

TRANSLOCACION Y CUANTIFICACION DEL ADN VIRAL DE GEMINIVIRUS ASOCIADOS CON EL MOSAICO AMARILLO DEL TOMATE

Gonzalo Galileo Rivas P.*
Pilar Ramírez**
Douglas Cubillo***
Luko Hilje***

Translocation and quantification of geminiviruses associated with the tomato yellow mosaic disease

ABSTRACT

The geminivirus viral DNA associated with the tomato yellow mosaic disease, were detected throughout the tomato plant one day after inoculation (dai). Viral DNA titers were higher in the foliage and the stem, and very low in the root tip. New leaves became infected rapidly. Nevertheless, symptoms were considerably delayed. Although mild mosaics and foliar distortions were observed at 7 dai, well defined symptoms appeared at 39 dai.

Key Words: Geminivirus, Tomato yellow mosaic disease, Tomatoes, Virus translocation, Costa Rica.

RESUMEN

El ADN viral de los geminivirus asociados con el mosaico amarillo del tomate se detectó en todas las partes de la planta de tomate, desde el primer día después de la inoculación (ddi). La concentración de ADN viral fue mayor en el follaje y tallo, y baja en el meristemo radical (cofia). Las hojas nuevas fueron infectadas rápidamente. Sin embargo, la aparición de síntomas se retardó mucho. Desde los 7 ddi había mosaicos y distorsiones foliares muy leves, y los síntomas bien definidos se presentaron a los 39 ddi.

Palabras claves: Geminivirus, Mosaico amarillo del tomate, Tomate Translocación viral, Costa Rica.

INTRODUCCION

En América Central y el Caribe, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es afectado severamente por geminivirus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hilje y Arboleda 1993). Se ha caracterizado parcialmente uno en Costa Rica (ToYMV) y varios en Guatemala, Honduras y Nicaragua (Nakhla *et al.* 1994, Patel *et al.* 1993, D.P. Maxwell 1995, com. pers.).

Recibido: 05/07/95. Aprobado: 08/08/95.

*CATIE, Cultivos Tropicales, e-mail: grivas@catie.ac.cr. 7170 Turrialba, Costa Rica.

**Universidad de Costa Rica. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), San José, Costa Rica.

***CATIE, Area de Fitoprotección. 7170 Turrialba, Costa Rica.

De ninguno de éstos se ha estudiado su movimiento, distribución y multiplicación dentro de la planta, como se ha hecho para el virus del mosaico africano de la yuca (ACMV) (Fargette *et al.* 1987) y el de la hoja rizada del tomate (TYLCV) (Ber *et al.* 1990, Rom *et al.* 1993, Michelson *et al.* 1994). Lo cual es básico para entender su interacción con el hospedante, así como para su manejo, especialmente por métodos fitogenéticos y agrícolas.

El propósito de este trabajo fue determinar la distribución de geminivirus dentro de la planta de tomate, así como la concentración relativa del ADN viral en varias estructuras vegetativas.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del experimento. Se realizó en un invernadero del CATIE (Turrialba, Costa Rica), así como en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE y en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

Plantas de prueba. Se utilizaron plantas de tomate var. Hayslip, sembradas en macetas plásticas de 12 cm de altura y 16 cm de diámetro. El sustrato fue una mezcla de suelo, granza de arroz y abono orgánico (10:2:1) con 20 g/kg de fertilizante 14-14-14 (N-P-K). Las plantas sanas se inocularon a los 15 días de germinadas (ddg).

Transmisión del virus. Se utilizaron adultos virulíferos de *B. tabaci*, provenientes de una colonia mantenida en el invernadero sobre plantas de tomate infectadas con el mosaico amarillo del tomate. Para garantizar la adquisición de virus, por 48 h se colocaron grupos de tres de estos adultos sobre una planta infectada, dentro de microjaulas plásticas (2,5 cm de altura y 1,5 cm de diámetro). Las microjaulas se adhirieron por 24 h a la hoja 1 (Fig. 3) de las plantas sanas, para inocularlas. Esto se hizo en cinco plantas, tres de las cuales se utilizaron en la prueba de hibridación del ADN viral y el resto se dejó para observar síntomas.

Análisis del vector por PCR. Se utilizó un análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la condición virulífera de los adultos provenientes de la colonia.

Se preparó una extracción cruda de los ácidos nucleicos de cinco adultos, provenientes de la colonia mantenida en los invernaderos, triturándolos con pistilos Kontes en 50 μ l de STE (0,1 M NaCl, 10 mM TrisHclpH8, 1 mM EDTA pH8). Después de clarificarse por centrifugación a 10.000 rpm, 10 μ l del sobrenadante se utilizaron en una reacción de 50 μ l de PCR que contenía 10 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂ y 0,4 unidades de la Taq Polimerasa.

