
INCIDENCIA DEL VIRUS *Southern bean mosaic virus* (SBMV) EN CARAOTAS (*Phaseolus vulgaris* L.) EN EL ESTADO ARAGUA, VENEZUELA, Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARCIAL DE UN AISLAMIENTO VIRAL

Edgloris Marys, Thaly Fernández-Rodríguez y Alexander Mejías

RESUMEN

Durante muestreos realizados en los principales municipios productores de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) en el estado Aragua, Venezuela, se recolectaron 819 plantas con síntomas de infecciones virales, detectándose la presencia del virus *Southern bean mosaic virus* (SBMV) mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en ~30% de las muestras. El análisis

de la secuencia de la región 5' terminal de un aislamiento viral arrojó una similitud de 90-97% con otros aislamientos de SBMV depositados en GenBank. Este es el primer reporte sobre incidencia de SBMV en Venezuela y sobre la caracterización molecular parcial de un aislado de SBMV en el país.

INCIDENCE OF *Southern bean mosaic virus* (SBMV) ON COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) IN ARAGUA STATE, VENEZUELA, AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A VIRAL ISOLATE

Edgloris Marys, Thaly Fernández-Rodríguez and Alexander Mejías

SUMMARY

In surveys of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), 819 samples from plants showing virus-like symptoms were collected throughout the main growing fields in Aragua state, Venezuela. The samples were tested for *Southern bean mosaic virus* (SBMV) using indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). More than 30% of the tested plants were infected with

the virus. Sequence analyses targeting the 5'-terminal region of a virus isolate showed 90-97% similarity to corresponding sequences of other SBMV isolates deposited in the GenBank database. This is the first study on the incidence of SBMV in Venezuela and on the partial molecular characterization of a Venezuelan isolate of SBMV.

Introducción

El frijol o caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes en el mundo con cerca de 26×10⁶ha plantadas, particularmente en América Latina, su centro de origen (Makkouk *et al.*, 2003). En Venezuela, el cultivo de la caraota cubría unas 66300ha para el año 1990, con una producción anual estimada en 37200t. Según datos del último censo agrícola, la superficie total destinada a este rubro dismi-

nuyó en 10020ha para el año 2005, el cual constituye el registro más bajo en la producción (Anónimo, 2007). El origen del descenso no se ha determinado, pero podría atribuirse al efecto de enfermedades de origen viral. Estas causan severos daños a la producción de caraotas, razón por la cual se les ha prestado más atención a los virus que a otros potenciales patógenos. Existen aproximadamente 30 virus bien caracterizados que infectan el cultivo, pertenecientes a los grupos *Alfamovi-*

rus, *Bromovirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Begomovirus*, *Illarvirus*, *Luteovirus*, *Potyvirus*, *Sobemovirus*, *Tobamovirus*, *Necrovirus* y *Tospovirus* (Matthews, 1982; Hall, 1991; Makkouk *et al.*, 2003).

El *Southern bean mosaic virus* (SBMV) es un *Sobemovirus* que infecta una gran cantidad de leguminosas en Venezuela, y fue aislado de plantas de caraota en el año 1987 (Mora *et al.*, 1987). Es transmitido por los vectores *Ceratoma trifurcata* y *Epilachna varietis* de manera

semipersistente, y puede transmitirse también a través de semillas (Morales y Gámez, 1989). En el país, se ha determinado que el virus puede ocasionar pérdidas de hasta 50% en el cultivo, reduciendo la producción de semillas en un 70% (Mora, 1993).

Debido a la importancia económica que tiene el SBMV en el rendimiento y producción de caraotas, y a la relativamente escasa información sobre este virus en el país, este estudio se llevó a cabo con la finalidad de de-

PALABRAS CLAVE / Caraota / ELISA / Frijol / *Phaseolus vulgaris* / RT-PCR / Venezuela / Virus /

Recibido: 30/09/2011. Modificado: 11/09/2012. Aceptado: 13/09/2012.

Edgloris Marys. Ph.D. en Biología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Investigadora, IVIC, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Biotecnología y Viro-

logía Vegetal, Centro de Microbiología y Biología Celular, IVIC. Apartado Postal 20632, Caracas 1020-A, Venezuela. e-mail: emarys@ivic.gob.ve

Thaly Fernández-Rodríguez. M.Sc. en Biología, IVIC. Estudiante de Doctorado. AlPlanta-Institute for Plant Research, Alemania.

Alexander Mejías. Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela. Profesional Asociado a la Investigación, IVIC, Venezuela.

