

## BioVeg 2009 11-16 Mayo 2009

### Metodologías para la detección de especies de *Banana streak virus* en plátanos y bananos en Cuba

Elisa Javer<sup>1</sup>, Isabelle Acina- Mambolé<sup>2</sup>, Caridad Font<sup>1</sup>, María Reyes<sup>3</sup>, Neyda Arencibia<sup>1</sup>, Acela Fonseca<sup>3</sup>, Idilio Quiala<sup>1</sup>, Gloria González<sup>1</sup>, Pedro Luis Ramos<sup>4</sup>, Ana Lidia Echemendía, Pierre-Yves Teycheney<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Calle 110 # 514 entre 5ta B y 5ta F, Municipio Playa, CP11600, Ciudad de la Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement, UPR75, Station de Neufchateau, Sainte-Marie, 97130 Capesterre Belle-Eau, Guadeloupe

<sup>3</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Cuba

<sup>4</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31 e/ 158 y 190, Playa, P.O. Box 6162, Habana 10600, Cuba

[ejaver@inisav.cu](mailto:ejaver@inisav.cu)

### Resumen

Los plátanos y bananos constituyen fuentes primordiales de alimentos para millones de personas en todo el mundo y en Cuba las áreas destinadas a estos cultivos ocupan una superficie de alrededor de 101 000 ha, constituyendo, los de mayor volumen de propagación a través del cultivo *in vitro*. La mayoría de las plantaciones están conformadas por híbridos interespecíficos, que con frecuencia aparecen infectados por *Banana streak virus* (BSV). Considerando la necesidad del control de la calidad durante los procesos de multiplicación y certificación de vitroplantas, el objetivo de nuestro trabajo consistió en determinar las especies de BSV que están presentes en Cuba mediante metodologías que permitirán el uso de donantes sanos destinados a la micropropagación del cultivo en todo el país. Para ello, se realizaron colectas de muestras sintomáticas o carentes de síntomas de BSV, de variedades pertenecientes a los grupos genómicos AAB, ABB, AAAB, AABB y AAA; en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Villa Clara, Cienfuegos, Ciego de Ávila, Granma y Santiago de Cuba. La prevalencia de BSV en las diferentes variedades, se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa con inmunocaptura y combinación de iniciadores (Multiplex IC-PCR). La utilización de cebadores específicos en la reacción de PCR, permitió la detección de secuencias episomales de las cuatro especies más importantes de BSV (Goldfinger (BSGFV), Imové (BsImV), Mysore (BSMysV) y Obino l'Ewaï (BSOLV). La especie BSGFV resultó ser la más frecuente y apareció provocando infecciones episomales simples o mixtas con BSOLV y BSImV. Mediante la implementación de estos métodos se logrará el uso de donantes libres de BSV en el sistema nacional de obtención de vitroplantas.

**Palabras claves:** *Banana streak virus*, cultivo *in vitro*, Multiplex IC-PCR.

### Abstract

Banana and plantains are staple food for millions people worldwide and in Cuba around 101 000Ha are planted with these crops, a significant proportion of which have been obtained by micropropagation procedures. The majority of Cuban plantations are based on interspecific hybrids that often infects with *Banana streak virus* (BSV). Considering the need of accurate certification procedures during *in vitro* culture propagation, the objective of our present work was to determine the BSV species causing infection in Cuba through the use of methodologies that will allow the use BSV free source materials for banana micropropagation in the country. To this purpose surveys were made in Pinar del Río, La Habana, Villa Clara, Cienfuegos, Ciego de Ávila, Granma and Santiago de Cuba

and samples were randomly collected from plants showing BSV symptoms or asymptomatic and belonging to AAB, ABB, AAAB, AABB or AAA genotypes. The prevalence of different BSV species was determined by Multiplex-IC-PCR. The use of specie-specific primers allowed the detection of episomal sequences from the main BSV species BSV (*Goldfinger* (BSGFV), *Imové* (BSImV), *Mysore* (BSMysV) and *Obino l'Ewai* (BSOLV). BSGFV was the prevalent specie and appeared causing either single infection or mix infections with BSOLV and BSImV. Through the application of this method of detection it will be possible the use of BSV free sources in the national system of plant production.

