

Diagnóstico molecular de geminivirus transmitidos por la mosca blanca en cultivos de tomate en Ciudad Darío y Tomatoya, Nicaragua.

Iván Marín Argüello*, Luis Williams*, David Moraga** y Jorge Huete Pérez *

Resumen.- El primer reporte conocido sobre la presencia de geminivirus en tomates en la región centroamericana ocurrió en el Valle de Sébaco, Nicaragua, en 1983. La afectación por geminivirus ha alcanzado grados alarmantes en la última década. Esto ha incrementado la necesidad de métodos rápidos y sensibles para su detección y subsecuente identificación. El presente estudio se realizó para establecer la técnica de la PCR en la detección de geminivirus en tomate. Se utilizó la PCR combinada con RFLP y las enzimas de restricción *Bgl* II y *Hinc* II. Se encontró que el patógeno detectado en las muestras evaluadas podría representar una nueva forma de geminivirus del tomate. Este es el primer trabajo de este tipo en Nicaragua como parte del esfuerzo del Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana, por aplicar métodos de biotecnología en el sector agrícola.

Durante décadas se ha considerado la región centroamericana como una zona apropiada para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*), debido a la excelente condición climática que presenta la región. Incluso, esta zona podría ser el centro de origen de dicho cultivo.

Impacto económico, distribución y diagnóstico

La actividad económica que se desprende del cultivo del tomate tiene un fuerte impacto en dicha región, por la posterior elaboración de productos procesados los cuales son comercializados dentro y fuera de Centroamérica. Es por ello que en las últimas décadas se ha observado un incremento en las zonas dedicadas a dicho cultivo, lo cual impacta directamente en la actividad económica de los diferentes países que conforman la región.

Fue hasta mediados de la década de los 80 cuando se observó un incremento de plantaciones infectadas por geminivirus, transmitido a su vez por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Esto trajo como consecuencia un impacto devastador en la industria del tomate, dado el bajo rendimiento y calidad del fruto (Polston y Anderson, 1997).

Por otro lado, la sobre población humana en el planeta y la acción de esto sobre el balance ecológico es probable que rompieran con el frágil equilibrio entre el agente patógeno y el hospedero, auspiciando el surgimiento de nuevas enfermedades infecciosas en plantas. Esta puede ser la causa que explique el resurgimiento de los geminivirus en los últimos años, convirtiendo a los geminivirus transmitidos por la mosca blanca, en uno de los mayores patógenos que afecta los vegetales causando severas pérdidas en las cosechas no sólo de

* Investigador del Centro de Biología Molecular-UCA.

** Universidad de Florida.

tomate sino también de otros cultivos como el frijol, papa, tabaco, berenjena, melón, sandía y otros, los cuales son típicos de las regiones tropicales y subtropicales (Brow, 1991 y 1992).

El primer reporte que se tiene sobre la presencia de geminivirus en tomates en la región centroamericana fue en el Valle de Sébaco, Nicaragua, en 1983 (Rosset, 1986). En esta misma zona en 1986 se reportó una incidencia de geminivirus del 100% en las plantaciones de tomate. Estudios posteriores revelaron la presencia de geminivirus en Guatemala (1987) (Dardon, 1993), El Salvador (1988) (Serrano *et al*, 1993), Costa Rica (1988) (Hijle, 1993) y Honduras (1989) (Caballero y Rueda, 1993).

La afectación por geminivirus transmitidos por la mosca blanca ha alcanzado grados alarmantes en la última década (Polston y Anderson, 1997). Esto ha incrementado la necesidad de métodos rápidos y sensibles para su detección y subsecuente identificación (Rojas *et al*, 1993). El diagnóstico de la infección por geminivirus por medio de la inspección visual no es siempre fácil, porque muchos de los síntomas expresados se asemejan a los síntomas causados por factores abióticos (estrés) o bióticos (bacterias, hongos, etc.). Los síntomas causados por la infección de geminivirus varían dependiendo de la cepa del virus, el cultivo, la edad de la planta y tiempo de infección, condiciones ambientales entre otros. Todo esto dificulta el diagnóstico por simple inspección visual (Polston y Anderson, 1997).

Aproximadamente, después de 21 días que la planta fue infectada aparecen los

primeros síntomas: mosaico amarillo, moteo clorótico, margen foliar clorótico, plegamiento foliar y encrespamiento en las hojas, achaparramiento de la planta, floración temprana, abscisión floral y tardía maduración del fruto. Estos síntomas, sin embargo, también pueden presentarse por deficiencia de algún nutriente o pueden ser inducidos por otros virus (*Potyviridae* y *Tobamoviridae*).

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular, extremadamente sensible y específica, que puede aplicarse para la detección e identificación de fitopatógenos, y que, al amplificar ácidos nucleicos, supera muchas de las dificultades asociadas con los métodos serológicos convencionales. La forma replicativa de los geminivirus es ADN circular de cadena doble, el cual sirve como molde para la amplificación parcial o completa de las hebras nucleótidas, lo que hace que estos patógenos puedan ser diagnosticados por PCR (Rojas *et al*, 1993).

