

COMUNICACIÓN CORTA

**Diversidad molecular de begomovirus en el cultivo del pimiento
(*Capsicum annuum* L.) en Cuba¹**

**Madelaine Quiñones Pantoja^I, Gloria Castillo Urquiza^{II}, Poliane Alfenas Zerbini^{II},
Francisco Murilo Zerbini^{II}**

^ILaboratorio de Virología Vegetal y Molecular. División de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apdo 10, San José de Las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: madeqp@censa.edu.cu.

^{II}Laboratorio de Virología Vegetal y Molecular. Instituto BIOAGRO. Universidad Federal de Viçosa (UFV), Av. P H Rolfs, s/n - Campus Universitario Viçosa - MG, 36570-000, Brasil.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad molecular de begomovirus asociados al cultivo del pimiento en Cuba. Para ello, en el periodo 2006- 2010 se realizó una prospección de begomovirus en las principales áreas de producción de pimiento en Cuba. Se colectaron 600 muestras foliares de plantas que mostraron síntomas típicos de enfermedades virales y de estas se seleccionaron al azar 50 por región para su evaluación. El ADN total extraído se evaluó mediante una PCR con cebadores universales a begomovirus (Palv1978/PARc496). A partir de muestras positivas se amplificó su ADN genómico circular completo mediante la amplificación en círculo rodante. Los productos se caracterizaron mediante análisis de restricción, utilizando las enzimas *Sac I*, *BamH I*, *Hind III*, *Cla I*, *Kpn I*, *Sal I*, *Pst I*. Se detectó infección por begomovirus en el 100% de las muestras evaluadas mediante PCR con cebadores universales, sugiriendo la presencia de estos virus en áreas de este cultivo de las tres regiones del país. Los enzimas *Sac I*, *BamH I*, *Sal I* y *Pst I* produjeron un corte en sitios únicos en los ADN circulares obtenidos, liberando un único fragmento lineal de la talla esperada (2.6-2.7 Kb) en estas muestras. Los resultados obtenidos muestran la posible presencia de diferentes especies de begomovirus circulando en el cultivo, la ocurrencia de recombinantes virales de los informados previamente o la presencia de los dos componentes genómicos en estas muestras. Se evidenció diversidad molecular de estas especies en el cultivo del pimiento en Cuba.

Palabras clave: begomovirus, PCR, Amplificación en Círculo Rodante, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, diversidad molecular.

Molecular diversity of begomoviruses in the pepper crop in Cuba

ABSTRACT: The main areas for pepper production in Cuba were surveyed during 2006-2010 to determine the molecular diversity of the begomoviruses in this crop. Six hundred leaf samples with typical symptoms of viral diseases were collected, and from them, 50 samples per region were randomly selected for their evaluation. The total DNA extracted from each sample was previously tested by conventional PCR using begomovirus universal primers (Palv 1978/PARc496). The positive samples were used as a template for the full-length circular genome amplification by Rolling Circle Amplification. The amplified products were characterized by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) with the enzymes *Sac I*, *BamH I*, *Hind III*, *Cla I*, *Kpn I*, *Sal I*, *Pst I*. Begomovirus infection was detected in 100% of the samples evaluated by conventional PCR, suggesting the presence of these viruses in all the regions of the country. The enzymes *Sac I*, *BamH I*,

¹ Investigación financiada por la agencia Brasileira CAPES (Brasil), en el marco del proyecto de investigación CAPES/MES- Cuba 030/-07 y apoyada por el proyecto 00300281 del PNCT de Biotecnología Agropecuaria (Cuba).

Sal I and *Pst I* produced unique cuts in unique sites in the isolated genomes liberating a unique fragment with the expected length (2.6-2,7kb), and detecting four polymorphic profiles in these samples. The obtained results show the possible presence of different begomovirus species circulating in the crop, the occurrence of viral recombinants of previously informed or the presence of the two viral components in these samples. These results could also be associated with the presence of the two viral components in these samples. It was made evident the molecular diversity in these species of begomovirus in the pepper crop in Cuba.

Key words: begomovirus, PCR, Rolling Circle Amplification, restriction fragment length polymorphism analysis, molecular diversity.

En Cuba, el pimiento (*Capsicum annum* L.) ocupa un área cultivada de 2000 ha, con una producción anual de unas 20 000 toneladas. La presencia de plagas, entre las que sobresalen las enfermedades virales, constituye uno de los factores limitantes de la producción, donde se producen importantes mermas en los rendimientos (1).