**Keywords:** *Banana streak virus*, *in vitro* culture, Multiplex IC-PCR.

## **Materiales y métodos**

### *Colecta de muestras*

Las muestras de hojas con síntomas de BSV o asintomáticas, de variedades con genoma AAA, AAB, ABB, AAB, ABB se colectaron en diferentes áreas productoras de las provincias de Pinar del Río, La Habana, Villa Clara, Cienfuegos, Ciego de Ávila, Granma y Santiago de Cuba.

### *Multiplex IC-PCR*

La inmunocaptura se desarrolló utilizando un antisuero policlonal de conejo (gentil donación del Dr B. Lockhart), capaz de detectar especies diferentes de BSV (Ndowora, 1998; Ndowora y Lockhart, 2000). Placas de PCR estériles, de 96 pocillos (Starlab, Paris, Francia), se recubrieron durante toda la noche a 4°C con 25µl de IgG purificada a partir de este antisuero, a una concentración de 2µg/ml en tampón carbonato-hidrogenocarbonato de sodio (Carbonato de sodio, 15mM, Bicarbonato de sodio, 34mM), pH 9,6. Las placas se lavaron tres veces con 100µl de tampón PBS-T (NaCl, 136mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4mM, KCl, 2.6mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8mM, Tween-20, 0.05%) pH 7.4. Los extractos foliares se prepararon macerando 0,5 g de hojas en 5ml de tampón de extracción (Polyvinylpyrrolidona-40, 2%, Sulfito de sodio, 0.2% y Albúmina bovina, 0.2%, preparados en PBS-T, con la ayuda de un macerador eléctrico y bolsas de plástico (Biorad Phytodiagnosics, Marnes-la-Coquette, France). A continuación se adicionaron 25 µl de los extractos, en las placas de PCR previamente recubiertas con el antisuero y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas para luego efectuar tres lavados con 100 µl de PBS-T y uno con 100 µl de agua desionizada estéril. La reacción de Multiplex IC-PCR se realizó directamente en las placas según Le Provost et al., 2006, utilizando los pares de cebadores específicos para detectar las especies *Goldfinger* (BSGFV), *Imové* (BSImV), *Mysore* (BSMysV) y *Obino l'Ewai* (BSOLV), Tabla 1 y el par de cebadores AGMI 025/AGMI 026 que detectan microsatélites en el genoma de *Musa* spp (Lagoda et al., 1998). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl conteniendo Tris-HCl 20mM pH 8.4, KCl, 50mM, dNTP, 100mM, MgCl<sub>2</sub>, 1.5mM, 10 pmol de cada cebador y una unidad de Taq polimerasa (Eurogentech, Seraing, Belgium). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 94 °C por 5min, 35 ciclos de ciclos de (94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72°C por 1 min) seguido de un paso final de elongación de la cadena de 5 min a 72 °C. Diez microlitos del producto de PCR fueron analizados en electroforesis en gel de agarosa al 1 % en 0,5 X TBE y visualizados por tinción con bromuro de etidio y transiluminación ultravioleta.

### *Clonaje de productos de PCR, secuenciación y análisis de secuencias amplificadas*

Los fragmentos amplificados se clonaron en vectores pGEMT easy-vector (Promega) y los productos de ligazón se transformaron en *E. coli* usando procedimientos estándar. Las secuencias se analizaron a través del BLAST y se publicaron en GENBANK.

## Resultados y Discusión

Se colectó un total de 1343 muestras de hojas con síntomas, y asintomáticas en diferentes provincias del país, tabla 2, Figura 1; las que fueron analizadas a través de Multiplex IC-PCR con cebadores específicos que hibridan con el dominio Transcriptasa inversa (RT) / RNAasa H del marco de lectura 3 (ORF3) (Le Provost *et al.*, 2006). Las cuatro especies de BSV más importantes se detectaron en el 31,8 % de las muestras, Tabla 3. La especie más ampliamente distribuida es BSGFV con un 16.4% de incidencia.

Se identificaron también variedades con infecciones mixtas con las especies BSGFV y BSI<sub>m</sub>V en el híbrido FHIA 25 en las provincias de Pinar del Río, y La Habana así como de las especies BSGFV y BSOLV en muestras FHIA 21 de las provincias La Habana, Pinar del Río, Granma y Cienfuegos.