Actualmente, la mayoría de los estudios epidemiológicos en plantas se realizan en el ámbito molecular, y todos ellos involucran de una u otra manera la detección del fitopatógeno por PCR. Por ello el presente estudio surge con el propósito de ensayar, en un cultivo de importancia económica como es el del tomate, un protocolo de PCR para la detección de geminivirus transmitidos por la mosca blanca; para luego, una vez establecida esta técnica en nuestras condiciones, ésta sea implementada en el diagnóstico molecular y aplicada a otros cultivos en estudios posteriores.

Organización del genoma y funciones de los genes virales

Los geminivirus representan un excelente modelo de estudio para el entendimiento del mecanismo de replicación de los virus en las células vegetales, debido a su pequeño genoma y al abundante número de copias de las partículas virales en el núcleo de las células infestadas (ilustración 1).

La familia de los geminivirus (*Geminiviridae*) pertenece al grupo de virus que presenta el más alto índice de crecimiento de nuevos virus que infectan a las plantas. Tomando como criterio el tipo de vector y el hospedero, esta familia se agrupa en tres géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus* y *Begomovirus*, cuyos genomas presentan diferentes tipos de organización (Polston y Anderson, 1997).

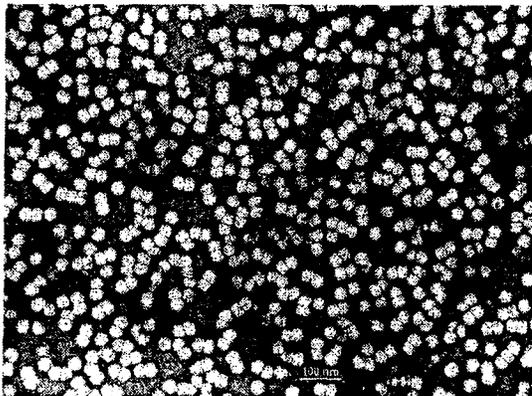


Ilustración 1. Fotografía electrónica de los geminivirus, donde se puede observar su agrupación en dos subunidades aparentemente idénticas.

El género de los begomovirus es transmitido por la mosca blanca y afecta principalmente los cultivos dicotiledóneos. En este subgrupo, el genoma global está distribuido en dos cuasi-

isométricas partículas víricas DNA-A (2.65 Kb) y DNA-B (2.5 Kb). Cada partícula es una hebra sencilla circular (ssDNA) encapsulada en múltiples subunidades (aproximadamente 110) de una proteína capsídica sencilla que tiene un peso molecular de 29-30KD (ilustración 2).

En la partícula DNA-A se encuentra la secuencia de nucleótidos (AR1) que codifica para la proteína capsídica y cuatro genes designados AL1 (40KD), AL2 (15-20 KD), AL3 (14-16 KD) y AL4 (15 KD). Siendo éstos muy pocos caracterizados en cuanto a su funcionalidad, pero muy relacionados al proceso de replicación del virus (Xie *et al*, 1995).

La partícula DNA-B codifica para los genes relacionados con el movimiento del virus de célula en célula. En el caso de los geminivirus que presentan agrupado su genoma en una sola unidad vírica ésta codifica para los genes relacionados con la replicación y el movimiento del virus.

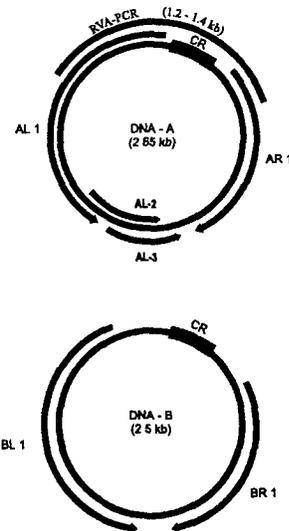


Ilustración 2. Genoma bipartito de los geminivirus, distribuido en dos partículas víricas denominadas DNA-A y DNA-B.

Independientemente de la forma en que se agrupe el genoma en los geminivirus ya sea monopartito o bipartito se ha logrado determinar una región altamente conservativa, la cual se ubica en una región intergénica comprendida entre el gen AR1 o AL1 y constituida por una secuencia de aproximadamente 20-30 nucleótidos.

A partir de la hebra circular sencilla de nucleótidos que conforman la partícula vírica se sintetiza una nueva hebra, dando origen a una forma temporal duplex del genoma del virus, la cual se separa posteriormente donde origina una nueva partícula vírica. Este proceso de transcripción y replicación ocurre bidireccionalmente y es realizado en el núcleo de la célula infectada. Lugar donde el virus dispone de toda la maquinaria de replicación de la célula para su duplicación.