Se utilizaron "imprimadores" degenerados, que hibridan con secuencias de la subunidad A de la mayoría de los geminivirus transmitidos por

B. tabaci: PALIV 1979 (hibrida dentro de la secuencia complementaria del gen AL1) y PARIC 503 (hibrida dentro de la secuencia viral AR1). La sonda fue donada por el Dr. Douglas P. Maxwell (Universidad de Wisconsin-Madison). En presencia de ADN viral, los "imprimadores" amplifican un fragmento de 1018 pb. La secuencia de éstos es la siguiente: PALIV 1979 5'GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3' y PARIC 503 5'CATGCTGCAGTACATYGGCCTYTTDACC3' Los nucleótidos en las posiciones degeneradas están representados por una simple letra del código de ambigüedad IUPAC: D::A,G,T; H::A,C,T; K::G,T; M::A,C; N::A,C,G,T; R::A,G; W::A,T; Y::C,T.

Toma de muestras. Se muestreó a los 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 días después de inocular (ddi). En cada fecha se tomaron del centro de las hojas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, dos discos de 5 mm de diámetro y 0,026 g, en promedio; según su aparición, el número de cada hoja varió en cada fecha (Fig. 3). En el tallo, se cortaron dos porciones, a nivel inferior, medio y superior, cada una de 0,01 g. De la raíz se corta una muestra de la cofia, de 0,01 g.

Preparación de la muestra. El material se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml, a los que se agregó 135 μ l de 10X SSC (500 ml 20XSSC/l) como amortiguador de extracción (Abad y Moyer 1992). Se maceró con pistilos Kontes. Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 1 min. Del sobrenadante se tomaron 3 μ l y se colocaron sobre la cuadrícula respectiva de una membrana de nylon (PhotoGene[®]), humedecida previamente en 10X SSC durante 5 min. Las membranas se secaron a temperatura ambiente sobre papel 3 MM por 15 min. Al secarse, se hornearon al vacío a 80°C durante 45 min, y luego se almacenaron en un desecador, para la hibridación.

Condiciones de hibridación. La prehibridación se realizó durante dos h a 42°C en 250 μ l/cm² de una solución que contenía 50% (v/v) de formamida, 6X SSPE (0,06 M NaH₂PO₄.H₂O, 0,9 M NaCl, 0,06 M Na₂EDTA.2H₂O), 5X Denhard's (Ficoll 0,1% (p/v) + PVP 0,1% (p/v) + albúmina de suero de bovino BSA 0,1% (p/v)), 0,5% Sarcosyl y 200 μ g/ml de ADN esperma desnaturalizado de salmón.

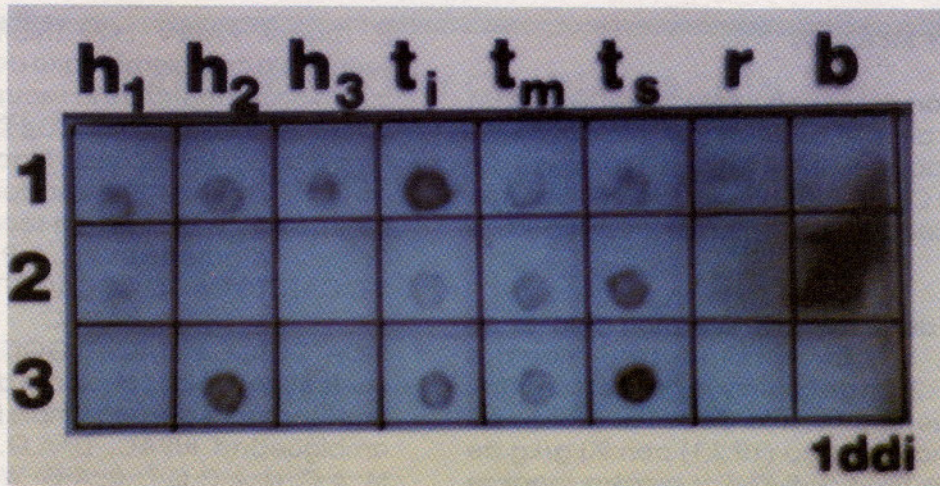


Fig. 1. Detección del geminivirus un día después de inocular, en las hojas (h₁-h₃), tallo (ts: superior, tm: medio, ti: inferior) y raíz (r) de la planta de tomate, en comparación con el amortiguador (b). 1, 2 y 3 son las repeticiones (Foto: G.G. Rivas y F. Solano).