En la actualidad, los begomovirus (familia *Geminiviridae*) transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), son considerados como el principal problema fitosanitario que azota a cultivos hortícolas, en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (2). Estos poseen un genoma bipartito de ADN circular de cadena sencilla, cuyos componentes son aproximadamente de 2,6-2,7kb. Dentro de este género se incluyen virus con uno y dos componentes genómicos, donde se localizan los genes esenciales para la realización de las funciones biológicas (3).

Durante los últimos años, muchos begomovirus emergieron en el continente americano, afectando tomate, pimiento y otros cultivos de importancia económica, como granos y cucurbitáceas (4), ocasionando frecuentemente pérdidas totales en la producción de estos. Informes a escala internacional, abordaron la presencia e identificación de diversas especies de esta familia en el cultivo del pimiento (3,4,5,6).

En Cuba, Quiñones *et al.* (7) realizaron un estudio de prospección e informaron la distribución de begomovirus en las principales áreas productivas de esta hortaliza en el país, con porcentajes de infección por encima del 20% en las regiones visitadas. Trabajos anteriores informaron de la presencia del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (AJ223505) (8) y dos nuevos begomovirus bipartitos en este cultivo. Uno de estos con una similitud del 93% con *Cabbage leaf curl virus* (U65529), en la secuencia parcial del componente A (9) y el *Tobacco yellow crinkle virus* (10), el cual se detectó también infectando plantas de tabaco.

Teniendo en cuenta que los begomovirus están considerados entre las familias virales de mayor emer-

gencia y re emergencia, así como el impacto que ocasiona la incidencia de estos en cultivos de importancia económica, el objetivo del presente trabajo fue determinar la diversidad molecular de los begomovirus asociados al cultivo del pimiento en Cuba, como punto de partida, para el reforzamiento de las medidas del manejo integrado del cultivo en el país, así como para el apoyo a la obtención de cultivares resistentes a estas entidades virales.

Durante los años 2006 al 2010 se realizó una prospección en las principales áreas de producción de pimiento en el país, que abarcó las regiones Oriental (Granma, Holguín, Santiago), Central (Villa Clara y Matanzas) y Occidental (Mayabeque y La Habana). Se colectaron muestras de 600 plantas que mostraban síntomas típicos de una infección viral: enanismo de las plantas, fuertes clorosis y encrespamiento de las hojas, de las que se seleccionaron al azar 50 por región. De estas plantas se tomaron 0,125g de material foliar que se utilizó para obtener el ADN genómico mediante el protocolo descrito por Accotto *et al.* (11).

El ADN obtenido de cada muestra se analizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores genéricos (Palv1978/PARc496) (12), los que amplifican un fragmento de aproximadamente 1,4 Kb, que contiene la región intergénica, el fragmento correspondiente al extremo 5' terminal del gen *rep* y el fragmento 5' terminal del gen *cp* que codifica para la proteína de la Capsida viral de los begomovirus. Para esto, las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 ml, se utilizó 1U de TaqADN Polimerasa en la solución amortiguadora A (Promega), suplementado con 200 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ (Promega), 0,4 mM de cada cebador y 1 µl (equivalente a 100ng) del ADN.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf Inc.). El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguida por 29 ciclos de reacción (1min a 94°C de desnaturalización, 1min a 55°C

de anillamiento de los cebadores y 1min a 72°C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min (72°C.) Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa (0,8%) preparados en solución del TBE de acuerdo al procedimiento descrito (7). Se utilizó un marcador de 1Kb (GIBCO) como patrón de peso molecular. Como controles positivos se utilizaron plantas de pimiento infectadas por TYLCV, aislado previamente en Cuba, mientras que el control negativo correspondió a las muestras de ADN de plantas de pimiento sanas, que eran mantenidas en condiciones controladas.

Como resultado se obtuvo la amplificación de la banda de la talla esperada en varias de las muestras analizadas (resultado no mostrado), así como en el control positivo utilizado. En el caso del control negativo, no se observó la presencia de esta banda. Estos resultados coinciden con lo esperado, y corroboraron la utilidad de estos cebadores y las condiciones de la reacción para la detección genérica de begomovirus, tal y como expusieron otros autores (12,13).