El proceso de replicación se inicia una vez expresada la secuencia del gen All, proteína que efectúa un corte en la forma circular de dsDNA. Algunos investigadores (Heyraud *et al*, 1993) sugieren que este corte se efectúa dentro de la región conservativa presente en todos los tipos de geminivirus. Una vez efectuado el corte, el extremo 3' libre funciona como punto de partida para la

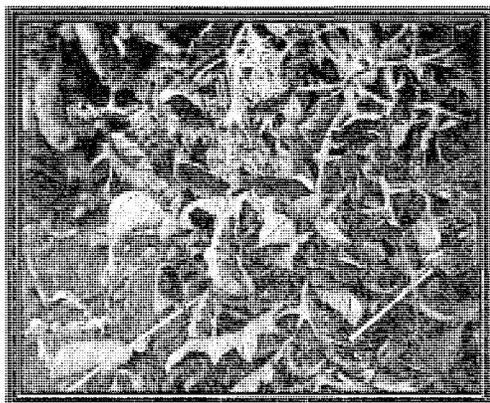
replicación. Por otro lado, Laufs *et al* (1995) sugiere que después del corte a la doble hebra ésta se extiende en toda su longitud y, una vez realizado el proceso de replicación, la Rep (AL1) proteína se encarga de unir de nuevo sus extremos restableciendo la forma circular de la hebra.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las muestras de *Lycopersicon esculentum* (tomate) fueron recolectadas en Ciudad Darío, Matagalpa y Tomatoya, Jinotega, sobre la base de características morfológicas presentes en las hojas que se sospechaba que estuviesen infectadas por geminivirus (ver ilustración 3). De cada planta seleccionada de forma aleatoria, se tomaron de tres a cinco hojas que se envolvieron en papel toalla, se humedecieron con agua desionizada, y se guardaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas, teniendo siempre en cuenta las medidas cautelares necesarias para evitar la contaminación de muestras. Las muestras recolectadas se mantuvieron en un termo con hielo hasta ser trasladadas al laboratorio, en donde se conservaron en un freezer a 20°C para su posterior análisis.

Ilustración 3. Plantas de tomate donde se muestran algunos de los síntomas ocasionados por la presencia de geminivirus. Se observa el enrollamiento (encrespamiento) de las hojas, enanismo de la planta y frutos inmaduros.



Extracción del ADN

Para la extracción del ADN de la planta y de las partículas víricas se usó el protocolo de Doyle y Doyle, 1987. Se obtuvo un disco de tejido vegetal al cerrar y presionar la tapa de un tubo de microcentrífuga (Costar) de 1.5 ml sobre una hoja. La porción de tejido fue homogenizada con un triturador Kontes y 500 μ l del buffer de extracción 2X CTAB (100 mM Tris-HCl (Fisher), pH 8.00, 1.4 M NaCl (Fisher), 20 mM EDTA (Sigma), 2% CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromuro) (Sigma), 1% PVP (Polyvinylpyrrolidone) (Sigma) y 0.2% 2-mercaptoetanol (Fisher)). Después de incubar el extracto en un baño María a 65 °C por 30 min., se le agregó 500 μ l de phenol:cloroformo:alcohol isoamilo (Fisher) 25:24:1 y se centrifugó por 5 min. a 14,000 rpm. Se transfirieron 350 μ l del sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga limpio y se le añadieron 350 μ l de isopropanol (Fisher). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. y luego de decantar el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μ l etanol 70% (Merck) centrifugando a 14,000 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg. Se usó una pipeta de punta fina para eliminar los residuos de etanol y luego se secó el pellet al incubar el tubo con la tapa abierta a 37 °C por 1 hora en un incubador (vwr scientific products, model 1555). Finalmente se disolvió el precipitado en 50 μ l de agua libre de nucleasas, y de cada tubo se hizo una dilución 1:50, recomendada para la reacción PCR (ver ilustración 4).

Cuantificación del ADN extraído

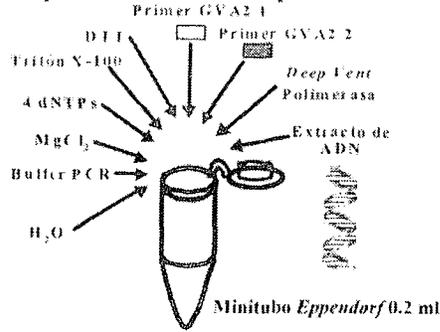
Se usó un espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf) para cuantificar el ADN total extraído. El espectrofotómetro usado considera un factor de conversión 1 A_{260} = 50.0 g/ml para el ADN de cadena doble e incluye ya el factor de dilución (en este caso era 10 l de la muestra en 1000 l de buffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.50), por lo que el dato de la concentración se obtuvo directamente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla para la reacción del PCR se preparó en un minitubo (Eppendorf) 0.2 ml al que se le añadió: 1.55 l del extracto a evaluar (diluido a 1:50), 0.2 M primer GVA2'1, 0.2 M primer GVA2'2 (ambos primers fueron sintetizados en la Universidad de Florida), 50 M de cada dNTP (Roche diagnostics), 1X buffer PCR con 1.5 mM MgCl₂ (Boehringer Mannheim), 0.1% Tritón X-100 (Sigma), 10 mM DTT (Fisher), 0.5 U / 25 l *Deep Vent* polimerasa (New England Biolabs) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen total de 25 l (ilustración 4A). La selección de la enzima a usar se hizo a partir de un ensayo de tres polimerasas distintas, evaluadas en nuestras condiciones del PCR.