A pesar de que en Cuba, inicialmente se había informado la presencia de síntomas de infección por BSV (Jones y Lockhart, 1993), las especies del virus no habían sido nunca identificadas en el país. Existen otros reportes sobre observación de partículas baciliformes, a través de microscopía electrónica de inmunoabsorción en el híbrido FHIA 21 (Font *et al.*, 1998), las cuales se consideraron una infección por este virus, sin embargo el inmunosuero que se utilizó en aquella ocasión no era específico de BSV (Javer *et al.*, 2009).

Para confirmar la identidad de las especies de BSV, se realizó una selección de los productos de amplificación, para su clonaje y secuenciación. Los análisis a través de BLAST mostraron que las secuencias (número de acceso en GenBank: FJ527423-527434), comparten un % de identidad del 96-100% con las secuencias reportadas en Genbank. Tabla 4.

Este trabajo constituye la primera identificación y confirmación de las especies de BSV presentes en Cuba (Javer *et al.*, 2009). Esta enfermedad se distribuye en todas las regiones donde se cultivan plátanos y bananos del mundo y representa actualmente el principal obstáculo en el movimiento de germoplasma de *Musa* spp y el mejoramiento genético; debido a que las diferentes especies del virus son transmitidas horizontalmente por pseudocóccidos, aunque existen importantes evidencias de que muchas de ellas también son transmitidas por activación de secuencias endógenas de BSV (EPRVs) presentes en el genoma *M. balbisiana* de los híbridos interespecíficos de plátano y banano (Gayral *et al.*, 2008). Por tanto, la única estrategia eficiente para frenar la dispersión de la enfermedad, se logra estableciendo un estricto control sobre los materiales que se propagan por cultivo *in vitro* y sobre el movimiento de germoplasma. Se necesitan poner a punto técnicas de diagnóstico que detecten de forma específica y sensible la forma episomal del virus. En este caso se recurrió a una metodología de Multiplex IC-PCR descrita por Le provost *et al.*, 2006 y adaptada a nuestras condiciones. En esta metodología se adicionan en una misma reacción de PCR, cebadores específicos para detectar BSV y los cebadores STMI, estos últimos para la detección de posibles contaminaciones con el ADN total del huésped durante la inmunocaptura. Es una metodología con alta procesatividad que permite analizar al mismo tiempo 96 muestras diferentes. Si bien en este caso se utilizó para detectar especies de BSV individuales, según Le Provost *et al.*, 2006, resulta técnicamente posible la detección simultánea de diferentes especies de BSV en infecciones mixtas, si se adicionan varios pares de cebadores específicos junto a los cebadores STMI, en una misma reacción, como se realiza para la detección simultánea de otros virus que infectan plátanos y bananos (Sharman *et al.*, 2000).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que se cuenta con métodos sensibles y específicos para la detección de BSV en plátanos y bananos que pueden aplicarse en los sistemas nacionales de producción de vitroplantas.

## Referencias

Font C., Curbelo I, Fernández J., Váldez S., Pereira D., 1998. Detección de partículas baciliformes en híbridos de plátano (*Musa spp.*) FHIA-21 en Cuba. *Fitosanidad* 2, 3-5.

Gayral P., Noa-Carrazana J-C., Lescot M., Lheureux F., Lockhart BEL., Matsumoto T., Piffanelli P., Iskra-Caruana M-L., 2008. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. *J. Virol* 82, 6697-6710.

Javer E., Acina-Mambole I., Font C., Quiala I., González G., Echemendía A.-L., Teycheney P.-Y., 2009. First report of *Banana streak virus* species Goldfinger, Imové, Mysore and Obino l'Ewaï in *Musa spp* in Cuba. *Plant Pathology* (En prensa).

Jones DR., Lockhart BEL., 1993. Banana streak disease. In: *Musa Diseases*, Fact Sheet N° 1. Montpellier, France: INIBAP.

Lagoda, P.J.L., Noyer, J.-L., Dambier, D., Baurens, F.-C., Grapin, A., Lanaud, C., 1998. Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in *Musaceae*. *Mol. Ecol.* 7, 657–666.

Le Provost G., Iskra-Caruana ML., Acina I., Teycheney, PY., 2006. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. *Journal of Virological Methods*. 137, 7-13.

