

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BEGOMOVIRUS EN CUBA MEDIANTE EL EMPLEO DE LA AMPLIFICACIÓN POR CÍRCULO RODANTE

Elvira Fiallo-Olivé^{1,2}, Yamila Martínez-Zubiau², Cecilia Hernández-Zepeda³,
Jimena Carrillo-Trip³ y R.F. Rivera-Bustamante³

¹Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25 entre J e I, # 455, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba. ²Grupo de Fitopatología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. ³Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN – Unidad Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato, México

*Correo electrónico: yamila@censa.edu.cu

RESUMEN: La amplificación por círculo rodante (ACR) constituye una alternativa eficaz y rápida para los estudios de diversidad biológica de geminivirus en diferentes regiones de mundo. El uso de esta tecnología permite obtener amplificaciones de ADN circulares pequeños y de simple cadena, sin tener en consideración sus posibles variaciones secuenciales. Además, la ACR tiene una alta fidelidad de copia y la cantidad de ADN molde empleada para la amplificación es ínfima. En Cuba, extensas áreas dedicadas al cultivo de hortalizas, papa, frijol y tabaco, son afectadas por diferentes especies de begomovirus, cuya amplia diversidad ha impedido contar con cebadores genéricos efectivos para el estudio de este género viral. En los trabajos de prospección nacional se colectaron plantas de tomate, tabaco y pimiento con síntomas asociados a la posible presencia de begomovirus. Se realizaron extracciones del ADN viral y se sometieron a amplificación por círculo rodante con el objetivo de obtener copias del genoma viral íntegro. Como resultado, se determinó la presencia de dos nuevos virus, propuestos como nuevas especies de begomovirus bipartitos, nombrándose virus del amarillamiento y deformación de la hoja del tomate (Tomato yellow leaf distortion virus, ToYLDV), infectando este cultivo y virus del encrespamiento amarillo del tabaco (Tobacco yellow crinkle virus, TbYCV), infectando tabaco y pimiento. Los resultados obtenidos confirman la utilidad del uso de la ACR para estudios de diversidad de begomovirus y sus interacciones en los agroecosistemas productivos.

(Palabras clave: begomovirus; amplificación por círculo rodante; infectividad)

IDENTIFICATION OF NEW BEGOMOVIRUSES IN CUBA USING ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION

ABSTRACT: The rolling circle amplification (RCA) has been an effective and quick alternative to study the biological diversity of geminiviruses in different regions of the world. This technology allows obtaining the amplification of small circular DNA and of simple strand, without taking into account the possible sequential variations. In addition, the RCA has a high copy fidelity and the quantity of DNA template is extremely low. In Cuba, extensive areas dedicated to grow vegetables, potato, beans and tobacco are affected by different begomovirus species, with such a wide diversity that hinders to have appropriate generic primers to study this viral genus. In works of national prospecting, tomato, tobacco and pepper plants with symptoms associated with begomoviruses were collected. DNA was extracted and amplified by rolling circle with the objective of obtaining copies of the entire viral genome. As a result, the presence of two new bipartite begomoviruses was observed and proposed as new species. They were named Tomato yellow leaf distortion virus, found in tomato crops, and Tobacco yellow crinkle virus infecting tobacco and pepper. The results obtained confirm how useful the RCA is to study the diversity of begomoviruses and their interactions in the productive agroecosystems.

(Key words: begomovirus; rolling circle amplification, infectivity)

INTRODUCCIÓN

Los begomovirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) 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 su vector polífago, la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.), que se estima se alimenta de más de 500 especies de plantas (1).

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.

Dos son los métodos fundamentales usados para la clonación de los geminivirus. El primero está basado en la reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores genéricos y específicos. El segundo está basado en la extracción del ADN enriquecida con la forma replicativa del genoma viral, seguido por digestión con enzimas de restricción, hibridación de ADN y clonación con una enzima de sitio de corte único en el genoma viral. El primer método tiene como desventaja que constantemente surgen nuevos geminivirus que no pueden ser amplificados con los cebadores existentes. El segundo método tiene una baja eficiencia debido a la baja concentración de genoma viral en las preparaciones.