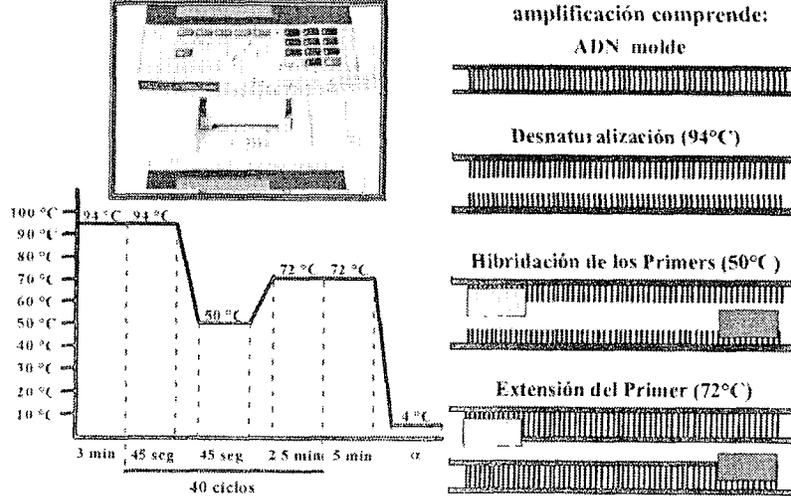
El tubo con la mezcla se colocó en un termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp Pcr System 2400) y se sometió a 40 ciclos de temperatura. Cada uno de estos ciclos incluyó: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 50 °C y 2.5 minutos a 72 °C, que corresponden a las condicio-

a) Preparación de mezcla para PCR



b) PCR en el termociclador

40 ciclos en un termociclador *Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400*



c) Electroforesis de los productos PCR y Visualización de Resultados



Ilustración 4. Diagrama de la secuencia del proceso de: (a) preparación de la mezcla para el PCR, (b) condiciones óptimas y ciclo del PCR y (c) separación-visualización de los productos del PCR en un gel de 1.2% de agarosa.

nes de desnaturalización, hibridación y elongación del ADN, respectivamente. Antes del primer ciclo, la temperatura se incrementó a 94 °C por 3 min. (Des-

naturalización inicial) y después del último ciclo se mantuvo a 72 °C por 5 minutos (elongación final) y a 4 °C por indefinido hasta que los tubos eran reti-

rados del termociclador (ilustración 4B). El tiempo total de la PCR era de aproximadamente 3 horas.

Electroforesis de los productos de la PCR

Una vez finalizada la PCR se agregó a cada tubo 3 l de solución de sembrado 6X (0.25 % bromofenol blue, 0.25% xylene cyanol FF y 30% glicerol en agua) y luego el contenido de cada tubo se depositó en los pozos del gel de 1.4 % agarosa (Fisher) teñido con bromuro de ethidium 0.75 g/ml y sumergido en buffer TBE 0.5 X, preparado a partir de buffer TBE (Sigma) 10 X (0.89 M Tris, 0.89 M Ácido Bórico y 0.02 M EDTA). En uno de los pozos del gel se depositó 0.5 g de un marcador 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), para así conocer el peso molecular de los productos del PCR. El gel se sometió a una corriente de 100 V por 2.5 horas y después se colocó sobre un transiluminador UV para visualizar las bandas de ADN (ilustración 4C).

Caracterización de los productos PCR con RFLP

El ADN de algunas muestras, amplificado por la PCR, fue sometido a la acción de tres enzimas de restricción (New England Biolabs): *Sal* I, *Bgl* II y *Hinc* II, para caracterizar e identificar el virus detectado en base a la presencia de los diferentes fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLP). Para la reacción de digestión se utilizaron las especificaciones proporcionadas por *New Englang Biolabs* para cada enzima y el protocolo de *Sambrook, Fritsch y Maniatis*, 1989, preparando una mezcla que contenía: 2 g del producto PCR, 1X

Buffer 3 (New England Biolabs), 100 g/ml BSA (New England Biolabs), 10 U/l de una de las tres enzimas y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 50 l. La mezcla se preparó en un minitubo (Eppendorf) 0.2 ml, éste se incubó por una hora a 37°C, y después de ese tiempo se le adicionó 8.3 l de solución de sembrado 6X. Para observar los resultados se hizo una electroforesis en gel de 1.2% agarosa (teñido con bromuro de ethidium 0.75 g/ml) por 3 horas y luego los patrones de restricción se visualizaron sobre un transiluminador UV.

Resultados y discusión

Se evaluó un total de 56 muestras de *Lycopersicon esculentum*, 11 del Departamento de Matagalpa (Ciudad Darío, comunidad "San Juanillo") y 45 del Departamento de Jinotega (comunidades "Tomatoya" y "Chagüite Grande").

La concentración promedio del ADN extraído de las 56 muestras colectadas fue de aproximadamente 500 g/ml. Este ADN extraído y cuantificado corresponde en su mayor parte al ADN total de la planta; sólo en caso que la muestra provenga de una planta infectada por un geminivirus, entonces una pequeña porción corresponderá al ADN de la forma viral replicativa (de doble cadena), la cual se acumula en los tejidos infectados (propiamente en el núcleo de células asociadas con el floema), de ahí que pueda aislarse con el protocolo de extracción usado. La necesidad de diluir el ADN extraído se debe a la presencia de compuestos de la planta que quedan como residuos del proceso de extracción y que pueden actuar como inhibidores de la PCR, la

