:** Langeveld et al (1991) propusieron la utilización de esta metodología para detectar la presencia de virus del genero potivirus en tejidos

vegetales, mostrando resultados altamente específicos y exitosos. En todos los ensayos se prefirió emplear como «primer» para la síntesis de la primera cadena del cDNA OligodT₁₂₁₈, porque aunque se podría emplear POT1 los trabajos de Langeveld et al (1991), describían que al utilizar "primers" degenerados como cebadores para la síntesis de la primera cadena del cDNA, la amplificaciones finales del PCR de la segunda cadena arrojaban un excesivo número de fragmentos de naturaleza inespecífica causando serias dudas sobre la efectividad de esta vía para obtener cDNA. Los "primers" empleados para la síntesis de la segunda cadena fueron los diseñados por Langeveld et al (1991), quienes mediante el análisis de las secuencias de las poliproteínas producidas por más de 10 potivirus diferentes, tomando aquellas regiones de aminoácidos conservadas y codificadas por codones de baja degeneración, encontraron zonas conservadas de donde se definieron las secuencias de POT1 y POT2 los cuáles permiten la amplificación específica del extremo 3' terminal del cistron NIb y de la región 5' terminal del gene de la cubierta de la cápside, que corresponden a zonas conservadas separadas por una región divergente, de modo que esta amplificación producen fragmentos entre 1 y 1.3 Kpb. En la figura 2 se muestran los productos obtenidos por PCR para algunos de los ensayos realizados, así para algunas de las muestras provenientes de material vegetal recolectado en Pasca, el producto de amplificación tuvo un peso molecular de alrededor de 1 Kpb. En algunos casos aunque se comprobó la síntesis de cDNA, no fue posible obtener amplificación mediante la técnica de PCR (carril 4, muestra de la región de Pasca), lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos

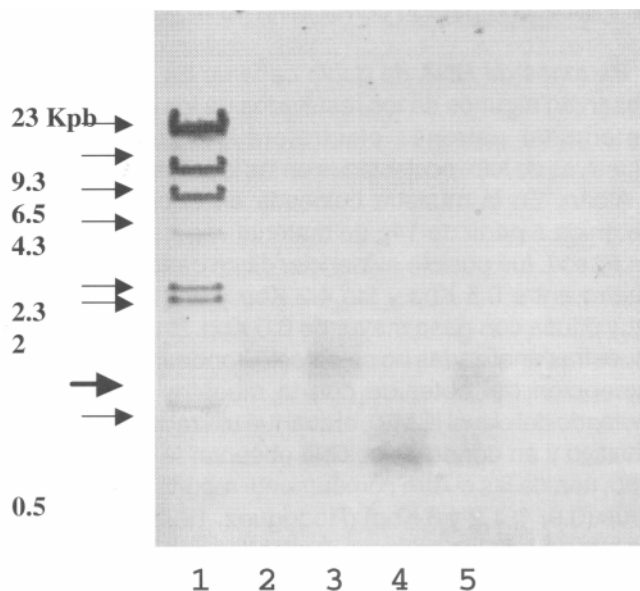


Figura 2. Productos de amplificación de los ensayos de RT-PCR. (1)1 Hind III; (2 a 5) Diferentes reacciones de amplificación obtenidas ensayando muestras de los alrededores de Pasca. (Tinción con Bromuro de Etidio).

para los ensayos de dsRNA, en los cuáles el hecho de analizar plantas con sintomatología aparente no aseguraba la obtención de bandedo. De igual manera aunque la técnica de RT-PCR está propuesta como muy específica, sensible y robusta (Langeveld et al 1991), el no detectar las bandas características en los ensayos podría estar relacionado con un bajo título viral como se propuso para el caso de los ensayos de dsRNA. Para los ensayos de RT-PCR del material recolectado en las vecindades de la localidad de Albán en ninguno de los casos se logró amplificación alguna a pesar de que se demostró la síntesis de cDNA previamente y que se tuvieron las mismas condiciones experimentales de los ensayos positivos, ya que los ensayos fueron simultáneos para las muestras provenientes de ambas localidades. El no haber obtenido amplificación con las muestras de la zona de Albán, sumado a los resultados obtenidos para los ensayos de dsRNA y con base en los hechos documentados se puede plantear que muy posiblemente en esta zona no se tenga presencia de potivirus alguno y por ende la sintomatología detectada no estaría asociada con ellos; o que en el caso de que existan, están en títulos realmente bajos e igualmente no se tendría una correlación directa con su presencia y la aparición de la sintomatología descrita.