El ADN de las plantas que resultaron positivas a la infección por begomovirus, sirvió de molde para la amplificación isotérmica del genoma de ADN de simple cadena circular, mediante la variante isotérmica de Amplificación en Circulo Rodante (ACR). Para esto se utilizó el juego de reactivos TempliPhi™ 100 Amplification kit (GE Healthcare, UK) según las instrucciones descritas por la casa comercial. Para la realización de la reacción se mezclaron en un tubo 5 µl del tampón muestra y 1 µl de ADN molde y a continuación la mezcla se sometió a una breve desnaturalización a 95°C durante de 3 minutos.

Posteriormente fueron añadidos 5 µl del tampón de reacción y 0,2 µl del enzima *f29*ADN Polimerasa (1µl) contenida en el kit, incubados a 30°C durante 20 horas, e inactivada la reacción a 68°C durante 10 minutos. Como control positivo se utilizó una planta de pimiento infectada por el TYLCV, mientras que el control negativo correspondió a plantas de pimiento sanas. Los productos de la ACR se analizaron en geles de agarosa al 1% preparados en solución del TBE de acuerdo al procedimiento descrito (14). Se utilizó como patrón de peso molecular el marcador de 1Kb (GIBCO).

En las muestras que resultaron positivas el ADN amplificado se visualizó en el gel como una simple y única banda de alto peso molecular mayor de 20.000kb (Figura 1), por el contrario no se observó la presencia de esta banda en el control negativo. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por otros autores (10,15), señalando la factibilidad de esta metodología para la amplificación de genomas circulares y en este caso específico el de los begomovirus que están constituidos por dos componentes genómicos de ADN circulares, de los cuales anteriormente resultaba muy trabajoso obtener su genoma para su rápida identificación y caracterización.

Los concatémeros genómicos o ADNs genómicos circulares amplificados se digirieron mediante el método de RFLP (15) con las endonucleasas de restricción *Sac I*, *BamH I*, *Hind III*, *Cla I*, *Kpn I*, *Sal I*, *Pst I*; para generar moléculas de ADN genómico lineales, lo cual permite la posterior clonación del genoma completo del virus (10,14,15). Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 0,8% (Figura 2) preparados según condiciones descritas anteriormente (7).

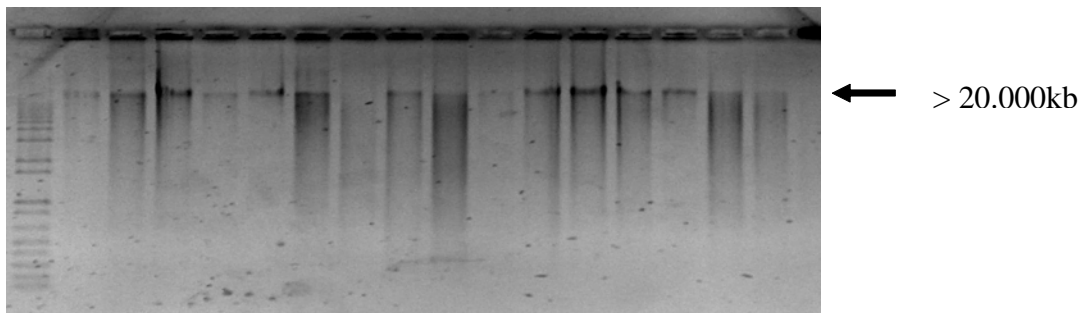


FIGURA 1. Amplificación representativa de genomas de ADN circular obtenidos mediante ACR, a partir de plantas de pimiento infectadas con begomovirus. **Carril 1:** Marcador de peso Molecular 1 Kb (GIBCO). **Carril 2:** Control positivo. **Carriles 3-16:** muestras infectadas con begomovirus. **Carriles 17 y 18:** control negativo. / *Representative amplification of circular DNA genomes by RCA from peppers plants infected with begomoviruses. Lane 1: Ladder 1kb (GIBCO). Lane 2: positive control. Lanes 3-16 infected samples with begomoviruses. Lanes 17 and 18: negative control.*