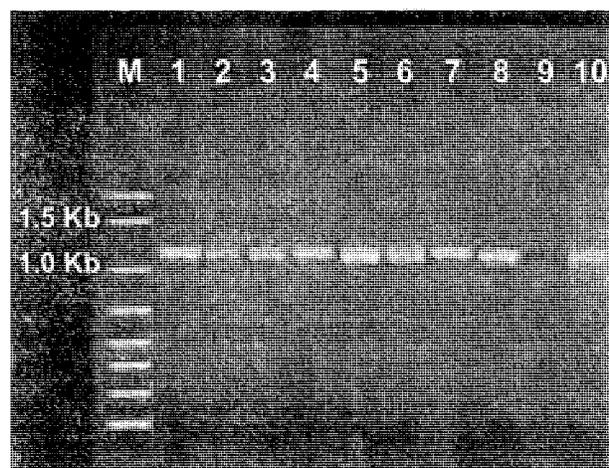
cual es muy susceptible a la presencia de contaminantes. Esta limitante se ve compensada por el hecho de que con esta técnica es posible la amplificación de ADN a muy bajas concentraciones.

El genoma de la mayoría de los *Begomovirus* está estructurado en dos componentes circulares de cadena sencilla designados como ADN-A y ADN-B (ver ilustración. 2). Los dos primers usados en los ensayos PCR de este estudio se unen a la forma replicativa (dúplex) del componente ADN-A; el primer GVA2'1 se aparea con la secuencia AL1 de la hebra complementaria, que codifica para una proteína asociada a la replicación, y el primer GVA2'2 lo hace con la secuencia AR1 de la hebra patrón, que codifica para una proteína capsídica (ilustración 2) (Rojas *et al.*, 1993). Si en el extracto diluido usado en la PCR está presente la forma replicativa, los primers se unen a estas secuencias y la enzima polimerasa amplifica el fragmento de ADN flanqueado por los primers obteniendo

una banda de ADN de 1.2 - 1.4 Kb en cantidades suficiente para su detección por electroforesis en gel de agarosa (ilustración 5 y 6).

Antes de evaluar las 56 muestras fue necesario seleccionar la enzima polimerasa a usar en la PCR. Actualmente hay una amplia variedad comercial de estas enzimas, disponibles y aisladas de diferentes microorganismos y con características ligeramente distintas; para este estudio se contaban con tres: *Platinum Taq Polymerase* (Gibco Brl), *Vent* (New England Biolabs) y *Deep Vent* (New England Biolabs). Estas tres enzimas se probaron en reacciones PCR con tres muestras controles de ADN, para así determinar su actividad de amplificación. De las tres enzimas, la *Platinum Taq Polymerase* no amplificó ninguna banda, la *Vent* amplificó en algunas muestras un patrón de dos bandas muy próximas, y la *Deep Vent* amplificó el patrón esperado de una sola banda.

Ilustración 5. Detección de geminivirus por PCR en 8 diferentes muestras procedentes de Ciudad Darío. El producto amplificado con los primers GVA2'1 y GVA2'2 corresponde a un fragmento del genoma A del patógeno, el cual fue detectado como una banda de aproximadamente 1.2 Kb en un gel de 1.2 % agarosa teñido con 0.75 g/ml de bromuro de etidio. (M) marcador *BioRad* Ladder; (1-8) muestras diagnosticadas como positivas (infectadas); (9) control negativo (blanco: mezcla PCR + agua); (10) control positivo (tomate infectado).



La actividad de amplificación de estas enzimas está influenciada por varios factores, entre ellos la concentración de Mg^{2+} y el tiempo de amplificación en cada ciclo de temperatura. Según los resultados de este pequeño ensayo la enzima *Deep Vent* es la que mejor se adapta al protocolo PCR usado con respecto a estos factores, y por ello se seleccionó como la enzima ideal en las reacciones de amplificación de todas las muestras.

La detección o no de partículas virales en cada una de las 56 muestras evaluadas se definió sobre la base de la presencia o ausencia en el gel de agarosa, de una banda de ADN de 1.2 a 1.4 Kb (que corresponde al fragmento amplificado por los primers de la forma replicativa del ADN-A). Si en el gel se observaba una banda de ADN con el peso establecido, ésta era diagnosticada como positiva; por el contrario, si la banda estaba ausente entonces se podía afirmar que la

muestra no estaba infectada por un geminivirus (ilustración 5 y 6).

Del total de 56 muestras evaluadas, 45 se diagnosticaron como positivas, lo que representa un 80%; las 11 muestras restantes (20%) arrojaron un resultado negativo (cuadro 1).

Resulta interesante señalar que a pesar que muchas plantas presentaban las características morfológicas visuales de estar infectadas por geminivirus, el 20% del total de muestra analizadas arrojaron resultados negativos en el análisis, es probable que se deba a que los síntomas eran ocasionados por la presencia de otros patógenos (otros virus, bacterias, hongos) o debido a condiciones de estrés (falta de nutrientes, agua, condiciones climáticas, etc.)



Ilustración 6. Detección de geminivirus por PCR en 7 muestras diferentes procedentes de Tomatoya. El producto amplificado con los primers GVA2'1 y GVA2'2 corresponde a un fragmento del genoma A del patógeno, el cual fue detectado como una banda de aproximadamente 1.2 Kb en un gel de 1.2 % agarosa teñido con 0.75 g/ml de bromuro de etidio. (M) marcador *New England Biolabs* 100 bp; (1) muestra diagnosticada como positiva (infectada); (2-4) muestras diagnosticadas como negativas (no infectadas); (5-7) muestras diagnosticadas como positivas; (8) control negativo (blanco: mezcla PCR + agua); (9) control positivo (tomate infectado).