Ndowora, T.C., 1998. Development of an enzyme immunoassay to detect serologically diverse isolates of *Banana streak virus* and characterisation of viral sequences integrated into the *Musa* genome. Ph.D. Thesis. University of Minnesota, 90 pp.

Ndowora, T., Lockhart, B.E.L., 2000. Development of a serological assay detecting serologically diverse *Banana streak virus* isolates. In: Craenen, K., Ortiz, R., Karamura, E.B., Vuylsteke, D. (Eds.), *Proceedings of the First International Conference on Banana and Plantain for Africa*. Acta Horticult. 540, 377–388.

Sharman, M., Thomas, J.E., Dietzgen, R.G., 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. *J. Virol. Methods* 89, 75–88.

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en M-IC-PCR

Secuencia blanco	Cebador	Secuencia (5' -3' )	Tamaño del producto de PCR pb
BSOLV	RD-F1 RD-R1	ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC GCTCACTCCGCATCTTATCAGTC	522
BSGFV	GF-F1 GF-R1	ACGAACTATCACGACTTGTTC AAGC TCGGTGGAATAGTCCTGAGTCTTC	476
BSMysV	Mys-F1 Mys-R1	TAAAAGCACAGCTCAGAACAAACC CTCCGTGATTTCTTCGTGGTC	589
BSImV	IM- F1 IM- R1	CACCCAGACTTTTCTTTCTAG C TGCCAACGAATACTACATCAAC	384
STMS	AGMI 025 AGMI 026	TTAAAGGTGGGTTAGCATTAGG TTTGATGTCACAATGGTGTTC	248

Tabla 2 Total de muestras colectadas por genotipo.

<b>Variedad</b>	<b>Total de muestras colectadas (%)</b>
<u>AAB</u> CEMSA ¾, Enano Guantanamero, Macho 1732, Macho 1736	152 (11,3%)
<u>AAAB</u> FHIA 21, FHIA 18, FHIA 23, FHIA 20	774 (57,6%)
<u>AABB</u> FHIA 03	57 (4,2%)
<u>ABB</u> Burro CEMSA, Burro Criollo, Pelipita, Saba	63 (4,7%)
<u>AAA</u> Gran enano, Yangambi Km 5, Bungulán, Americani	297 (22,1%)
<b>Total</b>	<b>1343</b>



Yangambi km5, Villa Clara    FHIA 21, Ciego de Ávila    FHIA 21, Pinar del Río

Figura 1. Síntomas típicos de BSV observados en Cuba: (A) Rallado clorótico intermitente en las hojas (B) Rajadura en el pseudotallo, (C) Emergencia anormal de la inflorescencia a mitaddel pseudotallo

Tabla 3 Porcentaje de muestras positivas a través de Multiplex IC-PCR 1 con cebadores específicos.

Genotipos	Total de plantas indexadas	Infecciones simples					Infecciones mixtas			
		BSOLV	BSGFV	BSMysV	BSImV	Total	BSGFV+BSOLV	BSGFV+BSImV	BSOLV+BSImV	BSOLV+BSGFV+BSImV
AAA	297	0	0	54	1	55 (18.5%)*	0	0	0	0
AAB	152	9	39	0	5	53 (34.9%)*	1	7	0	0
AAAB	774	109	136	1	2	248 (32%)*	65	2	2	1
AABB	57	1	34	0	0	35 (61%)*	0	0	0	0
ABB	63	1	11	0	24	36 (57%)*	0	4	0	0
Total	1343	120 (8.9%)**	220 (16.4%)**	55 (4.1%)**	32 (31.8%)**	427 (31.8%)**	66	13	2	1



Tabla 4. Porcentaje de identidad de secuencia de ADN de clones BSV.

Clon	Variedad	% identidad a través de BLAST
M790.61	Yangambi AAA	97% con BSMysV <a href="#">AY805074.1</a>
GF33.21	FHIA 25 AAA	98% con BSGFV <a href="#">AY493509.1</a>
IM40.01	FHIA 25 AAA	97% con BSIMV <a href="#">AJ968445</a>
OL 52.2	FHIA 21 AAAB	100% con BSOLV <a href="#">AJ002234.1</a>