

Informe final de las actividades realizadas con la beca otorgada por la Red Latinoamericana de Botánica

Beca de perfeccionamiento RLB08-P10

Otorgada a: Elvira Fiallo Olivé, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Centro donde se desarrollaron las actividades de la beca: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN- Unidad Irapuato, México.

Tutor en CINVESTAV: Dr. Rafael F. Rivera Bustamante

Actividad general realizada: Caracterización de geminivirus y crinivirus que afectan diferentes cultivos en Cuba

Introducción

La mosca blanca *Bemisia tabaci* es un vector polífago que se estima se alimenta de más de 500 especies de plantas. Este vector transmite virus pertenecientes al género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) y *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*). Los begomovirus causan significativas, y a menudo totales, pérdidas en las cosechas en los agroecosistemas de las regiones tropical y subtropical del mundo. La distribución global de estos virus está relacionada con la diseminación de la mosca blanca. Los geminivirus se caracterizan por tener un genoma circular de simple cadena de ADN, y sus miembros pueden ser monopartitos o bipartitos. América Latina ha sido la región más afectada en cuanto a surgimiento de nuevos geminivirus, número de cultivos afectados, pérdidas en las cosechas y áreas agrícolas devastadas (Morales y Anderson, 2001). Los crinivirus se consideran virus emergentes y en los últimos años se han encontrado asociados a cultivos como tomate, lechuga y papa. En Cuba, desde el año 1998 el geminivirus prevalente es *Tomato yellow leaf curl virus* y en el año 2008 nuestro grupo de trabajo detectó por primera vez en Cuba un virus miembro del género *Crinivirus*, *Tomato chlorosis virus* (Martínez y col., 2008). Recientemente, hemos observado en diversos cultivos como tomate, tabaco, pimiento y en malezas, síntomas como moteados, mosaicos, amarillamientos desde leves hasta severos, distorsiones en las hojas, síntomas que recuerdan los causados por virus transmitidos por mosca blanca. Por ello, el objetivo de la investigación realizada en el CINVESTAV, fue la caracterización de geminivirus y crinivirus presentes en Cuba infectando cultivos de importancia económica y malezas.

Actividades de caracterización de geminivirus

- Amplificación por círculo rodante del genoma viral a partir de muestras provenientes de plantas de tomate, tabaco, pimiento, *Euphorbia heterophylla*, *Rhynchosia minima* que presentaban síntomas típicos de infecciones por geminivirus y que mostraban, por resultados de reacción en cadena de la polimerasa previamente obtenidos por nosotros, la presencia de begomovirus bipartitos.
- Digestión de los ADN virales con varias enzimas: Eco RI, Eco RV, Bam HI, Pst, Nco I, Hind III, Xba I, Xho I, etc para determinar aquellas con sitio de corte único en cada componente viral.
- Hibridación de los ADN digeridos con la secuencia del gen AV1 de PepGMV y luego con los genes BC1 y BV1 de PepGMV en condiciones poco restringentes para determinar cuál de los fragmentos se corresponde con ADN-A y ADN-B geminiviral.
- Clonación de los componentes virales en vectores apropiados (pJET 1.2/blunt, pBlueScript y pGEMT-easy), con la enzima de restricción escogida en cada caso.
- Secuenciación de los ADNs clonados.
- Comparación de las secuencias de geminivirus obtenidas con las de los geminivirus cuyas secuencias se hayan disponibles en el GenBank mediante BLAST.
- Determinación del porcentaje de identidad de los virus encontrados con el resto de los begomovirus cuyas secuencias se hayan disponibles en el GenBank.
- Empleo de biobalística para determinar hospedantes experimentales del virus aislado de tomate. El virus presente en las plantas bombardeadas fue detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa.

Actividades de caracterización de Crinivirus

- Realización de *Dot blot* a muestras de ARN provenientes de plantas de tomate con síntomas típicos de infección por *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Sonda usada: región de la HSP del aislamiento cubano de ToCV.

Resultados obtenidos:

- Presencia de un nuevo geminivirus bipartito (secuenciado componente A y componente B) infectando el cultivo del tomate en Cuba al cual nombramos *Tomato yellow distortion leaf virus* (TYDLV). La secuencia del ADN-A de este virus fue depositada en el GenBank con número de acceso FJ174698. Este virus constituye una nueva especie en el género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae* debido a que el porcentaje de identidad del componente A con el ADN-A de cada uno de los begomovirus cuyas secuencias se hayan disponibles en el GenBank es menor que 88 %, que es el valor de corte para la demarcación de las especies en el género *Begomovirus*.
- Además, empleando biobalística con clones infectivos demostramos que este virus (TYDLV) es capaz de infectar otras plantas además de tomate, su hospedante natural. Estas plantas son *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, tomate variedad Campbell-28, tomate HA 1930.
- Presencia de un nuevo geminivirus bipartito infectando el cultivo del tabaco y el del pimiento en Cuba al cual nombramos *Tobacco yellow crinkle virus* (TYCV). La secuencia del componente A de este virus fue depositada en el genbank con número de acceso FJ213931 para el aislamiento procedente de tabaco y FJ222587 para el aislamiento procedente de pimiento. Este virus constituye una nueva especie en el género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae* debido a que el porcentaje de identidad del componente A con el ADN-A de cada uno de los begomovirus cuyas secuencias se hayan disponibles en el GenBank es menor que 88 %, que es el valor de corte para la demarcación de las especies en el género *Begomovirus*.
- Empleando biobalística con el ADN obtenido de la amplificación por círculo rodante a partir del material vegetal de tabaco demostramos que este virus (TYCV) es capaz de infectar otras plantas además de tabaco y pimiento. Estas plantas son fríjol y *Nicotiana benthamiana*.
- Detección de ToCV en 16 muestras de localidades de la región oriental de Cuba.
- Presencia de otros geminivirus bipartitos infectando naturalmente en Cuba, cuyas secuencias todavía están parciales: en plantas de tabaco la secuencia indica muy probablemente *Euphorbia mosaic virus* infectando plantas de tabaco en Cuba y, en plantas de *Rhynchosia minima*, la

secuencia parcial del aislamiento viral indica la presencia de un nuevo virus en este cultivo.

Los resultados expuestos anteriormente serán publicados y presentados en eventos. Además, formarán parte de mi tesis de doctorado cuyo tema es Caracterización y diagnóstico de virus transmitidos por mosca blanca en Cuba.

Otra actividad realizada en el CINVESTAV: participación semanal en la discusión de artículos con temas científicos de interés general para el grupo de virología.

Bibliografía

Morales y Anderson (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* (2001) 146: 415–441.

Martínez-Zubiaur, Y.; Fiallo-Olivé, E.; Carrillo-Tripp, J.; Rivera-Bustamante, R. (2008) First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato in single and mixed infections with Tomato yellow leaf curl virus in Cuba. *Plant Disease* 92 (5), 836.