- De las 65 muestras recolectadas a 20 de ellas se les hizo RT-PCR, en cuatro de las cuales hubo resultado positivo, coincidiendo sólo una de ellas con el resultado claro obtenido por la técnica de dsRNA (sistema por el cual se analizaron la totalidad de las muestras). Ya que sólo en algunas de ellas con sintomatología y sólo en las recolectadas en los alrededores de la localidad de Pasca, se pudo detectar la presencia de potivirus mediante las metodologías (dsRNA y RT-PCR), los resultados no permiten afirmar contundentemente que éste sea el agente causal de la enfermedad conocida con el nombre de "Amarillamiento de la hoja u hoja en forma de abanico" como lo propuso Zuluaga (1996) y por el contrario indicaría que hay una alta probabilidad de que no sea así. Para comprobar esta idea se necesitaría hacer estudios adicionales con pruebas biológicas tales como el aislamiento del virus e inoculación en plantas indicadoras mediante vectores específicos.

- Si se analizan dos factores expuestos previamente, se tiene. Primero las patologías vegetales de origen viral usualmente no son causadas por un solo tipo de virus sino por la acción sinérgica de varios (Matthews, 1991). Segundo la mayoría de los agentes vírales tienen un rango de hospederos relativamente estrecho, en el caso las Solanáceas, como por ejemplo la papa (*Solanum tuberosum* L.) que es afectada simultáneamente por potivirus (PVY) y potexvirus (PVX), se detectan sintomatologías comunes, por tanto se hace necesario determinar la presencia en lulo, de otros virus vegetales tales como los potexvirus.

- *Inoculación mecánica hecha con un extracto de hojas de lulo recolectado en campo:* Siendo necesario tratar de transferir el o los posibles virus del Lulo a plantas indicadoras ampliamente susceptibles, para evaluar la posibilidad de inducir las sintomatologías, se usaron las plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi y White barley, las cuales se inocularon por medios mecánicos mediante extractos obtenidos a partir de material en el cual se detectó la presencia de potivirus, posteriormente se mantuvieron bajo observación rutinaria durante veinte días, sin embargo, no se detectaron cambios en ellas, siempre se encontraron aparentemente sanas. La no aparición de sintomatología en las plantas inoculadas coincide con los resultados de Zuluaga (1996), quien reporta que el virus relacionado con la enfermedad "Amarillamiento de la hoja u hoja en forma de abanico" no ha podido ser transmitido mecánicamente y se sospecha que sean pulgones pertenecientes de los géneros *Myzus* y *Aphis* los que de manera persistente podrían transmitirla.

- *Especificidad de POT1 y POT2 para la amplificación del genoma Potiviral:* Ciento siete secuencias de poliproteínas de potivirus fueron sometidas a un proceso de alineamiento múltiple utilizando el programa Clustalw versión 1.7. En la figura 3 están los alineamientos correspondientes a la zona de la proteína NIb obtenidos para los diferentes potivirus encontrados en los bancos de datos. En este caso específico se observa que para la gran mayoría de las secuencias potivirales estudiadas, el motivo con el cual fue diseñado POT2 (CDADGS) se encuentra altamente conservado. Para el caso de la figura 4, que presenta los alineamientos correspondientes a la zona de la proteína de la cápside de las diferentes secuencias de potivirus disponibles en los bancos de datos, se ve que el motivo sobre el cual se diseñó POT1 (WCIEN) se encuentra en la mayoría de las secuencias potivirales analizadas, siendo altamente conservado. Para algunos casos particulares no hubo resultado de alineamiento debido a que se trataba de secuencias parciales que no cubrían una de las zonas en estudio. En general los resultados obtenidos de los alineamientos múltiples, aquí expuestos, permiten afirmar que prácticamente es improbable obtener productos de amplificación utilizando POT1 y POT2 en procedimientos de RT-PCR llevadas a cabo sobre material genético cuyo origen no sea potiviral.