INCIDENCIA DO VÍRUS *Southern bean mosaic virus* (SBMV) EM FEIJÕES (*Phaseolus vulgaris* L.) NO ESTADO ARAGUA, VENEZUELA, E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DE UM ISOLAMENTO VIRAL

Edgloris Marys, Thaly Fernández-Rodríguez e Alexander Mejías

RESUMO

Durantes amostragens realizadas nos principais municípios produtores de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado Aragua, Venezuela, foram coletadas 819 plantas com sintomas de infecções virais, detectando-se a presença do vírus Southern bean mosaic virus (SBMV) mediante um ensaio imuno-enzimático (ELISA) em ~30% das amostras. A análise da sequência da

região 5' terminal de um isolamento viral mostrou uma semelhança de 90-97% com outros isolamentos de SBMV depositados em GenBank. Este é o primeiro relatório sobre incidência de SBMV na Venezuela e sobre a caracterização molecular parcial de um isolado de SBMV no país.

terminar la incidencia actual del virus en uno de los principales estados productores mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). No existen datos moleculares previos acerca de los aislamientos de SBMV en Venezuela, por lo que se describe la secuencia parcial del extremo 5' terminal de un aislamiento del virus mediante técnicas de biología molecular (RT-PCR). El conocimiento molecular del virus es de valiosa utilidad no sólo para la confirmación de la especie, sino para el establecimiento de métodos de diagnóstico rápidos y para la caracterización de aislamientos virales para futuros estudios de búsqueda de germoplasma resistente.

Materiales y Métodos

Los muestreos fueron llevados a cabo durante el 2009 en los principales municipios productores de caraota en el estado Aragua, Venezuela. (Figura 1, Tabla I). En total se tomaron 819 muestras de la hoja más joven de plantas que mostraban síntomas de enfermedades de origen viral tales como mosaico, deformación de la hoja, acortamiento intervenial, amarillamiento de las nervaduras, rugosidad y



Figura 1 Mapa de la región central del norte de Venezuela en la cual se muestran los municipios muestreados para la presencia de SBMV en el Edo. Aragua.

arrugamiento de las hojas. Las muestras fueron debida-

mente identificadas y colocadas en bolsas plásticas sobre

hielo, y transportadas al laboratorio de Biotecnología y Virología vegetal del Instituto Veneolano de Investigaciones Científicas.

Las muestras fueron analizadas mediante el ensayo de ELISA indirecta (Koenig, 1981), utilizando anticuerpos específicos contra SBMV (American Type Culture Collection, PVS 37). La absorbancia a 405nm se registró utilizando el lector de ELISA automático ELx800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EEUU). Las muestras con lecturas de absorbancia que ex-

cedían tres veces el valor de las muestras controles (extractos de plantas sanas), fueron consideradas positivas para la presencia de SBMV. Extractos de plantas enfermas fueron incluidos como controles positivos en la reacción. No se analizó la presencia de otros virus.

Debido a la ausencia de estudios moleculares previos del SBMV en Venezuela, se realizó un ensayo de transcripción reversa (RT) acoplada a la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) en un solo paso para amplificar parte del extremo 5' terminal de SBMV a partir de material vegetal de una planta que resultó positiva para el virus por ELISA. El

TABLA I
OCURRENCIA DE LA INFECCIÓN POR SBMV EN CARAOTAS EN DIFERENTES MUNICIPIOS DEL ESTADO ARAGUA

Municipios	Nº muestras (n)	SBMV ⁺	Infección (%)
Camatagua	81	32	39,5
Girardot	98	43	43,87
José Ángel Lamas	20	3	15
José Félix Ribas	80	25	31,25
José Rafael Revenga	52	11	21,15
Libertador	48	8	16,66
San Casimiro	77	33	42,85
San Sebastián	65	22	33,84
Santiago Mariño	102	48	47,05
Santos Michelena	44	19	43,18
Tovar	76	24	31,57
Urdaneta	20	3	15
Zamora	56	15	26,78

ARN total fue extraído de una muestra positiva para ELISA a partir de 0,1g de tejido, mediante el uso del estuche de extracción para ARN RNeasy Plant Mini Kit® (Quiagen, Hilder, Alemania), de acuerdo al manual de la casa comercial; resuspendiéndose posteriormente 20µl de agua ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando un estuche comercial que incluye las enzimas SuperScript® III One-Step RT-PCR System y Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), de acuerdo al protocolo de la casa comercial. Para la amplificación se utilizaron los cebadores diseñados para el segmento 5' terminal del genoma viral (Espinha *et al.*, 2004). Los productos amplificados fueron examinados mediante geles de agarosa 1%. Los amplicones fueron purificados utilizando el sistema Gel Extraction Kit (Qiagen), y se clonaron en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, EEUU) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Los plásmidos recombinantes se replicaron y purificaron utilizando el estuche Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Tres clones independientes fueron secuenciados por la empresa Macrogen, Korea, utilizando los cebadores M13. Los alineamientos múltiples de las secuencias fueron generadas mediante el programa CLUSTALW (Chen *et al.*, 2003).