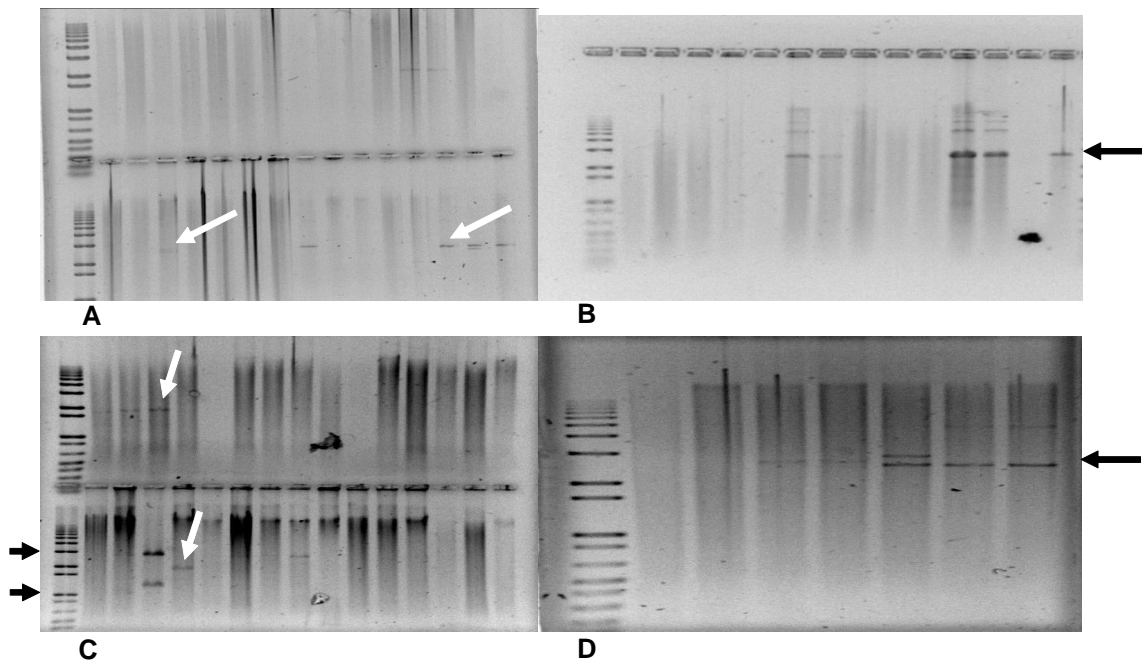


FIGURA 2. Perfiles polimórficos representativos detectados mediante RFLP a los amplicones productos de la ACR. **A.** ADN genómicos circulares digeridos con *Sac* I. **B.** ADN genómicos circulares digeridos con *Bamh* I. **C.** ADN genómicos circulares digeridos con *Sal* I. **D.** ADN genómicos circulares digeridos con *Pst* I. **Carriles 1:** Marcador de peso molecular 1 Kb (GIBCO). El Resto de los carriles corresponden a los amplicones digeridos con las enzimas de restricción. / *Representative polymorphism profiles detected by RFLP of the amplicons obtained with the RCA. A. DNA circular genomic excised by Sac I. B. DNA circular genomic excised by Bamh I. C. DNA circular genomic excised by Sal I. D. DNA circular genomic excised by Pst I. Lane 1: Ladder 1Kb (GIBCO). Others lanes corresponded to excised amplicons with restriction enzymes.*

El análisis de los gels revelaron que las enzimas *Sac* I (Fig. 2A), *Bamh* I (Fig. 2B), *Sal* I (Fig. 2C) y *Pst* I (Fig. 2D) generaron fragmentos lineales de ADN correspondientes al genoma de los begomovirus de la talla esperada entre 2,6-2,7 kb, lo cual mostró la presencia patrones polimórficos diferenciales en los aislados analizados. Por otra parte, la digestión con las enzimas *Hind*III, *CLa*I, *Kpn*I, produjo fragmentos lineales pero no de esta longitud y en muchas muestras, se obtuvo más de un fragmento con estos cortes (Fig. 2C y D). Los fragmentos de menor tamaño obtenidos aquí pudieran estar relacionados con la presencia de mas de un sitio de corte por estas enzimas, en los genomas presentes o a la presencia de ADNs satélites asociados frecuentemente a las infecciones por begomovirus (13).

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que las infecciones por begomovirus en el cultivo del pimiento en Cuba son frecuentes. Esta situación es similar a la acontecida en muchos países del área centroamericana y caribeña, así como en regiones productoras de México y el suroeste de los Estados Unidos (3,4).

