

## Transmisión del Virus del Mosaico Suave del Ñame a *Dioscorea rotundata* (Dioscoreaceae) por *Oncometopia* sp. (Cicadellidae)

Transmission of Yam Mild Mosaic Virus to *Dioscorea rotundata* (Dioscoreaceae) by *Oncometopia* sp (Cicadellidae)

DEIVYS ÁLVAREZ G.<sup>1,6</sup>, ANTONIO PÉREZ H.<sup>2,6</sup>, JUAN DÍAZ S.<sup>3,6</sup>, MARIO MAESTRE H.<sup>4,6</sup> y JAVIER BELTRÁN H.<sup>5,6</sup>

**Resumen:** Se determinó la capacidad de transmisión del Virus del Mosaico Suave del Ñame (YMMV) por *Oncometopia* sp en *D. rotundata* cv. Botón. Para ello, se realizaron colectas de adultos de *Oncometopia* sp en un cultivo de *D. rotundata* ubicado en el municipio de Tolviejo departamento de Sucre, Colombia. Se realizaron bioensayos de transmisión en *D. rotundata* cv. Botón libres de YMMV, utilizando plantas infectadas naturalmente en campo como fuente de inóculo. Las plantas utilizadas en los bioensayos desarrollaron diferentes síntomas como mosaico, bandeado, corrugamiento y deformación foliar. La detección del virus en esas plantas así como en *Oncometopia* sp se realizó mediante la técnica de IC-RT-PCR. Este es el primer informe sobre la identificación de un cicadélido vector de virus en ñame.

**Palabras clave:** Vector. Potyvirus. YMMV. IC-RT-PCR.

**Abstract:** The transmission capacity of the Yam Mild Mosaic Virus (YMMV) by *Oncometopia* sp in *D. rotundata* cv. Botón was determined. This was done by collecting adult specimens of *Oncometopia* sp from *D. rotundata* crops located in the municipality of Tolviejo, department of Sucre, Colombia. Transmission bioassays were conducted on *D. rotundata* cv. Botón free of YMMV, using naturally infected field plants as a source of inoculum. The plants used in the bioassays developed different symptoms, such as mosaics, banding, wrinkling and foliar deformation. Detection of the virus in these plants as well as in *Oncometopia* sp was achieved by the IC-RT-PCR technique. This is the first report on the identification of a leafhopper as a yam virus vector.

**Key words:** Vector. Potyvirus. YMMV. IC-RT-PCR.

### Introducción

Los Cicadellidae, comúnmente llamados cicadélidos, saltahojas o chicharritas (Freytag y Sharkey 2002) son de gran importancia económica ya que son capaces de transportar y transmitir fitopatógenos; además, pueden causar daños directos en las plantas al alimentarse de la savia de las células y tejidos, lo cual resulta en un debilitamiento general (Nielson 1985). Estos insectos poseen piezas bucales picadoras-chupadoras las cuales utilizan para penetrar de manera delicada las células vegetales y succionar la savia. Entre los cicadélidos, algunas especies del género *Oncometopia* poseen gran interés al ser plagas en cultivos de cítricos pudiendo transmitir la bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987) agente causal de la clorosis variegada de los cítricos (Roberto *et al.* 1996).

El ñame pertenece a la familia Dioscoreaceae, género *Dioscorea* (Perea y Buitrago 2000). Es una planta de importancia económica en regiones pluviosas tropicales y subtropicales cuyos tubérculos son considerados como producto esencial para la alimentación de millones de personas en África, Asia y América latina (Perea 2000) y Alvarez (2000) considera que en Colombia el cultivo del ñame se encuentra restringido a la región Caribe, con Bolívar, Córdoba y Sucre como los departamentos de mayor producción.

Los cultivos de ñame pueden ser infectados por virus de los géneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Cucumovirus*, *Comovirus*, *Potexvirus* y *Carlavirus* (Asiedu *et al.* 2003; Kenyon *et al.* 2003). Entre los Potyvirus del ñame se encuentran el Virus del Mosaico del Ñame (YMV) (Thouvenel y Fauquet 1979) y el Virus del Mosaico Suave del Ñame (YMMV) (Munford

y Seal 1997) que ha sido reportado como Virus de Dioscorea Alata (DAV) (Odu *et al.* 1999), los cuales causan síntomas como mosaicos, moteados, bandeos, deformación foliar y atrofia. Además, existen otros virus que afectan la producción como el Virus Baciliforme de Dioscorea Alata (DaBV) del género *Badnavirus* (Phillips *et al.* 1999) y el Virus del Mosaico del Pepino (CMV) del género *Cucumovirus* (Thottappilly 1992).