Resultados

Incidencia relativa de SBMV en Aragua

Se determinó la presencia del virus SBMV en plantas de caraota colectadas en 2009 en estado Aragua, Venezuela, por el método de ELISA. La incidencia relativa del virus SBMV se muestra en la Tabla I. Los resultados muestran que el virus se distribuye en todas las municipios examinados, alcanzando un 31,3% de incidencia. Los municipios con altas tasas de infección fueron

```

001 CACAAAUAUAAGAAGGAAAGCUGGAUUUCCUACCUUUGUGUUUC
046 CAUUGUCGAAGCAUUGGUCAAAAGAUUACAAAUAUGAGCAUUUUUCU
091 GCAUGAGCUAUCGUUUCUAAACAGUUAGAGCAUUCGGCUUUUACCG
      M S Y R F L T V R A F G F T G
136 GUUUCUUAUUGCGACGCUACGCGCUUGCUAAGUGAGACAGAAAGUCA
      F H C D A T R L L S E T E V I
181 UAGACGUUCCAUCGUCCAUGACUUCGUUGGCGAAACCGAACUCA
      D V P S S I D F V G E T E L R
226 GACUUGAAACUGCUUGGCCCCAGUGUGAAGAGAAUUGUACACGA
      L E T A W P Q C E E N C Y T I
271 UUCUCCCUCGAUUCACGUUCAAGUUGAUUUCGAGUAUUACCCUG
      L P R F N V Q V D F E Y Y P V
316 UGCGUGUCGAGAUUGUGUGCCGGGUCUGCGCUACAUCUCCUAUCUG
      R V E I V C R V C A T S L S V
361 UUAUCUUCAGCAAGUGGAACUUCUACUGUAGUAGGAGAGGCCAUU
      I F S K W N F Y C S R R G H F
406 UUAUUCUGUAGAUCAAGACGGGGAUUCUGUUUAGGAUUGGAACGC
      I P V D Q N G D L F R I G T L
451 UCCGGGAGACGGGAGAGAAUACUUCUACUUCUGUGAUAAAUCUA
      R E T G E K Y F Y F C D K S I
496 UCUGCAGACAAUGUAUCAUCCAGGCCGUCACCAUCAUUCUGA
      C R Q C I I Q A A H H H S *
      M Y H P G R S P S F L

```

Figura 2 Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del extremo 5' terminal del virus SBMV-Ve. Los primeros 92 nucleótidos representan la región no codificante (UTR). El codón de iniciación (AUG) y terminación (UGA) están subrayados. El codón de iniciación del marco abierto de lectura 2 ORF2 (sobrepuesto en ORF1) está en negritas.

Girardot (43,87%), San Casimiro (42,85%), Santiago Mariño (47,05%) y Santos Michelena (43,18%); mientras que tasas de infección menores, fueron registradas en Urdaneta (15%), José Angel Lamas (15%) y Libertador (16,66%).

Caracterización molecular parcial de SBMV

Fragmentos de ADN de 539pb fueron amplificados a partir de la muestra vegetal positiva para el virus por ELISA. La secuencia nucleotídica obtenida se registró en Genbank con el N° GU903316.3. Al comparar dicha secuencia con las depositadas en el Genbank, se encontraron máximas identidades a nivel nucleotídico con los aislamientos SBMV-B (Bean strain, GenBank:

J02355.1), SBMV-S (Arkansas, EEUU, Genbank: AF055888.1) y SBMV-B (Arkansas, EEUU, Genbank: AF055887.1). Además, se encontraron identidades menores de la secuencia con los *Sobemovirus Sesbania mosaic virus* (SeMV, AY004291.2) y *Southern cowpea mosaic vi-*

rus SCPMV (M23021.1), con valores de 88 y 71% respectivamente.

El análisis de la secuencia mostró un extremo 5' terminal no codificante (UTR), en el cual se encontró un segmento parcialmente complementario al ARN ribosomal 18S, y a continuación una primera pauta abierta de lectura (ORF1) que se solapa en 33 nt con el extremo 5' de un segundo ORF (ORF2; Figura 2), tal como se había descrito previamente (Espinha *et al.*, 2004). La Tabla II muestra como la secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ORF1, presenta una identidad de 96,4 y 96,6% respectivamente, comparada con SBMV aislado de Arkansas (SBMV^{ARK}; Lee y Anderson, 1998). Igualmente, se encontró una alta homología con los aislados SBMV-B y SBMV-S. Los valores de identidad son algo menores al compararlos con el aislado de Brasil SBMV-SP (Sao Paulo) y mucho menores al compararlos con SeMV y SCPMV, otras especies del género *Sobemovirus*. La comparación con las secuencias del GenBank indica que el ORF1 de SBMV-Ve codificaría para una putativa proteína de movimiento que contiene 148 nucleótidos, con un aminoácido más que SBMV-SP y los mismos que SMBV-B y SBMV-ARK.