La hibridación se realizó durante 18 h a 42°C en una solución de hibridación (50% (v/v) de formamida, 6X SSPE, 5X Denhard's, 20% Sarcosyl, 400 µg/ml ADN de esperma desnaturalizado de salmón y la sonda biotinilada Virus Chino del Tomate (CaTV) a razón de 100 a 150 ng.

Las membranas se lavaron a 65°C en una solución 5X SSC y a 50°C en 0,1X SSC. Se mantuvieron a 65°C por 1 h en una solución bloqueadora (3% BSA en TBS-Tween 0,75 ml/cm², pH 7,5). Se añadió el conjugado de estreptavidina fosfatasa alcalina SA-AP (7 µl/100 cm²) y se lavó con la solución Final Wash PhotoGene^R (1 ml/cm², 1:10) durante 1 h.

Detección de la hibridación. Se utilizó 0,01 ml/cm² del reactivo de detección (4-metoxi-4-(3-fosfatofenil) espiro [1,2, dioxietano-3,2'-adamantano]) en 0,75 M de 2-amino-2-metil-1-propanol y activadores. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h en un cuarto oscuro. Se utilizó la película Kodak^R T-Mat G. El tiempo de exposición varió de 30 min a 6 h.

Análisis de la película de diagnóstico. La cantidad de ADN viral en cada muestra se estimó a través de un densitómetro con el software Image 1.10 h (Versión 2 para McIntosh).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis del vector por PCR. La reacción de PCR amplificó moléculas de ADN de un peso molecular de 1018 pb. Estas moléculas resultaron positivas cuando se sometieron a la hibridación molecular con una sonda general que reconoce geminivirus. Es decir, los adultos de *B. tabaci* utilizados en el experimento eran virulíferos.

Distribución del ADN viral en la planta. Los geminivirus se detectaron desde el primer día después de la inoculación, en todas las partes de la planta (Figs. 1, 3) lo cual demuestra su capacidad de translocación. Estos resultados coinciden con Michelson *et al.* (1994), quienes detectaron alTYLCV a los 2 ddi, en un experimento análogo.

Hubo diferencias ($p < 0,05$) en la cantidad de ADN viral detectada a través del tiempo. Su concentración difirió ($p < 0,05$) en cada parte vegetativa (Fig. 2), resultando mayor en el follaje y tallo. La hoja 1 (punto de inoculación) presentó una tendencia casi constante desde el 2 ddi, con 130-150 unidades de densidad (UD). En las hojas 2 y 3 (su posición varió durante el experimento), así como en las tres partes del tallo, hubo altibajos. Esto quizás se debió a un error operativo, ya que en la película de diagnóstico aparecieron áreas sombreadas, que interfirieron con la lectura en el densitómetro. La raíz mostró menor acumulación de ADN viral hasta el 10 ddi, cuando tuvo un pico