La amplificación por círculo rodante (ACR) ha constituido una alternativa eficaz y rápida para los estudios de diversidad biológica de geminivirus en diferentes regiones de mundo (2). El uso de esta tecnología permite obtener amplificaciones de moléculas de ADN circulares y de cadena simple, sin tener en consideración sus posibles variaciones secuenciales. Además, la ACR tiene una alta fidelidad de copia y la cantidad de ADN molde empleada para la amplificación es ínfima (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los trabajos de colecta se realizaron en la región oriental del país en el mes de enero de 2007. Las muestras de hojas fueron colectadas de plantas de *Solanum lycopersicum* L., *Nicotiana tabacum* L. y *Capsicum annuum* L., que mostraban síntomas tales como mosaicos, moteados y reducción del área foliar,

típicos de la presencia de una infección por geminivirus. Se colectó un total de 45 plantas (35 de tomate, 7 de tabaco y 3 de pimiento). Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa

El ADN se extrajo de las venas primarias de dos hojas apicales según el procedimiento previamente descrito por Potter (4). El tejido vegetal se maceró y se añadió como tampón de extracción Tris-HCL 1M, EDTA 0,5M, NaCL 5M, SDS 0,1%, se incubó a 65°C durante 5 minutos, se centrifugó y al sobrenadante se le añadió isopropanol dejándose a -20°C durante 30 minutos (4). La detección de begomovirus se realizó por reacción en cadena de la polimerasa empleando tres pares de cebadores degenerados para begomovirus, (dos pares de cebadores amplifican fragmentos del genoma A de geminivirus y el otro par un fragmento de genoma B). Además, se emplearon cebadores específicos para *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (5, 6, 7).

Amplificación por círculo rodante

La amplificación por círculo rodante se le realizó a los ADN que mostraban, según el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa con diferentes cebadores, estar infectados con begomovirus. Para ello se utilizó el TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham Biosciences, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este procedimiento emplea la polimerasa del bacteriófago Phi29 y cebadores al azar para la amplificación de moléculas de ADN circulares.

Hibridación radiactiva de ácidos nucleicos

El ADN amplificado por círculo rodante se digirió con diferentes enzimas de restricción (*Bam*H I, *Eco*R I, *Bgl* II, *Pst* I, *Xba* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Xho* I, etc) y se corrió en un gel de agarosa al 0,8 %. Se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond N⁺ toda la noche usando SSC 20X como tampón de transferencia. Las hibridaciones y prehibridaciones se realizaron en condiciones poco restringentes empleando como sondas los genes av1 y bc1/bv1 de *Pepper golden mosaic virus*, un begomovirus bipartito. Las sondas se obtuvieron a partir del genoma clonado de este virus, disponible en el Laboratorio de Virología del CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Clonación de los genomas

La amplificación por círculo rodante de cada muestra de interés se digirió con varias enzimas de restric-

ción con el objetivo de determinar una enzima de sitio de corte único en cada componente viral. Los ADN-A se clonaron empleando el CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para la clonación se usó la enzima con sitio de corte único en cada componente, previamente determinada en este trabajo. Cada clon se secuenció y las secuencias se compilaron usando EditSeq and SeqMan (DNASTAR, Madison, USA) y el porcentaje de identidad se calculó usando el Clustal V, disponible también en el DNASTAR. Los virus que se emplearon para los análisis y sus números de acceso en el GenBank fueron las siguientes: *Abutilon mosaic virus*-[Germany] (U51137), *Bean golden yellow mosaic virus*-[Cuba] (AJ544531), *Cabbage leaf curl Jamaica virus* -[Jamaica:DouglasCastle:2005] (DQ178614), *Chino del tomate virus*-Soybean [Mexico:Sinaloa:2005] (DQ347945), *Dicliptera yellow mottle Cuba virus*-[Cuba] (AJ549960), *Macroptilium yellow mosaic virus*-[Cuba] (AJ344452), *Okra yellow mottle Iguala virus*-[Mexico:Iguala] (AY751753), *Sida golden yellow vein virus*-[Cuba:Havana] (AJ577395), *Tobacco leaf curl Cuba virus*-[Cuba:Taguasco:2005] (AM050143), *Tobacco leaf rugose virus*-[Cuba] (AJ488768), *Tobacco mottle leaf curl virus* (FM160943), *Tomato mosaic Havana virus*-[Cuba:Quivicán] (Y14874), *Tomato mottle Taino virus*-[Cuba] (AF012300) y *Wissadula golden mosaic St Thomas virus* (DQ395343).