En atención a esto, se propuso determinar la capacidad de transmisión del Virus del Mosaico Suave del Ñame (YMMV) por una entidad del género *Oncometopia* (Cicadellidae: Cicadellinae: Proconiini) en plantas de ñame espino cv. Botón (*Dioscorea rotundata* Poir.).

### Materiales y Métodos

Los muestreos de *Oncometopia* sp y de incidencia sintomática se realizaron en un cultivo de ñame espino cv. Botón, ubicado en el corregimiento de La Siria, en el municipio de Tolviejo, localizado en el departamento de Sucre, en el año 2007. Los bioensayos de transmisión se llevaron a cabo en el laboratorio de Entomología de la Universidad de Sucre. Las condiciones para los bioensayos fueron: temperatura máxima - mínima de 29,8°C y 26,4°C respectivamente y humedad relativa promedio de 74,2%.

Las plantas de ñame espino cv Botón para los bioensayos de transmisión, se obtuvieron a partir de microtubérculos, los cuales se sembraron en sustrato compuesto por suelo negroarena-estiércol bovino seco en proporciones 1:1:1, previamente desinfectado con formol al 2% durante 48 horas. Dos

<sup>1</sup> Biólogo, Correo electrónico: [deivysalvarez@gmail.com](mailto:deivysalvarez@gmail.com). Autor para correspondencia. <sup>2</sup> M.Sc. Entomología. <sup>3</sup> M.Sc. Recursos Fitogenéticos Neotropicales. <sup>4</sup> Estudiante de Maestría en Biotecnología. <sup>5</sup> Ph.D. Fitopatología. <sup>6</sup> Grupo de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre, Carrera 28 No 5-67, Sincelejo-Colombia.

meses después de la germinación, las plantas se evaluaron mediante IC-RT-PCR para detectar la presencia o no del Virus del Mosaico Suave del Ñame.

Adultos del cicadélido *Oncometopia* sp se coleccionaron sobre plantas de ñame espinoso cv. Botón con síntomas de Potyvirus, mediante captura manual y con aspirador bucal (Oliveira *et al.* 2001).

Plantas de ñame espinoso cv. Botón infectadas naturalmente, ubicadas en los cultivos donde se realizaron las capturas de los insectos, se eligieron como fuente de inóculo para los bioensayos con *Oncometopia* sp. Se tomaron muestras foliares y se trasladaron en bolsas autosellantes refrigeradas (Rodríguez *et al.* 2004), hasta el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre donde se analizaron mediante IC-RT-PCR para verificar la presencia del YMMV.

Se usó un período de adquisición viral (PAV) de ocho días, para ello los *Oncometopia* sp capturados se trasladaron a las plantas destinadas como fuente de inóculo en campo (Fig. 1A). Posteriormente, se transportaron hasta el laboratorio de Entomología de la Universidad de Sucre. El período de inoculación viral (PIV) fue de 11 días, utilizando plantas de ñame espinoso cv Botón libres de YMMV las cuales estuvieron aisladas en jaulas cilíndricas cubiertas con una caperuza de muselina (Fig. 1B) durante todo el ensayo. Se realizaron cinco bioensayos y cada uno consistió de una planta con un grupo de cinco individuos de *Oncometopia* sp como presión de inóculo. Finalizado el PIV, se realizó seguimiento durante 100 días para observar el desarrollo de síntomas acompañado del diagnóstico del YMMV mediante IC-RT-PCR en los insectos y las plantas. La incidencia de la enfermedad de la virosis del ñame se determinó por sintomatología visible (Sepúlveda *et al.* 2005) reportada para los *Potyvirus* en ñame. Se realizó un muestreo aleatorio en forma de zig-zag de 150 plantas en una hectárea, después de seis meses de siembra, contando cada planta muestreada y registrando el síntoma encontrado en el mismo cultivo donde se realizaron las colectas de *Oncometopia* sp.

Las pruebas de detección del YMMV mediante IC-RT-PCR se realizaron con los cebadores propuestos por Munford y Seal (1997): (CP2F: 5' GGC ACA CAT GCA AAT GAA AGC 3') y (UTR2R: 5' CAC CAG TAG AGT GAA CAT AG 3'). Los extractos se obtuvieron mediante maceración de las muestras sean tejido foliar o insectos en 10mL de tampón de

extracción general 1X (Agdia catálogo SRA 27200/0500) y clarificación por centrifugación a 8000rpm durante 5 min.

