

## APLICACION DE TECNICAS MOLECULARES E INMUNOENZIMATICAS EN EL ESTUDIO Y DIAGNOSTICO DE VIRUS FITOPATOGENOS

Gonzalo Galileo Rivas-Platero\*

**Summary** This paper describe the virology experiences in CATIE during 1993-1995. In first place shows the major results in geminiviruses diagnostic using the nucleic acid spot hybridization (NASH) in tomatoes plants and the quantification and distribution DNA-viral into tomato plant. Also presents the plant virus diagnostic in several wild plant species, tomato and pepper with NASH or ELISA tests.

### Introducción

El clonaje molecular de fragmentos de ADN en plásmidos ha permitido conocer la secuencia del genoma de muchos virus. Una vez conocida esta secuencia o organización del genoma viral se puede utilizar la capacidad de hibridación del ADN complementario o de clones de ADN con fines de detección y diagnóstico, a través de sondas marcadas por métodos enzimáticos o radiactivos (2,3).

El uso y aplicación de técnicas moleculares en el área de virología vegetal persigue diferentes objetivos: simplificar los métodos de detección e identificación de grupos virales y manipular genéticamente a las especies vegetales mediante su transformación con genes virales que interfieran posteriormente en los procesos de infección de los mismos virus en condiciones naturales (2).

En el CATIE se ha utilizado la hibridación del ADN viral para detectar geminivirus en tomate, chile y plantas silvestres (4,5). Asimismo se ha cuantificado y determinado la distribución del ADN viral de geminivirus asociados con el mosaico amarillo del tomate dentro de la planta tomate; usando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se ha establecido la condición virulífera del vector *Bemisia tabaci* mediante la amplificación del ADN viral (6). Con las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) se ha logrado realizar diferentes diagnósticos de virus que afectan al tomate, chile dulce y tabaco.

Este documento describe los principales resultados obtenidos en la investigación de geminivirus en tomate, los diagnósticos realizados en plantas silvestres y muestra la importancia del área de virología como una herramienta en el manejo integrado de plagas.

### Materiales y Métodos

*Distribución del ADN viral de geminivirus dentro de la planta de tomate.*

**1- Plantas de prueba.** Plantas de tomate var. Hayslip sembradas en maceteros plásticos 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). Las plantas sanas se inocularon a los 15 días de germinadas.

**2- Transmisión del virus.** En plantas infectadas con el geminivirus, en el invernadero, durante 48 h se colocaron tres adultos de *B. tabaci* por hoja, dentro de una microjaula plástica para que adquirieran el virus. Posteriormente el período de transmisión fue de 24 h.

**3- Hibridación del ADN viral.** La hibridación del ADN viral de geminivirus asociados al tomate se realizó utilizando la metodología descrita por (4). Las plantas analizadas fueron seccionadas en porciones distribuidas en el follaje, tallo y raíz. La cantidad de ADN viral en cada muestra se estimó a través de un densitómetro con el software Image v. 1.1 para McIntosh (6).

*Diagnóstico de virus en plantas silvestres asociadas con los cultivos de tomate y chile dulce.*

**1- Lugares de muestreo:** Tacares (Grecia, Alajuela), Estación Exp. Fabio Baudrit (La Garita, Alajuela) y Guayabo (Turrialba, Cartago).

**2- Muestras:** plantas con síntomas o asintomáticas pero con adultos de *B. tabaci*.

**3- Hibridación del ADN viral.** Según metodología descrita por (4).

**4- Pruebas ELISA.** Según metodología descrita por (1). Se utilizaron los kit AGDIA para el PMMV, PVX, PVY, TEV, TMV y ToMV

## **Resultados y Discusión**

**Detección de geminivirus en tomate.** El uso de la técnica NASH con sondas no radiactivas ha permitido detectar satisfactoriamente geminivirus que afectan las principal zona productora de tomate en Costa Rica: Tacares de Grecia y Sarchí de Valverde Vega en Alajuela (4). Asimismo se ha demostrado la factibilidad y confiabilidad del método ya que con pocos  $\mu$ l de muestra el diagnóstico es posible; por otro lado se ha evitado el riesgo de usar marcadores radiactivos que son difíciles de manipular, de alto costo y ofrecen problemas en su eliminación.

**Análisis de *B. tabaci* por PCR.** La reacción de PCR permitió amplificar moléculas de ADN (PM=1018 pb). Dichas moléculas resultaron positivas cuando se hibridaron con una sonda general que reconoce geminivirus. Así se determinó que los adultos de *B. tabaci* utilizados en el experimento eran virulíferos.

**Distribución del ADN viral en la planta de tomate.** Se demostró la alta capacidad de translocación de los geminivirus al detectarlos desde el primer día después de la inoculación en todas las partes de la planta. Existieron diferencias ( $p < 0.05$ ) a través del tiempo en la cantidad de ADN viral; su concentración difirió ( $p < 0.05$ ) en cada parte vegetativa, resultando mayor en el follaje (6).

**Diagnóstico de virus en plantas silvestres asociadas con los cultivos de tomate y chile dulce.** Se muestrearon 18 especies silvestres, de éstas en 14 se detectaron cinco de los siete virus analizados: PMMV, PVX, PVY, TMV y al menos un geminivirus (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Virus presentes (+) en plantas silvestres asociadas con el tomate y chile dulce en las localidades muestreadas. Costa Rica.**

<b>Especie</b>	<b>PMMV</b>	<b>PVX</b>	<b>PVY</b>	<b>TEV</b>	<b>ToMV</b>	<b>TMV</b>	<b>GV</b>
<i>Bidens pilosa</i>	+	-	-	-	-	+	-
<i>Browalia americana</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Conyza sp.</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Desmodium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Galisonga sp.</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Ipomoea sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lantana sp.</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Melampodium sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-
<i>Momordica sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phenax sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Richardia scabra</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>R. scabra</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Scopania dulcis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sida rhombifolia</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Spananthe paniculata</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spermacoce laevis</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. laevis</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. latifolia</i>	-	-	-	-	-	-	+

**Diagnóstico de virus en chile dulce.** En la zona de Pérez Zeledón, se han detectado en chile dulce al PMMV, PVX y TMV; de acuerdo a las pruebas de diagnóstico el virus más prevalente en la zona es el PMMV.

Actualmente se adelantan experimentos para evaluar la cantidad acumulada de ADN viral en diferentes genotipos de tomate del Banco de Germoplasma del CATIE y con ello se pretenden establecer niveles de tolerancia hacia geminivirus.

#### Literatura Citada

1. CONVERSE, R.H.; MARTIN, R.R 1990. ELISA methods for plant viruses. In Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. USA. APS-Press. p:179-196.
2. MORALES F. 1988. Aplicación de técnicas moleculares al estudio y control de virus fitopatógenos. Fitopatología Colombiana 2:342-343.
3. QUERCI, M. 1993. Molecular characterization of potato virus X: Development of detection probes and identification of the resistance-breaking capacity of strain HB. Thesis Wageningen. 133p.
4. RIVAS PLATERO, G.G; LASTRA, R. 1993. Detección no radiactiva de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 30:7-10.
5. RIVAS PLATERO, G.G; RAMIREZ, P.; CUBILLO, D.; HILJE, L. 1995. Detección de virus en plantas silvestres asociadas con el tomate y chile dulce en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 38 (en prensa).
6. RIVAS PLATERO, G.G; RAMIREZ, P.; CUBILLO, D.; HILJE, L. 1995. Translocación y cuantificación del ADN-viral de geminivirus asociados con el mosaico amarillo del tomate. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 38 (en prensa).