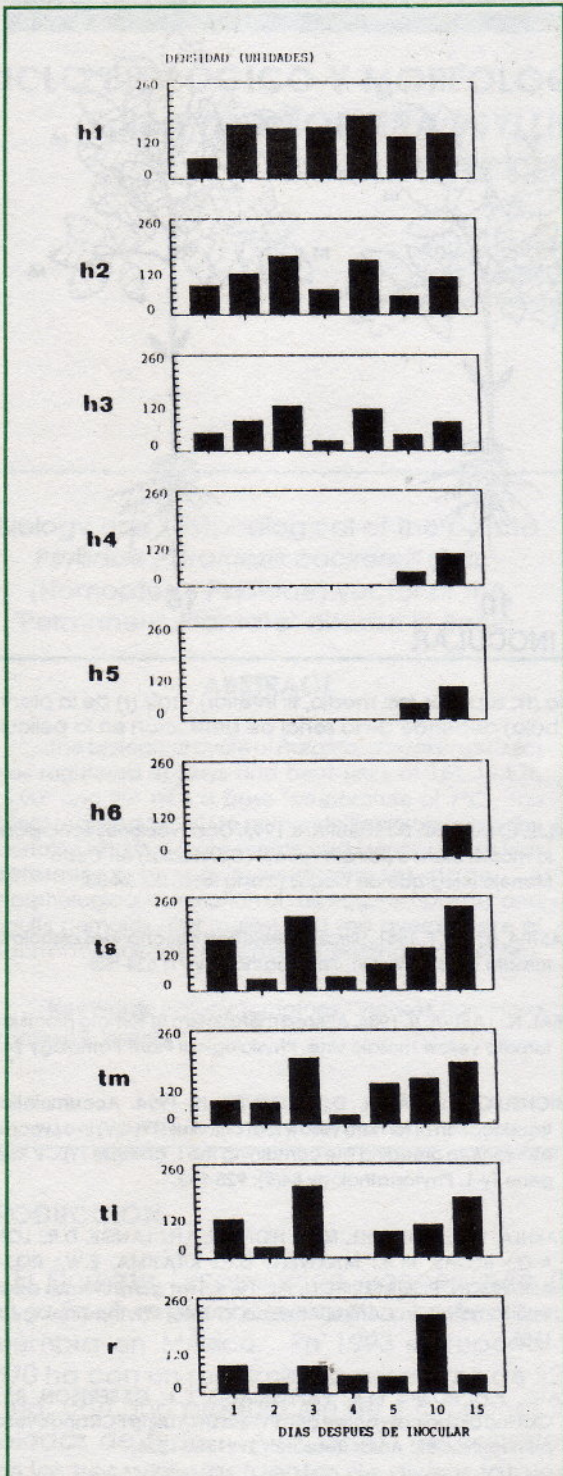


Fig. 2. Cuantificación del ADN viral en las hojas (h1-h6), tallo (ts: superior, tm: medio, ti: inferior) y raíz (r) de la planta de tomate. La altura de la barra es proporcional a la señal de hibridación. El número de cada hoja varió en cada fecha, según su aparición.

alto (Fig. 2); a los 15 ddi descendió marcadamente, pero en esta fecha se hizo solo una lectura, por el exceso de sombra en la película de diagnóstico.

Los geminivirus, después de inoculados, se desplazan por el floema (Lastra y Gil 1981). Esto explica que los aquí analizados descendieran al tallo, donde alcanzaron concentraciones superiores a las del follaje, para llegar luego a otras hojas (Figs. 2 y 3). Sin embargo, el meristemo radical (cofia) casi nunca mostró altas concentraciones, lo cual podría obedecer a que en él no hay reproducción del virus (Ber *et al.* 1990), sino solamente transporte hacia las partes superiores de la planta. Conforme brotaron hojas nuevas, fueron infectadas rápidamente (Figs. 2, 3). En las hojas con mayor concentración de ADN viral a los 5 ddi, a los 10 ddi ésta disminuyó, lo cual sugiere que existe un gradiente de replicación y transporte en la planta, que permite a los virus desplazarse hacia los tejidos nuevos (Ber *et al.* 1990). Este patrón de distribución coincide con el del TYLCV (Ber *et al.* 1990, Michelson *et al.* 1994).

A pesar de la rápida distribución de los virus en la planta, la aparición de síntomas se retardó bastante. Estos (clorosis, encrespamiento y reducción del follaje) resultan de la disminución de la fotosíntesis, el incremento en la respiración celular, y la reducción en el contenido de clorofila, proteínas y nitrógeno (Leal y Lastra 1984). Desde los 7 ddi había mosaicos y distorsiones foliares casi imperceptibles. Los síntomas bien definidos y fácilmente detectables se presentaron a los 39 ddi, en 20 plantas trasladadas al campo. Este dato se aproxima bastante a lo que sucede en los campos agrícolas, donde los síntomas comúnmente se perciben a los 38-43 días desde la germinación (Hilje *et al.* 1993).