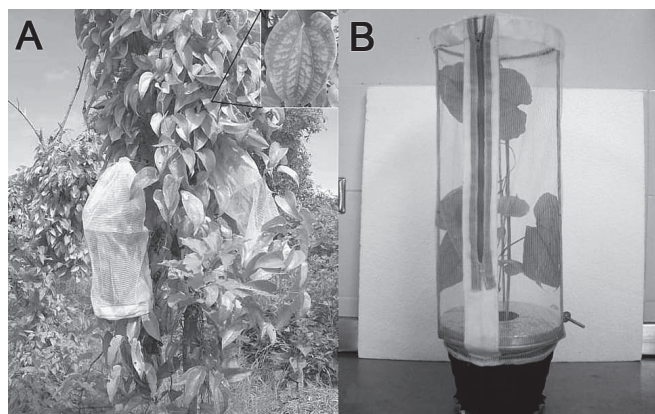
En las inmunocapturas (IC) se utilizaron anticuerpos para Potyvirus (Agdia catálogo SRA 27200/0500). El anticuerpo fue preparado en tampón de incubación (tampón ECI 1X) en una dilución de 1/200 y fijado en tubos de 0,2mL (40µl c/u) durante 12h a 4°C. Después, se realizaron tres lavados con PBS-T 1X y se adicionaron 40µl del extracto a cada tubo, se incubó 12h a 4°C y se lavó tres veces nuevamente con PBS-T 1X. La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó adicionando a cada tubo 1µl de Oligo (dT) (500µg/µl), 1µl dNTP Mix 10mM y 10µl de agua destilada y estéril. Se incubó a 94°C/1min y 75°C/8min. Luego se agregaron 4µl de tampón primera cadena 5X [Tris-HCl 250mM (pH 8,3), KCl 375mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM], 2µl de DTT 0,1M, 1µl RNasaOUT (40U/µl) y 1µl M-MLV RT (200U/µl) e incubó a 45°C/50min y 70°C/15min. Culminada la etapa RT se procedió con la PCR, para lo cual se adicionaron 5µl de tampón PCR 10X [Tris-HCl 200mM (pH 8,4), KCl 500mM], 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1µl dNTP Mix 10mM, 1µl de cada cebador (10µM), 0,4µl de *Taq* DNA polimerasa (5U/µl), 5µl de ADN<sub>c</sub> y 35,1µl de agua destilada, estéril, con el siguiente perfil de temperaturas por 35 ciclos: desnaturalización (95°C/4min); desnaturalización (95°C/30s); alineamiento (58,5°C/30s); elongación (72°C/30s) y elongación final (72°C/7min). El producto del PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% con SYBR safe y el peso de las bandas se determinó mediante el marcador molecular 100 bp DNA Ladder de Invitrogen®. Para las etapas RT-PCR se usó un termociclador My Cycler thermal cycler de BIO-RAD.

## Resultados y Discusión

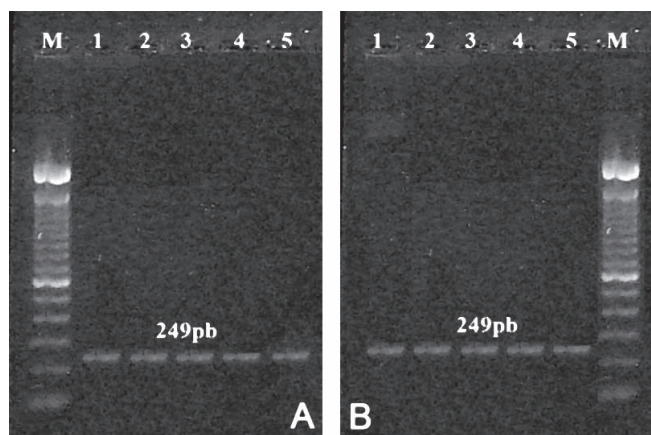
Las plantas de ñame espinoso cv. Botón fuentes de inóculo presentaron síntomas de infección por *Potyvirus* como el bandeo con un alto grado de severidad y los resultados del IC-RT-PCR indicaron que éstas se encontraban infectadas naturalmente con el YMMV.