CONCLUSIONES

Por vez primera se determinó la presencia de un potivirus en plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam) empleando las técnicas de dsRNA (Morris & Dodds, 1979) así como por RT-PCR usando "primers" degenerados específicos (POT1 y POT2) (Langeveld et al 1991). Este potivirus detectado en lulo tiene un patrón de bandas de dsRNA de al menos cinco bandas cuyos pesos moleculares relativos son: cuatro entre 0.5 y 4.3 Kpb y una banda difusa de más de 6.5 Kpb.

1.	WDTLLRLKLPD	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	37.	WDKLLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	73.	-----	QFHCSSLPTYL
2.	WDTLLRLKLPD	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	38.	WDKLLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	74.	-----	QFHCSSLPTYL
3.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	39.	WDKLLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	75.	WDFLSELP	GWVYDADGS
4.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	40.	WDKLLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	76.	WDFLSELP	GWVYDADGS
5.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	41.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	77.	WDFLSELP	GWVYDADGS
6.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	42.	WDLRLTSLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	78.	WDFLSELP	GWVYDADGS
7.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	43.	WDLRLTSLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	79.	WDFLSELP	GWVYDADGS
8.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	44.	WDLRLTSLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	80.	CDRLLESPLD	GWVYCDADGS
9.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	45.	WDLRLTSLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	81.	WDLMLRSLPD	GWVYCDADGS
10.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	46.	DKLLTALP-A	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	82.	WDLMLRSLPD	GWVYCDADGS
11.	WNLMLRKLPE	GWVYVDADGS	QFDSLSPTYL	47.	DEFLRKF-P	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	83.	WDLMLRSLPD	GWVYCDADGS
12.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	48.	DEFLRKF-P	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	84.	WDLMLRSLPD	GWVYCDADGS
13.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	49.	DRLLLESPLD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	85.	WDLMLRSLPD	GWVYCDADGS
14.	WNLMEALPS	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	50.	DRLLLESPLD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	86.	DKLMWELP-D	GWVYCDADGS
15.	WNLMEALPS	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	51.	DSLANKLP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	87.	DKLMWELP-D	GWVYCDADGS
16.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	52.	DKLMWELP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	88.	-----	CDADGS
17.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	53.	DKLMWELP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	89.	-----	CDADGS
18.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	54.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	90.	-----	CDADGS
19.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	55.	EKLHDKLNP	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	91.	-----	CDADGS
20.	LLHALPALPD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	56.	DTLMRKL-P	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	92.	-----	CDADGS
21.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	57.	DTLMRKL-P	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	93.	-----	CDADGS
22.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	58.	DRLLNSLP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	94.	-----	CDADGS
23.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	59.	DRLLNSLP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	95.	NEFLSKLP-D	GWVYCDADGS
24.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	60.	DRLLNSLP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	96.	DRLLSKLP-D	GWVYCDADGS
25.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	61.	DKLLLESPLD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	97.	-----	CDADGS
26.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	62.	DEFLRKF-P	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	98.	NRLLDALP-D	GWVYCDADGS
27.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	63.	NRLLDALP-D	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	99.	DEFLRKF-P	GWVYCDADGS
28.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	64.	DLMLRSLPD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	100.	DTFMNKL-P	GWVYCDADGS
29.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	65.	DLMLRSLPD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	101.	NKLANFNL-P	GWVYCDADGS
30.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	66.	DLMLRSLPD	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	102.	DLMLRSLPD	GWVYCDADGS
31.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	67.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	103.	WDLRLRLE	NWICYDADGS
32.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	68.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS	QFDSLSPTYL	104.	WDLRLRLE	NWICYDADGS
33.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	69.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	105.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS
34.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	70.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	106.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS
35.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	71.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	107.	QNLKYLKLP	GWVYCDADGS
36.	WDLRLRLE	NWICYDADGS	QFDSLSPTYL	72.	-----	CDADGS	QFDSLSPTYL			

Figura 3. Alineamientos obtenidos para los diferentes potivirus reportados en los bancos de datos: zona correspondiente a la proteínas Nib. Ver cuadro resumen de las secuencias estudiadas.

