

## Caracterización molecular preliminar del complejo mosquita blanca-begomovirus presente en la región de Arica y Parinacota en Chile

I.M. Rosales<sup>1</sup>, P. Sepúlveda<sup>1</sup>, G. Sepúlveda<sup>2</sup> y J. Brown<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Regional de Investigación La Platina - Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 439-3, Santiago, Chile. mrosales@inia.cl. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Tarapacá (UTA), Arica, Chile. <sup>3</sup>Department of Plant Sciences, The University of Arizona

### Resumen

Los begomovirus constituyen en la actualidad los virus de mayor incidencia y distribución en el cultivo del tomate y otras hortalizas en los países tropicales, subtropicales y más recientemente en regiones templadas. Sin embargo, estos agentes virales no habían sido descritos en territorio chileno. Durante el año 2007, síntomas de amarillez y enrollamiento de hojas, plantas de tamaño reducido y una alta presencia de mosquitas blancas fueron observadas en los cultivos de tomate de la región de Arica y Parinacota, en el norte de Chile. Plantas con los síntomas antes mencionados se colectaron en cultivos de tomate al aire libre y bajo invernadero, en distintos puntos del Valle de Azapa. Tejido de plantas afectadas fue utilizado para realizar extracciones de ADN y posteriormente reacciones de PCR, en el que se utilizaron 3 sets de partidores descritos en la literatura para la identificación de begomovirus. Análisis de la secuencia genómica viral parcial obtenida confirmaron la presencia de un begomovirus bipartito infectando tomates en la región de Arica y Parinacota. Este agente viral fue identificado como el Virus del estriado amarillo de las venas del tomate (Tomato yellow vein streak virus, ToYVSV), un virus que ha sido descrito infectando solanáceas en Brasil y Argentina. Adicionalmente, se realizó la caracterización del biotipo de mosca blanca presente en la zona, a través de la secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial (mtCOI). Los resultados revelaron la presencia de un único biotipo, el biotipo B en todos los individuos analizados.

### Introducción

El valle de Azapa ubicado en la región de Arica y Parinacota, Chile, presenta una elevada importancia económica para la ciudad de Arica, al contribuir como una fuente de ingreso a través de la agricultura. El cultivo del tomate en la región posee, de acuerdo con los resultados preliminares del VIII Censo Nacional Agropecuario y Forestal, una superficie de 843 ha para consumo fresco. Lo que equivale al 13% de la superficie nacional dedicada a este cultivo, alcanzando una producción de 100.000 ton por temporada. Aunque esta superficie sea pequeña comparada con la del resto del país, tiene

gran importancia, ya que esta zona abastece durante los meses de invierno el mercado centro-sur.

En las últimas temporadas se han detectado una serie de enfermedades sistémicas que, de acuerdo a estimaciones en terreno, tienen alto impacto en la producción. Asociado a lo anterior, las fluctuantes condiciones climáticas de los últimos años, han permitido la proliferación de diversos factores biológicos y ambientales transmisores de enfermedades virales. Esto trajo como consecuencias que en 2007 se perdiera el 50% de la producción de tomates del Valle de Azapa, producto de infecciones virales.

El cultivo del tomate es susceptible a más de 200 enfermedades causadas por diferentes agentes etiológicos, por lo que se ha hecho necesario desarrollar métodos de control químico, biológico, y genético para reducir y/o eliminar las pérdidas económicas provocadas por algunas de ellas. Sin embargo, las enfermedades virales son un caso especial ya que éstas no pueden ser controladas por métodos químicos, por lo que su control se debe basar en la resistencia genética o en estrategias preventivas destinadas a evitar las enfermedades (Jones et al., 1991). En tomate, las enfermedades causadas los *Geminivirus* transmitidos por mosca blanca (*Begomovirus*) se encuentran entre las de mayor importancia económica en el mundo, no solo por los daños que causan sino por la diversidad de cultivos que afectan (Martínez et al., 2006). En la actualidad, los *Begomovirus* se han convertido en enfermedades emergentes que se han incrementado en número, distribución e importancia, debido fundamentalmente a que la mosca blanca es un vector polífago, que posee una amplia gama de hospedante, induce diversos trastornos fitotóxicos y es resistente a varios tipo de insecticidas.

En Chile, no existían reportes de la presencia de estos agentes virales; sin embargo, los síntomas característicos observados en el campo, asociados a las altas poblaciones de mosca blanca presentes en la zona limítrofe del norte de Chile, llevaron a sospechar de su presencia en el país. En este trabajo se entrega información respecto a la caracterización molecular parcial del *Begomovirus* identificado en la región de Arica y Parinacota, así como también la caracterización del biotipo de mosca blanca presente en la zona.

## **Materiales y métodos**

**Colección de muestras.** Hojas y frutos de tomates fueron colectados desde cultivos de invernadero y al aire libre en la Provincia de Arica, en el Valle costero de Azapa, ciudad de Arica. Adicionalmente, se colectaron mosquitas blancas en cada lugar, las que fueron transportadas almacenadas en etanol hasta su análisis. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del INIA La Platina en Santiago.