TABLA II
PORCENTAJE DE IDENTIDAD NUCLEOTÍDICA (nt)
Y AMINOACÍDICA (AA) DEL FRAGMENTO
DEL GENOMA SECUENCIADO DEL AISLADO
SBMV-VE CON VIRUS RELACIONADOS

Aislado	ORF1		
	5'-UTR	nt	aa
SMBV-B ^{ARK}	96,7	96,4	96,6
SBMV-B	96,7	97,1	96,6
SBMV-S	96,7	96,6	96,6
SBMV-SP	89,1	80,9	83,0
SeMV	87,6	52,1	34,5
SCPMV	70,7	43,0	20,3

Discusión

La ausencia de un programa eficiente de certificación de semillas de caraota libres de virus en Venezuela podría explicar la presencia del virus SBMV en casi todos los municipios del estado Aragua, uno de los mayores productores de caraota en el país.

Se requieren muestreos periódicos y continuos, con el fin de evaluar la dinámica de la incidencia de los virus que infectan el cultivo, y de determinar los factores epidemiológicos responsables de su disseminación. Los datos de este estudio determinan una alta incidencia de SBMV en el estado Aragua. El SBMV es altamente infectivo y se transmite muy eficientemente a través de semillas, contacto entre las plantas, insectos vectores y a través del suelo infectado (Hall, 1991), por lo que se debe considerar mecanismos de control para el virus, con la finalidad de evitar las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad.

Para la efectiva implementación de estrategias de manejo integrado y control del

SBMV en el país, es necesario caracterizar la composición genética de la población viral circulante, y contar con una herramienta de diagnóstico rápida y efectiva. En tal sentido, se ha establecido un método molecular (RT-PCR) en un solo paso que permite el análisis de un gran número de muestras. La identidad aminoacídica del aislamiento SBMV-Ve con SBMV-B ARK podría sugerir que el virus pudo ser introducido al país por la vía de semillas enfermas. Sin embargo, es necesario caracterizar el extremo 3' de los aislados de SBMV venezolanos para estudiar la diversidad genética del virus en el país y comparar su filogenia. Experimentos tendientes a amplificar el gen de la proteína de cápside (del extremo 3'terminal) de algunos de los aislamientos colectados en esta investigación, están siendo llevados a cabo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y al Fondo Nacional de Ciencia y Tec-

nología (FONACIT) (Proyecto BID-FONACIT N° 2004000368) y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC- Proyecto N° 428) por el financiamiento de este estudio.

REFERENCIAS

- Anónimo (2007) *Estudio Prospectivo para el Fortalecimiento del Sector Biotecnológico como Apoyo a la Seguridad Alimentaria del País*. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología. Caracas, Venezuela. 33 pp.
- Chenna R, Sugawara H, Koite T, López R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucl. Ac. Res* 31: 3497-3500.
- Espinha L, Gaspar J, Ward R, Ruller R, Carmargo L (2004) Caracterização da região 5'-terminal de um isolado brasileiro do *Southern bean mosaic virus*. *Fitopatol. Bras.* 29: 328-331.
- Hall R (1991) *Compendium of Bean Diseases*. American Phytopathological Society. St Paul, MN, EEUU. 102 pp.
- Koenig R (1981) Indirect ELISA methods from the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62

- Lee L, Anderson J (1998) Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of *Southern bean mosaic virus*. *Arch. Virol.* 143: 2189-2201.
- Makkouk K, Kumari S, Hughes J, Muniyappa V, Kulkarni N (2003) Other legumes. En Loebenstein G, Thottaphilly G (Eds.) *Virus and Virus-Like Diseases of Major Crops in Developing Countries*. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 447-476.
- Matthews R (1982) Classification and nomenclature of viruses. Forth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 17: 1-199.
- Mora O, Trujillo G, Borges O, Cuello R (1987). Mosaico sureño de la caraota (*Southern bean mosaic virus*) afectando *Phaseolus vulgaris* L. en Venezuela. En X Seminario Nacional de Fitopatología. Maracay, Venezuela. p. 29.
- Mora O (1993) Efecto del virus del mosaico sureño de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) en componentes del rendimiento de la variedad "UCV-Manuare". IV Reunión Nacional de Pesquisa de Feijão. Londrina-PR, Brasil. p. 113.
- Morales F, Gámez R (1989) Beetle-transmitted viruses. En Schwartz H, Pastor Corrales M (Eds.) *Bean Production Problems in the Tropics*. 2a ed. CIAT. Cali, Colombia. pp. 363-378.