1.	-----	-----	-----	37.	ETEMPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	73.	-----	-----
2.	KGEMGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	38.	ETEMPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	74.	DTGMGILLNG	LMVWCIENG
3.	DEQMYMIMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	39.	ETEMPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	75.	DEEMALLNG	FMVWCIENG
4.	DEQMYMIMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	40.	ETEMPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	76.	DEEMALLNG	FMVWCIENG
5.	DEQMYMIMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	41.	EQMKILLNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	77.	ESMDIING	FMVWCIENG
6.	DEQMYMIMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	42.	DTGMGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	78.	BKIDIVLNG	FMVWCIENG
7.	-----	-----	-----	43.	DTGMGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	79.	DSMQLVLAG	LMVWCIENG
8.	DNGMQLILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	44.	DEQMKIVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	80.	-----	-----
9.	DSMQLILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	45.	TE-MPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	81.	-----	-----
10.	-----	-----	-----	46.	EA-MGTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	82.	DEQMGWVNG	FMVWCIENG
11.	DTQMTWASG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	47.	NE-MQVVLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	83.	DEQMGWVNG	FMVWCIENG
12.	-----	-----	-----	48.	NE-MQVVLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	84.	EQMGWVNG	FMVWCIENG
13.	-----	-----	-----	49.	DK-MQIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	85.	EQMGWVNG	FMVWCIENG
14.	-----	-----	-----	50.	DK-MQIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	86.	EQMGWVNG	FMVWCIENG
15.	-----	-----	-----	51.	-----	-----	-----	87.	DEQMGWVNG	FMVWCIENG
16.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	52.	-----	-----	-----	88.	DTQMTWMSG	LMVWCIENG
17.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	53.	QQ-MGWMNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	89.	DTQMTWMSG	LMVWCIENG
18.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	54.	NEKWEKLLIA	ACIYFADNGT	SPNVGVWVM	90.	DTQMTWMSG	LMVWCIENG
19.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	55.	DEAWIDALIP	FIQWCCNGT	SPNVGVWVM	91.	DTQMTWMSG	LMVWCIENG
20.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	56.	EQ-MSIVMNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	92.	DTQMTWASG	LMVWCIENG
21.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	57.	EQ-MSIVMNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	93.	DTQMTWASG	LMVWCIENG
22.	DDMSIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	58.	SQ-MGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	94.	DTQMTWASG	LMVWCIENG
23.	DTGMGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	59.	SQ-MGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	95.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG
24.	DTQMTWMSG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	60.	SQ-MGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	96.	EDQMQLILNG	LMVWCIENG
25.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	61.	SQ-MGILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	97.	DQMEIILNG	LMVWCIENG
26.	EQMKIVLNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	62.	NE-MQVVLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	98.	DPQMGILLNG	LMVWCIENG
27.	EQMKIVLNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	63.	EE-MKILLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	99.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG
28.	ESSMEIILNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	64.	EQ-MRILMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	100.	DDQMQLILNG	LMVWCIENG
29.	-----	-----	-----	65.	EAFIDNIPG	WIVHCIVNTT	SSNRKAGSW	101.	DVPMSTILPA	WIVHCIVNTT
30.	EQMKILLNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	66.	EAFIDNIPG	WIVHCIVNTT	SSNRKAGSW	102.	SDLVSWQSLQ	MTKYCGENFK
31.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	67.	-----	-----	-----	103.	DTGMGILLNG	LMVWCIENG
32.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	68.	-----	-----	-----	104.	DEQMYMIMNG	LMVWCIENG
33.	DNEMQVLAG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	69.	DAQMEIVLNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	105.	DEKWEKLLIA	ACIYFADNGT
34.	-----	-----	-----	70.	EQMKIVLNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	106.	NEKWEKLLIA	ACIYFADNGT
35.	-----	-----	-----	71.	ESSMEIILNG	FMVWCIENG	SPNVGVWVM	107.	DEKWEKLLIA	ACIYFADNGT
36.	ETEMPTVMNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM	72.	DQMEIILNG	LMVWCIENG	SPNVGVWVM			

Figura 4. Alineamientos obtenidos para los diferentes potivirus reportados en los bancos de datos: zona correspondiente a la cápside proteica(CP). Ver cuadro resumen de las secuencias estudiadas