**Extracción de ADN.** Se utilizó un protocolo similar al descrito por Lodhi et al (1994), iniciando la extracción a partir de 0,1 g de hojas jóvenes sintomáticas.

**PCR y análisis de secuencias.** El ADN fue utilizado como templado para efectuar las amplificaciones de secuencias genómicas virales y de biotipificación de mosquitas blancas. Los partidores utilizados se describen en la siguiente tabla (Tabla 1), y se indica el artículo donde se describen las condiciones de amplificación en cada caso.

**Table 1.** Partidores, secuencias y tamaño esperados.

Nombre Partidores	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado (Referencias)
prV324	gcc(ct)at(ga)ta(tc)ag(ag)aagcc(ac)ag	~576 – 579 pb Amplificación Universal begomovirus (Wyatt, y Brown. 1996).
prC889	gg(ag)tt(atg)ga(ga)gcatg(tca)gtacatg	
PAL1v1978	gcatctgcaggccacatygtcttycngt	~1100 pb Amplificación Universal begomovirus (Rojas <i>et al.</i> , 1993).
PAR1c496	aatactgcagggcttyctracatrgg	
PCRc1	ctagctgcagcatatttacrarwatgcca	~500-650 pb Amplificación componente B begomovirus (Rojas <i>et al.</i> , 1993).
PBL1v2040	gcctctgcagcartgrtckatcttcataca	
C1-J-2195	ttgatttttggatccagaagt	~700 pb Amplificación gen citocromo oxidasa I mitocondrial . (Frohlich, et al., 1999).
L2-N-3014	tccaatgcactaatctgcatatta	

Los productos de PCR obtenidos con los partidores prV324/prC889 y PRC1/PBL1v2040 y C1-J-2195/L2-N-3014 fueron clonados y secuenciados. Comparaciones de las secuencias fueron ejecutadas utilizando el algoritmo BLASTn, alineamientos con Clustal W y análisis filogenético (neighbor-joining trees con 1,000 bootstrap) usando el modelo Tamura-Nei del programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

## Resultados y Conclusiones

Hasta el momento aproximadamente 100 muestras han sido recolectadas en distintos puntos del Valle de Azapa (Arica) y analizadas con los tres sets de partidores descritos para la identificación de *Begomovirus*. En todos los casos, las muestras amplificaron la banda del tamaño esperado, confirmando la presencia de un *Begomovirus* bipartito en la región.

La secuencia nucleotídica obtenida de los fragmentos amplificados con los partidores prV324/prC889, que amplifican un fragmento del gen de proteína de cubierta viral (ADN-A), revelaron un 98% de identidad de los aislados chilenos con un segmento del ADN- A del virus ToYVSV- aislado Ba-3 (accesión: EF417915) y 92% de identidad con ToYVSV- aislado G-22 de Brasil (accesión: EF459696). Análisis de las secuencias obtenidas con el set de partidores que amplifican un segmento del ADN- B de los *Begomovirus*, reveló sobre un 96 y 92% de similitud entre los aislados chilenos y los aislados ToYVSV-Ba-3 (Accesión: EF417915) y ToYVSV-raza Brasil 1 (Accesión: U80042).

Posteriormente se construyó un árbol filogenético utilizando información nucleotídica de un fragmento de 533 pb del gen de la proteína de cubierta de distintas especies de *Begomovirus* que infectan tomates en Norte, Centro y Sud-América. El árbol generado reveló un cluster único que agrupa a todos los aislados de ToYVSV reportados hasta el momento, incluyendo los aislados chilenos. Un aislado brasileño proveniente de papas, fue el más cercano al identificado en Chile.

Hasta ahora se ha obtenido la secuencia del gen mtCOI para 10 muestras de mosquitas blancas presentes en tomates del Valle de Azapa. En todos los casos, los resultados revelan la presencia de un único biotipo, el biotipo B en todos los individuos analizados. Este biotipo posee mayor diversidad de hospedantes, mayor agresividad y gran capacidad de transmisión de *Begomovirus*.

### Referencias

- Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I., Bedford, I.D., Markham, P.G., and Brown, J.K. 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*. 8:1683-1691.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. eds. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
- Lodhi, M.A., Guang-Ning Y., N.F. Weeden, and Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:6-13.
- Martínez, Y., Quiñones, M., Palenzuela, I., y Muñiz, Y. 2006. Diversidad de begomovirus presentes en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 21:149-154.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Rusell, D.R., y Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerated primers in the polymerase chain reaction to detect whiteflies-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77(4):340-347.
- Rojas, M.R., Hagen C., Lucas, W.J., and Gilbertson, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses *Annu Rev. Phytopathol.* 43:361-394.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Wyatt, S.D., and J.K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86(12):1288-1293.