Ensayos de infectividad

El ADN amplificado por círculo rodante de las plantas originalmente infectada se empleó para el bombardeo en plantas de *Nicotiana benthamiana* L. Se emplearon partículas de tungsteno (0,7 mm, BioRad, Hercules, CA) cubiertas con el ADN viral (8).

Para comprobar la infección se tuvo en cuenta los síntomas desarrollados y la detección del virus en las hojas del ápice mediante reacción en cadena de la polimerasa según el procedimiento descrito por Brown *et al.* (7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de geminivirus

De las 45 plantas colectadas que mostraban síntomas característicos de una infección viral, solamente el 48.8% (22 plantas) mostraron estar infectadas con geminivirus. De las 35 plantas de tomate colectadas, 24 amplificaron con alguno de los pares de cebadores empleados en este estudio, detectándose en 20 de ellas la presencia de *Tomato yellow leaf curl virus*, el begomovirus monopartito más ampliamente distribuido

en las plantaciones de tomate en Cuba. Las cuatro restantes mostraron la presencia de un begomovirus bipartito. Las siete plantas de tabaco colectadas amplificaron con los cebadores empleados en este estudio, tanto para genoma A como para genoma B. Lo mismo sucedió para una de las tres plantas de pimiento colectadas.

Clonación de begomovirus

La amplificación por círculo rodante se empleó para amplificar el ADN viral de las plantas donde se detectó la presencia de geminivirus y de esta forma, poder aumentar la cantidad de ADN de las preparaciones, para la posterior clonación de los componentes virales.

La ACR y posterior digestión con enzimas de restricción permitió confirmar la naturaleza monopartita o bipartita de los begomovirus amplificados antes de conocer su secuencia. La suma de cada uno de los fragmentos generados por restricción es aproximadamente 2,6 kb si el begomovirus es monopartito y 5,2 kb si el begomovirus es bipartito. La amplificación por círculo rodante del ADN proveniente de las plantas de tomate infectadas con un geminivirus desconocido permitió corroborar la presencia de dos componentes virales, debido a que la suma de los fragmentos digeridos es aproximadamente 5,2 kb, según se ilustra en la Figura 1.

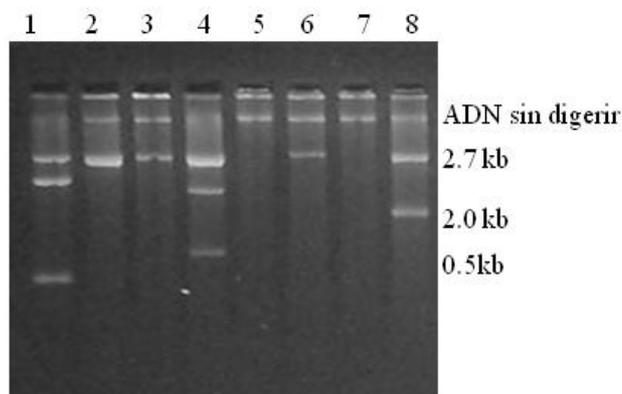


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN de una planta de tomate infectada con un geminivirus desconocido, amplificado por círculo rodante y digerido con enzimas de restricción. La digestión se realizó con las siguientes enzimas: *Bam*H I (1), *Eco*R I (2), *Bgl* II (3), *Pst* I (4), *Xba* I (5), *Kpn* I (6), *Pst* I (7) y *Xho* I (8). / Agarose gel electrophoresis (1%) of amplified DNA of a tomato plant infected with an unknown begomovirus, amplified by rolling-circle and digested with restriction enzymes. The restriction enzymes used for digestion were: *Bam*H I (1), *Eco*R I (2), *Bgl* II (3), *Pst* I (4), *Xba* I (5), *Kpn* I (6), *Pst* I (7) and *Xho* I (8).