Cuadro: Resumen de las Secuencias Estudiadas

Números de acceso de los diferentes potivirus consignados en los diferentes bancos de secuencias empleados en los alineamientos múltiples mostrados en las figuras 3 y 4:

1)Q 85103, 2)Q 67674, 3)P 89304, 4)P 89305, 5)P 89303, 6)P 89307, 7)Q 98811, 8)P 89876, 9)P 90263, 10)P 89203, 11)Q 88172, 12)O 0513279, 13)Q 85272, 14)Q 88502, 15)Q 88504, 16)P 13529, 17)P 89038, 18)P 17767, 19)Q 84925, 20)Q 01681, 21)P 17766, 22)Q 84934, 23)Q 88275, 24)E1291828, 25)JQ0497, 26)P 09814, 27)Q 84898, 28)Q 06120, 29)Q 88506, 30)P 04517, 31)JQ0496, 32)P 19723, 33)P 19724, 34)Q 86873, 35)Q 86874, 36)P 18247, 37)Q 85105, 38)Q 85274, 39)Q 85104, 40)Q 85265, 41)Q 88507, 42)Q 83287, 43)Q 39743, 44)P 89885, 45)Q 02963, 46)Q 01500, 47)Q 85029, 48)Q 01901, 49)P 89509, 50)Q 02597, 51)Q 11436, 52)Q 05912, 53)Q 65399, 54)Q 02442, 55)Q 04574, 56)Q 85057, 57)Q 85071, 58)Q 65892, 59)Q 83137, 60)Q 65852, 61)Q 65883, 62)Q 85030, 63)Q 2748, 64)Q 82933, 65)Q 65729, 66)Q 65730, 67)Q 65654, 68)Q 65660, 69)Q 85102, 70)Q 88925, 71)Q 85197, 72)Q 36182, 73)Q 86723, 74)Q 86724, 75)Q 86149, 76)Q 10243, 77)O 12661, 78)O 12673, 79)Q 85074, 80)Q 88602, 81)Q 86894, 82)Q 90069, 83)Q 98704, 84)Q 89330, 85)Q 89334, 86)Q 36979, 87)P 18478, 88)P 89205, 89)P 89206, 90)P 89204, 91)P 89207, 92)P 89209, 93)P 89219, 94)P 89208, 95)P 29152, 96)O 41344, 97)O 39787, 98)O 39790, 99)P 90213, 100)P 20234, 101)P 89201, 102)P 89683, 103)Q 88274, 104)P 89306, 105)P 87541, 106)P 90245, 107)O 39510.