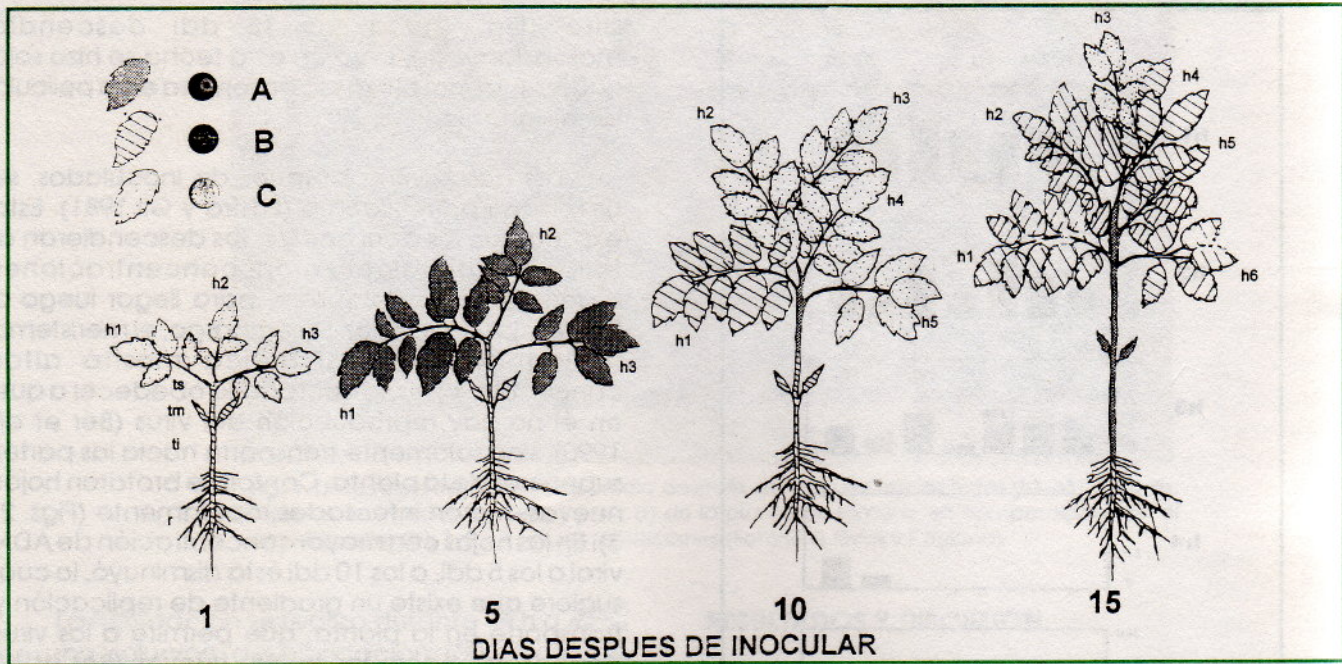


Fig. 3. Distribución del ADN viral del geminivirus en las hojas (h1-h6), tallo (ts: superior, tm: medio, ti: inferior) y raíz (r) de la planta de tomate. La escala de la concentración del virus (A: alta, B: media, C: baja) depende de la señal de detección en la película de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

A Alfonso Chacón, Guido Sanabria, Mario Padilla, Osvaldo Pérez y Pilar Suazo su colaboración. A los doctores Judy K. Brown (University of Arizona, Tucson) y Douglas P. Maxwell (Universidad de Wisconsin-Madison), las sondas del virus Chino del Tomate y de geminivirus, respectivamente. A Ana Loaiza, los dibujos de las plantas.

REFERENCIAS

ABAD, J.A.; MOYER, J.W. 1992. Detection and distribution of sweetpotato feathery mottle virus in sweetpotato by in vitro-transcribed RNA probes (riboprobes), membrane immunobinding assay, and direct blotting. *Phytopathology* 82: 300-305.

BER, R.; NAVOT, N.; ZAMIR, D.; ANTIGNUS, Y.; COHEN, S.; CZOSNEK, H. 1990. Infection of tomato by the tomato yellow leaf curl virus: Susceptibility to infection, symptom development, and accumulation of viral DNA. *Arch. Virol.* 112: 169-180.

FARGETTE, D.; THOUVENEL, J.C.; FAUQUET, C. 1987. Virus content leaves of cassava infected by African cassava mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 110: 65-73.

HILJE, L.; ARBOLEDA, O. (eds.). 1993. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No.205. 66 p.

HILJE, L.; CUBILLO, D.; SEGURA, L. 1993. Observaciones ecológicas sobre la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 30: 24-30.

LASTRA, R.; GIL, F. 1981. Ultrastructural host cell changes associated with tomato yellow mosaic. *Phytopathology* 71: 524-528.

LEAL, N.; LASTRA, R. 1984. Altered metabolism of tomato plants infected tomato yellow mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* 24: 1-7.

MICHELSON, I.; ZAMIR, D.; CZOSNEK, H. 1994. Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene Ty-1. *Phytopathology* 84(9): 928-933.

NAKHLA, M.K.; MAXWELL, M.D.; HIDAYAT, S.H.; LANGE, D.R.; LONIELLO, A.O.; ROJAS, M.R.; MAXWELL, D.P.; KITAJIMA, E.W.; ROJAS, A.; ANDERSON, P.; GILBERSTON, R.L. 1994. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. (Abstr.) *Phytopathology* 84 (10): 1155.

PATEL, P.P.; ROJAS, M.R.; PAPLOMATAS, E.J.; GILBERTSON, R.L. 1993. Cloning biologically active geminivirus DNA using PCR and overlapping primers. *Nucleic Acids Research* 21: 1325-1326.

ROM, M.; ANTIGNUS, Y.; GIDONI, D.; PILOWSKY, M.; COHEN, S. 1993. Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Dis.* 77: 253-257.