La posterior hibridación en condiciones poco restringentes empleando como sonda el gen av1 de *Pepper golden mosaic virus* permitió determinar cuáles fragmentos corresponden a la presencia de moléculas de ADN-A y la hibridación usando como sonda los genes bc1/bv1 del mismo virus permitió determinar cuáles fragmentos corresponden a la presencia de moléculas de ADN-B. De esta forma, se determinó que las enzimas *EcoR* I, *Bgl* II y *Kpn* I cortan en un único sitio al ADN-A (Figura 1, carriles 2, 3 y 6, respectivamente) (fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb) y no al ADN-B (ADN sin digerir).

Una gran ventaja del empleo de la amplificación por círculo rodante es que permite la clonación de los genomas virales íntegros a partir de pequeñas cantidades de ADN de la planta originalmente infectada, de forma similar a lo realizado por Haible *et al.* (2) e Inoue-Nagata *et al.* (3). La ACR permitió la identificación de dos virus que constituyen nuevas especies en el género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*. Un virus es considerado una nueva especie dentro de este género si el porcentaje de identidad (determinado con el programa CLUSTAL V) con las especies ya informadas es menor que un 88%, según los criterios para la demarcación de las especies en la familia *Geminiviridae* (9). A uno de estos nuevos begomovirus se le propuso el nombre de virus del amarillamiento y deformación de la hoja del tomate (*Tomato yellow leaf distortion virus*, ToYLDV), teniendo en consideración los cuatro principales descriptores propuestos para la nomenclatura de especies de begomovirus (9). Este virus se detectó infectando plantas de tomate y presenta el mayor porcentaje de identidad (83,9%) con *Wissadula golden mosaic St Thomas virus* (10), virus encontrado en Jamaica infectando plantas de *Wissadula amplissima* L. (11). El otro virus se detectó infectando plantas de tabaco y pimiento proponiéndosele el nombre de virus del encrespamiento amarillo del tabaco (*Tobacco yellow crinkle virus*, TbYCV) y tiene el mayor porcentaje de identidad (81,9%) con *Cabbage leaf curl Jamaica virus* -[Jamaica:DouglasCastle:2005] (12). Ambos virus mostraron una organización genómica similar a la de otros geminivirus bipartitos y las secuencias de sus genomas A fueron depositados en el GenBank (FJ174698 para el virus aislado de tomate, FJ213931 para el virus identificado infectando tabaco y FJ222587 para el aislamiento proveniente de pimiento) (10, 12).

Ensayos de infectividad

A partir del ADN amplificado por círculo rodante de una planta de tomate, una de tabaco y una de pimiento, originalmente infectadas con los nuevos vi-

rus encontrados, se realizó el bombardeo en plantas de *N. benthamiana*, planta indicadora utilizada comúnmente para la reproducción de síntomas virales en condiciones controladas. Los síntomas desarrollados se muestran en la Figura 2 y la presencia de virus se comprobó por reacción en cadena de la polimerasa (resultado no mostrado). Los síntomas fueron más severos en las plantas bombardeadas con el ACR a partir de plantas de pimiento infectadas con TbYCV (Fig. 2B), que en las bombardeadas con el ADN proveniente de la ACR de plantas de tabaco infectadas con el mismo virus (Fig. 2C). Esta diferencia en los síntomas puede estar dada por la presencia en uno de los hospedantes originales, de moléculas defectivas derivadas del genoma viral, que modulen la severidad de los síntomas. Estas moléculas son de aproximadamente la mitad de talla de la molécula de la cual se derivan y contienen el origen de replicación y los elementos en *cis* requeridos para la iniciación de la replicación, y a menudo causan alteraciones a la normal progresión de la enfermedad inducida por sus virus "helper", tales como atenuación de los síntomas (13). Choge *et al.* (14) identificaron una molécula defectiva interferente del ADN-B de *South African cassava mosaic virus*, aislado de una planta infectada en el campo. Ndunguru *et al.* (15) caracterizaron una molécula defectiva del ADN-A de *East African cassava mosaic virus*, que produce una potenciación de los síntomas causados por este virus en plantas de *N. benthamiana*.