Respecto a la relación entre las zonas donde se realizaron los muestreos y los resultados obtenidos: solamente en algunas de las muestras recolectadas en las vecindades del municipio de Pasca (Cundinamarca), las cuáles presentaban sintomatología, pudo detectarse de manera clara la presencia de potivirus; por tanto no es posible afirmar que ésta entidad viral detectada sea el agente causal de la enfermedad conocida con el nombre de "Amarillamiento de la hoja u hoja en forma de abanico". La no aparición de sintomatología en las plantas indicadoras de tabaco que fueron inoculadas con un extracto obtenido a partir de material vegetal sintomático, en el cual se comprobó la presencia de potivirus mediante los dos tipos de ensayos (dsRNA y RT-PCR), coincide con los resultados de Zuluaga (1996), quién describe que el virus relacionado con la enfermedad "Amarillamiento de la hoja u hoja en forma de abanico" no pudo ser transmitido mecánicamente, reforzando su propuesta de que posiblemente se requiera de la acción de algunos tipos de pulgones como vectores de transmisión.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas: Al Centro Internacional de Física (CIF) por el patrocinio para llevar a cabo esta investigación, a COLCIENCIAS institución que mediante el proyecto "Aplicación de algunos marcadores Bioquímicos y Moleculares de resistencia en el análisis de tres especies del género *Solanum* Lam." (2228-12-390-96). Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. Al Ingeniero Agrónomo Edgar González Forero, de la Universidad de Cundinamarca por su valiosa colaboración en la localización y consecución del material vegetal. Al Doctor Frank Ducuara, Director del Laboratorio de Fitopatología de FlorAmérica. A la Doctora Sonny Liliana González Sánchez del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, O., A. Alegría., M. Guzman 1994.** El Virus de la Tristeza de los Cítricos: Una Grave Amenaza para la Agricultura Colombiana. Edit. Científica, Bogotá 60p.
- Blum, H.; Beier, H. & H.Gross.** 1987. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophor.* 8:93-99.
- Bozard, R.F. & E.H. Harley.** 1976. The Electrophoretic Mobility of Double Stranded RNA in Polyacrylamide Gels as a Function Molecular Weight. *Biochem.Biophys.Acta* 432:329-335. **Dodds, J.A. and M. Bar-Joseph.** 1983. Double-Stranded RNA from Plant Infected with Closteroviruses. *Phytopathol.* 73: 419-423. **Dodds, J.A., T.J. Morris and R.L. Jordán.** 1984. Plant Double-Stranded RNA. *Ann.Rev.Phytopathol.* 22:151-168. **Dodds, J.A., T.Jaurupat., C.N. Roistacher** 1987. Detection of Strain Specific Double-Stranded RNAs in Citrus Species Infected with Citrus Tristeza Virus: A Review. *Phytophylactica.* 19:131-139. **Farrell, R.E.** 1993. RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization.. Academic Press, San Diego. 317p. **Hill & Benner** 1976 Properties of potyvirus RNAs: Turnip Mosaic Tobacco Etch and Mosaic Dwarf Viruses. *Virol.* 75: 419-432. **HU, J.S., H.P.LI., K. BARRY**1995. Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR Assays for the Detection of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting Banana in Hawaii. *Plant Dis.* 79: 902-906. **ICTV "International committee on taxonomy of virus** 1993. Virus Taxonomy update. *Arch. Virol.* 133:491-498. **Kojima, M., Eshikamata, M., Sugawara** 1969. Purification and Electron Microscopy of Pótaló Leafroll Virus. *Virol* 39:162-174. **Langeveld, S.A., J. Dore., J. Memelink** 1991. Identification of Potyviruses using the Polymerase Chain Reaction with Degenerate primers. *J.Gen.Virol.* 72:1531-1541.
- Martelli, G.P.** 1996. Classification and Nomenclature of Plant Viruses: State of the Art. *Plant Dis.* 76(5):436-442.
- Matthews, R.E.F.** 1991. *Plant Virology.* Sth.edit. Academic Press, New York. 835p
- Moreno, P., J. Guerri & N. Muñoz.** 1990. Identification of spanish Strains of citrus Tristeza Virus by Analysis of Double-Stranded RNA. *Phytopathol.* 80: 477-482
- Morris, T.J. & J.A. Dodds.** 1979. Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathol.* 69:854-858.
- Riechmann, J.L., Lain, S. and García, J.A.** 1992. Highlight and Prospects of Potyvirus Molecular Biology. *J Gen. Virol* 73:1-17.
- Rodríguez, A.Y.** 1998. Caracterización Molecular parcial del Virus del Moteado del Clavel (CarMV) presente en la Sabana de Bogotá. Tesis Maest. .Fac. Cieñe. Univ. Javeriana. Bogotá. 78p. **Shulka, D.D. & Ward, W.** 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of potyvirus Group. *Adv. Vir. Res.* 36:274-314.
- Valverde, R.A., J.A. Dodds.** 1986. Double-Stranded Ribonucleic Acid from Plants Infected with Viruses Having Elongated Particles and Undivided Genomes. *Phytopathol.* 76:459-465. **Valverde, R.A. & J.A. Dodds.** 1987. Some Properties of isometric Virus Particles which contain the Satellite RNA of Tobacco Mosaic Virus. *J. Gen.Virol.* 68: 965-972.
- Valverde, R.A.** 1991. Analysis of Double-Stranded RNAs for Plant Virus Diagnosis. *Plant Dis.* 74(3):255-258.
- Zaccomer, B. Haenni, A. & Macaya, G.** 1995. The Remarkable variety of Plant RNA Virus Genomes. *J. Gen. Virol.* 66:1201-1207.
- Zuluaga, M.** 1996. Plagas y Enfermedades del Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). En Instituto Colombiano Agropecuario. Boletín de Sanidad Vegetal 11:37-41.