Cuadro 1
DISTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS
POR LOCALIDAD DE MUESTREO

| Departamento | Comunidad | Número de muestras | Positivas | Porcentaje | Negativas | Porcentaje |
|--------------|-----------------------------|--------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Matagalpa | San Juanillo (Ciudad Darío) | 11 | 11 | 100% | 0 | 0% |
| Jinotega | Tomatoya | 37 | 27 | 73% | 10 | 27% |
| | Chagüite Grande | 8 | 7 | 88% | 1 | 12% |
| Total | | 56 | 45 | 80% | 11 | 20% |

Los primers GVA2'1 y GVA2'2 utilizados en el diagnóstico presentan la particularidad de ser “degenerativos”, es decir, que cada uno de ellos es en realidad una mezcla de moléculas en que los nucleótidos de una o más posiciones definidas varían (ilustración 7), y además están diseñados para unir-se a regiones altamente “conservadas”, comunes para todos los *Geminivirus* (Rojas *et al.*, 1993). Todo esto significa que la PCR con estos primers puede detectar cualquiera de los miembros del

género *Geminivirus*, y por ello puede decirse ciertamente que cada una de las plantas de las cuales provenían las 45 muestras diagnosticadas como positivas estaba infectada con algún geminivirus transmitido por la mosca blanca.

Una de las ventajas de usar este tipo de primers “degenerados” y de trabajar a nivel del ADN es que el diagnóstico de geminivirus transmitidos por la mosca blanca no sólo puede limitarse al

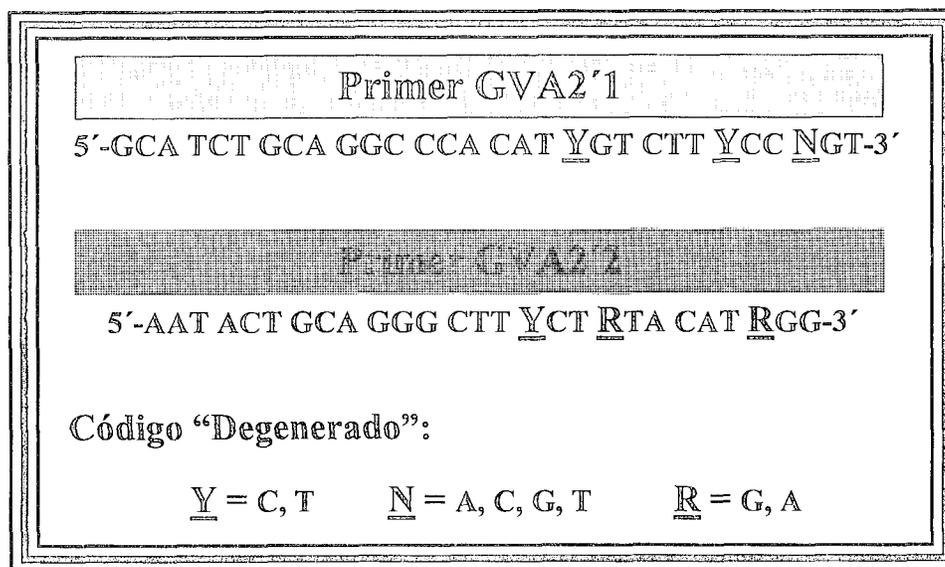


Ilustración 7. Secuencia de los primer degenerativos utilizados en el diagnóstico y los sitios que presentan variabilidad en la secuencia de sus nucleótidos.

cultivo de tomate, sino que la PCR puede usarse para la detección de estos virus en cualquiera de la variedad de cultivos dicotiledóneos que se ven afectados por ellos: frijol, tabaco, yuca, repollo, papa, chiltoma, soya, y cucurbitáceas. De hecho, en un ensayo preliminar con muestras de una plantación de chiltoma de la comunidad de "San Juanillo", se detectó la infección viral en el 40% de ellas (datos aún por publicar).

La PCR, con estos primers, sin embargo, no es capaz de caracterizar o identificar el tipo de geminivirus presente en las muestras, y para ello es necesario recurrir a otras técnicas. La más usada hoy en día es la secuenciación, un método de costos elevados por requerir de equipo sofisticado. Un método más sencillo usado en la caracterización de fragmentos amplificados en la PCR es el RFLP, con el cual pueden obtenerse, a partir de la digestión del producto amplificado por el PCR con diferentes enzimas de restricción (endonucleasas), obtenien-

do patrones de restricción que pueden compararse con mapas de restricción ya establecidos para los distintos géneros e inclusive cepas de geminivirus.