La identificación de nuevas especies de begomovirus bipartitos infectando cultivos de importancia económica como tomate, pimiento y tabaco, confirma que las infecciones por estos virus durante décadas en el país, interactuando en los agroecosistemas están provocando la evolución de este género viral a través de posibles eventos de recombinación y refuerza la idea de que estas interrelaciones existen fundamentalmente entre las especies presentes en cultivos de interés económico y en malezas. La presencia de nuevos begomovirus infectando plantas de interés económico está en correspondencia con la situación mundial de emergencia de begomovirus (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22).

La ACR facilitó la clonación de begomovirus, partiendo de una cantidad mínima de ADN molde y permitió comprobar la naturaleza monopartita o bipartita de los begomovirus sin la necesidad de contar con datos de secuencia. El bombardeo con el ADN obtenido de la amplificación por círculo rodante permitió determinar la infectividad de las especies virales identificadas, comprobándose de esta forma los postulados de Koch. Estudios posteriores a partir de posi-

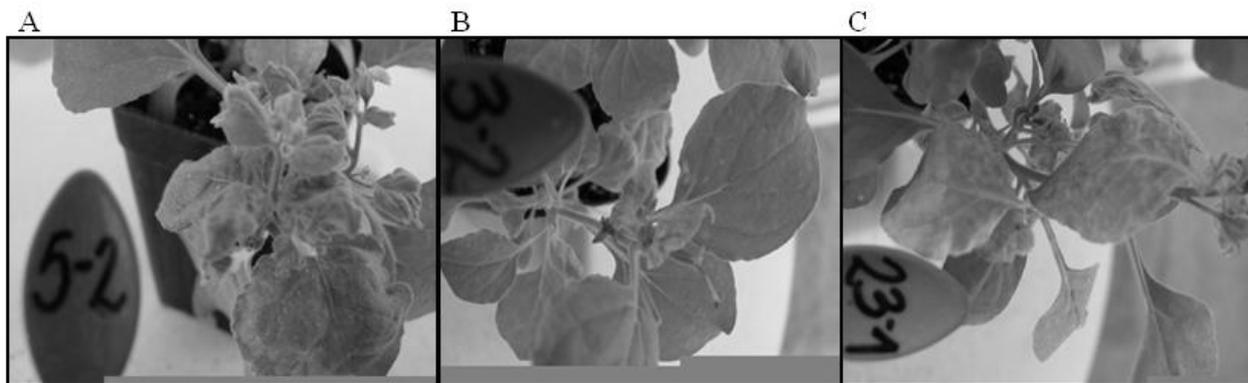


FIGURA 2. Síntomas en plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas por biobalística con el ADN obtenido por la ACR de plantas infectadas con virus encontradas en el campo. El origen del ACR es el siguiente: (A) ACR proveniente de planta de tomate infectada con ToYLDV virus, (B) ACR proveniente de planta de tabaco infectada con TbYCV, (C) ACR proveniente de planta de pimiento infectada con TbYCV. / *Symptoms in **Nicotiana benthamiana** plants biobalistically inoculated using the RCA of plants infected with a begomovirus found in the field. The origin of RCA is as follows: (A) RCA from a tomato plant infected with ToYLDV, (B) RCA from a tobacco plant infected with TbYCV, (C) RCA from a pepper plant infected with TbYCV.*

bles plantas hospedantes asintomáticas utilizando la ACR, permitirán ampliar el conocimiento acerca de la diversidad molecular de este género viral en el país, evitando la necesidad del uso de los cebadores genéricos y la introducción de una tecnología sensible, rápida y fiable para los estudios de caracterización molecular, distribución de geminivirus e interrelaciones de las especies encontradas en los agroecosistemas naturales del país.