De las plantas obtenidas a partir de los microtubérculos solo cinco de 28 resultaron negativas para YMMV luego de ser analizadas por IC-RT-PCR, por lo cual solo se pudo realizar igual número de bioensayos de transmisión. Todos los grupos de *Oncometopia* sp resultaron positivos para YMMV (Fig. 2A) luego de haber cumplido con el PAV y el PIV, lo anterior permitió demostrar la capacidad que tiene este cicadélido de adquirir dicho virus, al alimentarse en plantas de ñame espinoso cv. Botón infectadas naturalmente. Las plantas resultaron infectadas con el YMMV (Fig. 2B), 14 días después del PIV, desarrollando síntomas como el bandeo, limbo corrugado, mosaico y deformación foliar, reportados como la sintomatología típica producida por los *Potyvirus* en ñame (Thouvenel y Fauqueth 1979; Goudou-Urbino *et al.* 1996a; Munford y Seal 1997; Odu *et al.* 1999). Estos resultados demuestran que *Oncometopia* sp puede transmitir el Virus del Mosaico Suave del Ñame en *D. rotundata* cv. Botón, indicando así un nuevo vector de virus en esta especie y el primer informe sobre un cicadélido transmisor de virus en ñame.

Investigaciones realizadas en África, sobre virosis en ñame, demuestran que los áfidos componen el mayor número de insectos vectores, es así como *Aphis gossypii* (Glover, 1877), *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907), *Aphis craccivora* (Koch, 1854) y *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) son capaces de transmitir el YMV en *Dioscorea cayenensis* Lam



**Figura 1.** A. Montaje de sacos de muselina con *Oncometopia* sp para facilitar la adquisición viral, recuadro muestra hoja de Ñame con síntomas de YMMV. B. Montaje de plantas de Ñame libres de YMMV en jaula para el Periodo de Infección Viral.



**Figura 2.** Cromatografías de diagnóstico mediante IC-RT-PCR de la presencia del YMMV en **A.** los cinco grupos de *Oncometopia* sp **B.** plantas de *Dioscorea rotundata*. M= marcador de peso molecular.

(Thouvenel y Fauquet 1979); *A. craccivora* y *R. maidis* son vectores del YMMV en *Dioscorea alata* L. (Odu *et al.* 1999); *A. craccivora* y *R. maidis* que transmiten el CMV en *D. alata* y *D. rotundata* (Thottappilly 1992; Odu *et al.* 2004). Además, el DaBV es transmitido por la cochinilla *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Phillips *et al.* 1999; Odu *et al.* 2004). Sin embargo, hasta la fecha, en Colombia no se conocen informes de colonias de dichos insectos en este cultivo, mientras que si se encuentran abundantes cicadélidos, entre ellos *Oncometopia* sp, asociados al agro-ecosistema ñame, lo cual permite advertir el papel que estos últimos pueden tener en la epidemiología de las virosis del ñame en la región Caribe colombiana.

La incidencia sintomática, en el cultivo de ñame espino cv. Botón ubicado en La Siria, fue del 95,4% y los síntomas encontrados coincidieron con los reportados para los Potyvirus del ñame (Thouvenel y Fauquet 1979; Thottappilly 1992; Goudou-Urbino *et al.* 1996a, 1996b). Dentro de las sintomatologías encontradas, el bandeo fue frecuente con un 83,6%, aunque también se observó mosaico, clorosis y moteado con una frecuencia de 4,5%, 4,5% y 2,7% respectivamente. Investigaciones anteriores, como la realizada por Dallot *et al.* (2001) y Guzmán *et al.* (2001), sugieren una alta incidencia de *Potyvirus* en los cultivos de ñame en la región Caribe de Colombia, reportando síntomas como moteados y mosaicos; así como también la infección de estos con el YMMV. Se ha demostrado que los *Potyvirus* del ñame pueden ser transmitidos mediante tubérculos infectados utilizados como material de siembra (Thouvenel y Fauquet 1979; Goudou-Urbino *et al.* 1996b; Guzmán *et al.* 2001; Odu *et al.* 2004), esta situación sumada a la presencia de insectos vectores sería la causa de la alta incidencia de virosis encontrada en los cultivos de ñame en el departamento de Sucre.

### Literatura citada

ÁLVAREZ, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. p. 33-39. En: GUZMÁN, M. y BUITRAGO, G. (eds). Ñame: producción de semilla por biotecnología. Unibiblos. Bogotá. Colombia. 112 p.