Para el ensayo PCR-RFLP se seleccionaron tres muestras positivas y cada una fue digerida con las enzimas comerciales *Sal* I, *Bgl* II y *Hinc* II de *New England Biolabs*. *Sal* I no reconoció ningún sitio de restricción en las tres muestras analizadas, por lo que se visualizó, en el gel de agarosa, nuevamente una banda de aproximadamente 1.2 Kb. *Hinc* II cortó el fragmento viral amplificado en un sitio, mostrando en el gel dos bandas de pesos moleculares similares: 0.65 Kb y 0.60 Kb. Las digestiones con la enzima comercial *Bgl* II cortó el ADN viral amplificado, reconociendo dos sitios de restricción en dos de las muestras analizadas, visualizando en el gel tres bandas de 0.65Kb, 0.35Kb y 0.25Kb. En la tercera muestra analizada se registró un patrón de corte diferente originando bandas de 0.9Kb y 0.35Kb (ilustración 8).

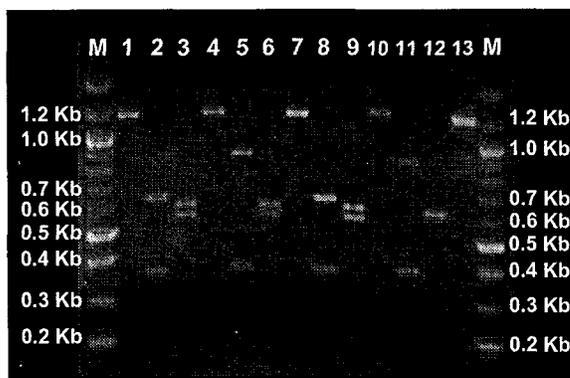


Ilustración 8. Patrones PCR-RFLP para tres muestras positivas. El producto PCR de las tres muestras fue sometido a la acción de cada una de tres enzimas de restricción: *Sal* I, *Bgl* II y *Hinc* II y separado por electroforesis en un gel de 1.2% agarosa teñido con 0.75 g/ml de bromuro de etidio. (M) marcador *New England Biolabs* 100 bp; (1, 2 y 3) muestra 1; (4, 5 y 6) muestra 2; (7, 8 y 9) muestra 3; (10, 11 y 12) muestra control de Tomato Mottle Virus de Florida; (13) muestra control que no fue cortada con ninguna enzima. (1,4,7,10) producto PCR digerido con *Sal* I; (2,5,8,11) producto PCR digerido con *Bgl* II; (3,6,9,12) producto PCR digerido con *Hinc*.

Estos patrones de bandas para las tres muestras del ensayo PCR-RFLP con *Bgl* II y *Hinc* II no coinciden con los patrones reportados en la literatura para geminivirus (Rojas et al., 1993), por lo que el patógeno detectado en las muestras evaluadas podría tratarse de una nueva forma de geminivirus del tomate, que valdría la pena caracterizar en estudios posteriores.

Para confirmar el polimorfismo detectado con *Bgl* II se realizó nuevamente un ensayo PCR-RFLP, esta vez con diez muestras, una de las cuales era la muestra que originó bandas de 0.9 Kb y 0.35 Kb. Se obtuvieron dos patrones RFLP: 0.65 Kb, 0.35 Kb y 0.25 Kb para nueve de las muestras; y nuevamente 0.9 Kb y 0.35 Kb para la muestra polimórfica anteriormente ensayada (ilustración 9).

Al revisar más específicamente la procedencia de las diez muestras en el ensayo PCR-RFLP con *Bgl* II, se determinó que tanto la muestra polimórfica (0.9 Kb y 0.35 Kb) como

otras dos muestras más (0.65 Kb, 0.35 Kb y 0.25 Kb) procedían de la misma plantación en la comunidad "Tomatoya" (Jinotega). Esto quiere decir que una misma plantación de tomate podría estarse viendo afectada por dos geminivirus diferentes. Con relación a lo anteriormente expuesto podemos especular que al encontrarse la planta infectada por el virus es probable que ésta haya desarrollado algún mecanismo de defensa (producción de metabolitos secundarios) para combatir la presencia del virus y que la acción de respuesta del virus, ante la innovación de la planta, fue la de modificar su estructura para originar un nuevo tipo de virus evadiendo de esta forma la respuesta inmune de la planta. Esto podría explicar la presencia de dos tipos de geminivirus diferentes en la planta. Pero para estar seguros de ello habría que utilizar otras enzimas de restricción u otros marcadores genéticos para caracterizar más a fondo las formas virales detectadas.

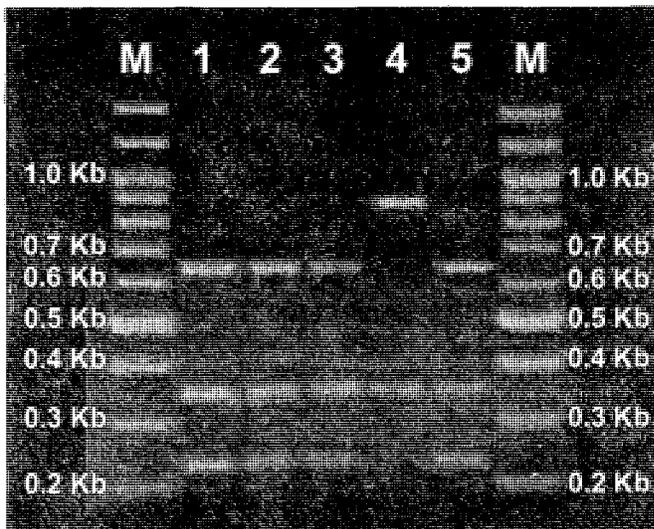


Ilustración 9. Patrones PCR-RFLP para cinco muestras positivas digeridas con *Bgl* II. El producto PCR de las cinco muestras fue sometido a la acción de *Bgl* II y separado por electroforesis en un gel de 1.4% agarosa teñido con 0.75 g/ml de bromuro de etidio. (M) marcador *New England Biolabs* 100 bp(1) muestra 1; (2) muestra 2; (3) muestra 3; (4) muestra polimórfica detectada en el ensayo PCR-RFLP previo, (5) muestra 5.