AGRADECIMIENTOS

A la Red Latinoamericana de Botánica por la beca de perfeccionamiento RLB08-P10 para la MSc. Elvira Fiallo Olivé.

REFERENCIAS

- Morales FJ, Anderson PK. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol.* 2001;146:415-441.
- Haible D, Kober S, Jeske H. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomic of geminiviruses. *J Virol Methods.* 2006;135:9-16.
- Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage Phi29 DNA polymerase. *J Virol Methods.* 2004;116:209-211.
- Potter JL. PCR and DNA Hybridization methods for specific detection and identification of bean-infecting begomoviruses. Tesis para optar por el grado de Master en Ciencia en Patología de Plantas de la Universidad de Wisconsin- Madison. 2001;159 p.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR, Maxwell DP. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 1993;77:340-347.
- Martínez Y, Quiñones M, Fonseca D. National survey of tomato begomovirus in Cuba. *Rev Protección Veg.* 2003;18:168-175.
- Brown JK, Idris, AM, Torres-Jerez I, Banks GK, Wyatt SD. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch Virol.* 2001;146:1-18
- Garzón-Tiznado, JA, Torres-Pacheco I, Ascencio-Ibañez JT, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante, RF. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology.* 1993;83:514-521.

9. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol*. 2008;153:783-821.
10. Fiallo-Olivé E, Rivera-Bustamante RF, Martínez-Zubiaur Y. *Tobacco yellow crinkle virus*, a new bipartite begomovirus infecting tobacco and pepper in Cuba. *Plant Pathology. New Disease Reports* [<http://www.bspp.org.uk/ndr/>]. 2009;Vol.19.
11. Collins AM, Roye ME. Two new bipartite begomoviruses infecting *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Plant Pathology. New Disease Reports* [<http://www.bspp.org.uk/ndr/>]. 2006;Vol. 19
12. Fiallo-Olivé E, Martínez-Zubiaur Y, Rivera-Bustamante RF. *Tomato yellow leaf distortion virus*, a new bipartite begomovirus infecting tomato in Cuba. *Plant Pathology. New Disease Reports* [<http://www.bspp.org.uk/ndr/>]. 2009;Vol.19.
13. Mansoor S, Briddon RW, Zafar Y, Stanley J. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science*. 2003;8:128-34.
14. Choge I, Paximadis M, Rey MEC. A 1389 bp defective molecule associated with South African *cassava mosaic virus* in South Africa. In: *Proceedings of the 3rd International Geminivirus Symposium, Norwich, UK*. 2001.
15. Ndunguru J, Legg JP, Fofana IBF, Aveling TAS, Thompson G, Fauquet, CM. Identification of a defective molecule derived from DNA-A of the bipartite begomovirus of *East African cassava mosaic virus*. *Plant Pathology*. 2006;55:2-10.
16. Amarakoon II, Roye ME, Briddon RW, Bedford ID, Stanley J. Molecular and biological characterization of *Macropodium yellow mosaic virus* from Jamaica. *Plant Pathology*. 2008;57:417-426.
17. Kumar Y, Hallan V, Zaidi AA. Molecular characterization of a distinct bipartite begomovirus species infecting tomato in India. *Virus Genes*. 2008;37:425-431.
18. Wu J, Mugiira RB, Zhou X. *Malvastrum leaf curl Guangdong virus* is a distinct monopartite begomovirus. *Plant Pathology*. 2007;56:771-776.
19. Pietersen G, Idris AM, Krüger K, Brown JK. Characterization of *Tomato curly stunt virus*: a new tomato infecting begomovirus from South Africa. *Plant Pathology*. 2008;57:809-818.
20. Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shaabani M, Varsani A. Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes*. 2009;38:311-319.
21. Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JPT, et al. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*. 2005;54:448-459.
22. Idris AM, Brown JK. Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. *Arch Virol*. 2005;150:1003-1012.

(Recibido 23-3-2009; Aceptado 20-4-2009)