Tal como se observa, aun luego de la digestión enzimática de los ADN circulares amplificados, una banda de alto peso molecular queda sin digerir. Estos resultados confirman los obtenidos por varios autores que señalaron que esto puede estar relacionado con la presencia de otro genoma begomoviral u otro componente del mismo virus que no ha sido digerido con estas endonucleasas seleccionadas (13,15), aspecto que continúa en estudio.

Los resultados obtenidos constituyen una evidencia de la diversidad molecular que presentan los aislados de begomovirus que están presentes en agroecosistemas productores de pimiento del país, aspecto que debe ser considerado en el manejo del cultivo y para el desarrollo de cultivares resistentes a estos patógenos, que permitan disminuir la presión de inóculo de los mismos, y por ende la incidencia de estas enfermedades en campo. Resultados alentadores en el manejo de estas enfermedades se han obtenido en el país para el cultivo del tomate (16).

El incremento de la presencia de infecciones causada por begomovirus en cultivos de importancia eco-

nómica en Cuba (7,10) y la coexistencia con otros virus (7) enfatiza la necesidad de realizar estudios de diversidad de virus en estos cultivos que ayuden a monitorear y pronosticar el comportamiento de estas entidades, los cambios evolutivos en su genoma que traen consigo el aumento de su patogenicidad, así como el diseño de medidas de mayor eficacia para su manejo.

Este trabajo constituye el primer paso para el conocimiento de la composición de esta población viral y muestra la necesidad de disponer de la secuencia de nucleótidos del componente A del virus, como criterio más fiable para su identificación y ubicación taxonómica (10,15).

REFERENCIAS

1. Rodríguez Y, Depestre T, Vázquez MR. Los potyvirus en el pimiento. *Temas*. 2005; 55-71.
2. Jones DR. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur J Plant Pathol*. 2003;109:195-219.
3. Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JAT, et al. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*. 2005;54(4): 448-459.
4. McLaughlin PD, McLaughlin WA, Maxwell DP, Roye ME. Identification of begomoviruses infecting crops and weeds in Belize. *Plant Viruses*. 2008;2(1):58-63.
5. Akhter A, Qazi J, Saeed M, Mansoor S. A severe leaf curl disease on chilies in Pakistan is associated with multiple begomoviruses components. *Plant Dis*. 2009;93:962.
6. Tahir M, Haider MS, Briddon RW. Chili curl leaf beta satellite is associated with a distinct recombinant begomovirus, Pepper leaf curl Lahore virus, in *Capsicum* in Pakistan. *Virus Res*. 2010;149:109-114.
7. Quiñones M, Martínez Y, Arana F, Martínez MA, Zamora L, et al. Coexistencia de potyvirus y begomovirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum*. L) en Cuba. *Rev. Protección Veg*. 2013;28(1):36-44.
8. Quiñones M, Fonseca D, Martínez Y, Accotto GP. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)-infecting Pepper Plants in Cuba. *Plant Dis*. 2002;86:73.
9. Martínez Y, Muñiz Y, Quiñones M. A new begomovirus infecting peppers plants in Cuba. *Plant Pathology*. 2006;55(6):817.
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*. 2009;19:10.
11. Accotto GP, Navas-Castillo J, Noris E, Moriones E, Louro D. Typing of tomato yellow leaf curl virus in Europe. *Eur J Plant Pat*. 2000;106:179-186.
12. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis*. 1993;77:340-347.
13. Khan AJ, Idris AM, Al-Saady NA, Al-Mahruki MS, Al-Subhi AM, Brown JK. A divergent isolate of Tomato yellow leaf curl virus from Oman with an associated DNA β satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes*. 2008;36:169-176.
14. Wu CY, Lai YC, Lin NS, Hsu YH, Tsai HT, Liao JY, et al. A simplified method of constructing infectious clones of begomovirus employing limited restriction enzyme digestion of products of rolling circle amplification. *J Virol Methods*. 2008;147(2):355-359.
15. Fernandes FR, Cruz ARR, Faria JC, Zerbini FM, Aragao JL. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Arch Virol*. 2009;154:1567-1570.
16. Dueñas F, Álvarez M, Moya C, Martínez Y. Identificación del gen *Ty3* de resistencia a begomovirus, en accesiones de *Solanum lycopersicom* L. *Cultivos Tropicales*. 2011;32(3):42-45.

Recibido: 6-6-2013.

Aceptado: 8-11-2013.