Este estudio constituye un primer paso en el esfuerzo del Centro de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana por aplicar la biotecnología en la solución de problemas en el campo de la agricultura. Ahora que se ha logrado establecer la PCR para el diagnóstico de geminivirus transmitidos por la mosca blanca, se pretende aplicar esta técnica a estudios más concretos que generen resultados de interés para el productor, como son: evaluación de la incidencia de geminivirus en tomate y otros cultivos de importancia económica, monitoreo del virus en todas las etapas del desarrollo del cultivo, y detección de estos patógenos en plantas que no muestren síntomas de infección

lo que podría traducirse en la identificación de un mecanismo de resistencia y control de la enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo investigativo contó con la determinante colaboración del Interdisciplinary Center for Biotechnology Research (ICBR) de la Universidad de Florida y de la Fundación New England Biolabs. Agradecemos al Ingeniero Eddy Trejos Salinas del Programa de Desarrollo Agrario de la UCA y al Ingeniero Gilberto Zeledón de la agencia INTA-Matagalpa por su valiosa colaboración mostrada en el proceso de recolección de las muestras.

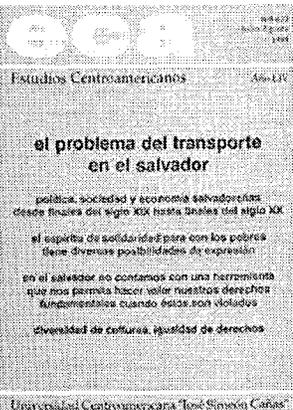
Bibliografía

- BROWN, J.K. (1991). "An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean basin". USA. *FAO Plant Prot. Bull.* No.39 Pp.5-23.
- BROWN, J.K. (1992). "Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin". USA. *Plant. Dis.* No.76 Pp.220-225.
- CABALLERO, R. Y RUEDA, A. (1993). "Las moscas blancas en Honduras", en: *Las Moscas Blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*. Turrialba. CATIE.
- DARDON, D.E. (1993). "Las moscas blancas en Guatemala", in: *Las Moscas Blancas en América Central y el Caribe*. Turrialba. CATIE.
- HILJIE, L. *et al.* (1993). "Las moscas blancas en Costa Rica", en *Las moscas blancas en América Central y el Caribe*. Turrialba. CATIE.
- HEYRAUD, F. *et al.* (1993). "Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus". USA. *EMBO journal* No.12, Pp.4445-4452.
- LAUFS, J. *et al.* (1995). "In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus". *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. Vol.92 No.9 Pp. 3879-3883.
- NAGAR, *et al.* (1995). "A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells". USA. *Plant Cell* Vol. 7 No.6 Pp. 705-719.
- POLSTON, J.E. y ANDERSON, P.K. (1997). "The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere". *Plant Disease* Vol. 81 No. 12. Pág. 1358-1369.
- ROJAS, M.R.; GILBERSTON, R.L.; RUSSELL, D. and MAXWELL, D.P. (1993). "Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses". *Plant Dis.* No.77 Pp.340-347. USA.
- ROSSET, P.M. (1986). *Ecological and economic aspects of pest management and polycultures of tomatoes in Central America*. Ph. D. Thesis. University of Michigan, Ann Arbor.
- SERRANO, L. *et al.* (1993). "Las moscas blancas en El Salvador", en: *Las Moscas Blancas en América Central y el Caribe*. Turrialba. CATIE.

- XIE Q., *et al* (1995). "Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus-requirement for efficient viral DNA replication". USA. *EMBO Journal* No.14 Pp. 4073-4082.
- ZACHRISSON, B. *et al.* (1993). "Las moscas blancas en Panamá", en *Las Moscas Blancas en América Central y el Caribe*. Turrialba. CATIE.



Revista Estudios Centroamericanos



Revista de la extensión cultura de la UCA de El Salvador. Se publica mensualmente con análisis de la realidad nacional salvadoreña y centroamericana.

Suscripciones:

| | |
|-------------------------|-----------|
| Centroamerica y Panamá | US\$40.00 |
| Norte y Suramérica | US\$70.00 |
| Europa y otras regiones | US\$80.00 |

anúnciense

Información en Nicaragua:
 Tel. (505) 2783923 al 27 Ext. 192 y 236
 Fax:(505) 2670106
 email:encuntr@ns.uca.edu.ni
 Universidad Centroamericana
 Nicaragua

Para suscribirse dirigirse a:
 Distribuidora de Publicaciones
 Aptdo. 01-575
 San Salvador, El Salvador
 Teléfonos 273-3556 (directo) ó 2734400 ext. 240 ó 242
 Fax: (503) 2733556
 email: ccordova@ued.uca.edu.sv