ASIEDU, R.; MIGNOUNA, H.; ODU, B.; HUGHES, J. 2003. Yam breeding. p. 466-475. In: Plant virology in sub-Saharan Africa. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan. Nigeria. 583 p.

DALLOT, S.; BOUSALEM, M.; GUZMAN, M. 2001. Occurrence of potyviruses on yam (*Dioscorea spp*) in Colombia and first molecular characterization of *Yam mild mosaic virus*. Plant Disease 85 (7): 803.

FREYTAG, F.; SHARKEY, M. 2002. A preliminary list of the leafhoppers (Homoptera) of Colombia. Biota Colombiana 3(2): 235-283.

GOUDOU - URBINO, C.; GIVORD, L.; QUIOT, J.; BOEGLIN, M.; KONATE, G.; DUBERN, J. 1996a. Differentiation of yam virus isolates using symptomatology, western blot assay, and monoclonal antibodies. Journal of Phytopathology 144: 235-240.

GOUDOU - URBINO, C.; KONATE, G.; QUIOT, J.; DUBERN, J. 1996b. Aetiology and ecology of a yam mosaic disease in Burkina Faso. Tropical Science 36: 34-40.

GUZMÁN, M.; BERMUDEZ, Y.; CASTRO, C. 2001. Identificación del *Virus del mosaico suave del ñame* (YMMV) en muestras colombianas de *Dioscorea alata* caracterización biológica, serológica y molecular. Revista Colombiana de Biotecnología 3(1): 72-79.

KENYON, L.; SHOYINKA, S.; HUGHES, J.; ODU, B. 2003. An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in sub-Saharan Africa. p. 432-439. In: Plant virology in sub-Saharan Africa. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan. Nigeria. 583 p.

MUNFORD, R.; SEAL, S. 1997. Rapid single tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. Journal of Virological Methods 69: 73-79.

NIELSON, M. 1985. Leafhopper systematic. p. 11-39. In: NAULT, L.; RODRIGUEZ, J. (eds). The Leafhoppers and planthoppers. John Wiley & Sons. New York. 500 p.

ODU, B.; HUGHES, J.; ASIEDU, R.; NQ, N.; SHOYINKA, S.; OLADIRAN, O. 2004. Responses of white yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars to inoculation with three viruses. Plant Pathology 53: 141-147.

ODU, B.; HUGHES, J.; SHOYINKA, S.; DONGO, L. 1999. Isolation, characterization and identification of Potyvirus from *Dioscorea alata* L. (water yam) in Nigeria. Annals of Applied Biology 134: 65-71.

OLIVEIRA, C.; MOLINA, R.; ALBRES, R.; LOPES, J. 2001. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulos maidis* (Hemiptera). Fitopatologia Brasileira 27(1): 91-95.

PEREA, M. 2000. Utilización de los sistemas in vitro para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea spp*) libres de patógenos. p. 41-53. En: GUZMÁN, M.; BUITRAGO, G. Ñame: producción de semilla por biotecnología. Unibiblos. Bogotá. Colombia. 112 p.

PEREA, M.; BUITRAGO, G. 2000. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. p. 17-32. En: GUZMÁN, M.; BUITRAGO, G. Ñame: producción de semilla por biotecnología. Unibiblos. Bogotá. 112 p.

PHILLIPS, S.; BRIDDON, R.; BRUNT, A.; HULL, R. 1999. The partial characterization of a Badnavirus infecting the greater asiatic or water yam (*Dioscorea alata*). Journal of Phytopathology 147: 265-269.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.; MIRANDA, V.; CARLOS, E. 1996. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. Fitopatologia Brasileira 21: 517-518.

RODRIGUEZ, Y.; RANGEL, E.; CENTENO, F.; MENDOZA, O.; PARRA, A. 2004. Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del Estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. Revista de la Facultad de Agronomía. (Venezuela) 21(2): 105-115.

SEPULVEDA, P.; LARRAÍN, P.; QUIROZ, C.; REBUFEL, P.; GRANÑA, F. 2005. Identificación e incidencia de virus en pimiento en la zona centro norte de Chile y su asociación con vectores. Agricultura Técnica. (Chile) 65(3): 235-245.

THOTTAPPILLY, G. 1992. Plant virus diseases of importance to african agriculture. Journal of Phytopathology 134: 265-288.

THOUVENEL, J.; FAUQUET, C. 1979. *Yam mosaic Potyvirus* infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory coast. Annals of Applied Biology 93: 279-283.