

Patogenicidad del virus costarricense del mosaico dorado de *Sida* (SiGMCRV) en varias especies de plantas cultivadas

Juan Jovel¹
Esmeralda Ruiz

RESUMEN. Se evaluó el ámbito de hospedantes cultivados del virus costarricense del mosaico dorado de *Sida* (SiGMCRV). Asimismo, se estudió la interacción del SiGMCRV con el virus africano del mosaico de la yuca (ACMV), el virus del mosaico dorado del abutilón (AbMV), el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV, cepa común), y el virus de la hoja rizada de la remolacha (BCTV), en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* cv. Samsun NN. El ámbito de hospedantes del SiGMCRV incluyó a todos los cultivos evaluados. La variedad criolla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) ‘sacapobres rojo’ y una variedad nicaragüense de grano rojo no identificada presentaron síntomas muy severos, mientras la variedad ‘Talamanca’ y la línea DOR 364 fueron resistentes a la infección con el SiGMCRV. Los síntomas fueron severos en tabaco (*N. tabacum*), moderados en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y prácticamente ausentes en chile dulce (*Capsicum annuum*) y pepino (*Cucumis sativus*). La incidencia, por otro lado, fue muy alta en las variedades susceptibles de frijol (80%), nula en la variedad ‘Talamanca’ y la línea DOR 364, baja en el caso del tomate (35%) y muy baja en pepino (8%). En chile dulce, la incidencia fue del 83% cuando las plantas fueron inoculadas con el método de balística, pero nula en el caso de agroinoculación. En general, ninguno de los virus coinoculados con el SiGMCRV incrementó la severidad de la infección y más bien redujeron la severidad y la incidencia en el caso de tomate y tabaco. En *N. benthamiana*, las plantas presentaron un fenotipo correspondiente a uno de los virus coinoculados y algunas plantas con sintomatología típica del virus competidor la modificaron para exhibir claramente los síntomas del SiGMCRV, sugiriendo que este último había dominado al virus competidor. Se discuten también las implicaciones que estos hallazgos tienen para el manejo integrado de enfermedades virales.

Palabras clave: Geminivirus, SiGMCRV, ámbito de hospedantes, epidemiología.

ABSTRACT. Pathogenicity of *Sida* golden mosaic Costa Rica virus (SiGMCRV) on several crop plants. The host range of the *Sida* golden mosaic Costa Rica virus (SiGMCRV) was explored. In addition, the interaction of the SiGMCRV with the African cassava mosaic virus (ACMV), abutilon mosaic virus (AbMV), tomato golden mosaic virus (TGMV) and beet curly top virus (BCTV) was studied in *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum* cv. Samsun NN. The host range of the SiGMCRV included all the crop species evaluated. The creole variety of red bean ‘sacapobres rojo’, as well as an unidentified Nicaraguan variety, exhibited very severe symptoms, whereas the Talamanca variety and the DOR 364 line were resistant to the infection with SiGMCRV. The symptoms were severe in tobacco (*N. tabacum*), but rather mild in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and barely perceivable in pepper (*Capsicum annuum*) and cucumber (*Cucumis sativus*). On the other hand, the incidence was very high in the susceptible varieties of bean (80%), but low in tomato (35%) and lower still in cucumber (8%). In pepper, the incidence was 83% when the plants were inoculated by bombardment of gold particles coated with DNA, but none of the 120 agroinoculated plants became infected. None of the viruses co-inoculated with the SiGMCRV increased the severity of the infection, rather, they attenuated both the incidence and severity of SiGMCRV in tomato and tobacco plants. In *N. benthamiana*, the plants showed a phenotype corresponding to one of the viruses inoculated. However, some plants initially exhibiting a symptomatic phenotype typical of the competing virus deployed symptoms typical of the SiGMCRV in later stages of the disease, thus suggesting that SiGMCRV predominated over the competing virus. The significance of these findings is discussed in the context of integrated management of viral diseases.

Key words: Geminiviruses, SiGMCRV, host range, epidemiology.

¹ Instituto de Biología Molecular y Virología de Plantas. Universidad de Stuttgart, Alemania. juan.jovel@po.uni-stuttgart.de

Introducción

Al menos dos aspectos de la ecología de las malezas del género *Sida* resultan especialmente llamativos cuando son consideradas en el contexto de epidemias virales en campos de cultivos. El primero es su ubicuidad: su distribución geográfica se extiende a prácticamente todas las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, donde se encuentran asociadas a una gran variedad de cultivos agrícolas tradicionalmente afectados por enfermedades virales, como es el caso del tomate, frijol, chile dulce, y varias especies de cucurbitáceas. El segundo aspecto es la frecuencia con que estas malezas exhiben un fenotipo similar al de plantas infectadas con virus: enanismo, mosaicos, clorosis y arrugamiento del follaje, entre otros. Además, varios geminivirus han sido aislados y clonados de plantas de *Sida* recolectadas en campos de Florida (Abouzid *et al.* 1998), Honduras (Frischmuth *et al.* 1997b), Costa Rica (Höfer *et al.* 1997b) y Brasil (Jovel *et al.* 2003).

Los geminivirus son patógenos de plantas que se han convertido en una seria amenaza para la agricultura en diversas regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Moffat 1999), debido a una serie de factores que incluyen el transporte interregional de material vegetal, el incremento y la diversificación de las poblaciones de insectos vectores (Polston y Anderson 1997) y, posiblemente, la recombinación entre diferentes geminivirus que coinfectan las mismas plantas hospedantes (Padidam *et al.* 1999). La familia *Geminiviridae* ha sido dividida en tres géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, y *Begomovirus* (Rybacki *et al.* 2000). Los begomovirus son transmitidos por un complejo de biotipos de moscas blancas (*Bemisia tabaci* Genn.), infectan plantas dicotiledóneas y, en su gran

mayoría, poseen genomas bipartitos, cuyos componentes son designados ADN A y ADN B (Fig. 1). El ADN A codifica las proteínas requeridas para la replicación (AC1 y AC3), regulación de la transcripción (AC1, AC2), y encapsidación del ADN viral monocatenario (AV1); mientras que las proteínas del ADN B (BC1 y BV1) participan en el movimiento del virus dentro de la planta (Hanley-Bowdoin *et al.* 1999).

Por otro lado, se conocen más de 500 especies de plantas con las cuales se asocia *B. tabaci* (Greathed 1986), especie que no parece exhibir especificidad o preferencias para la transmisión de diferentes begomovirus (Bedford *et al.* 1994), lo cual promueve la convergencia de diferentes virus en una misma planta, sea cultivada o silvestre. En regiones hortícolas de América Latina, muchos cultivos susceptibles a begomovirus se intercalan espacial y temporalmente, lo cual potencia su coexistencia con malezas perennes que podrían fungir como hospedantes alternos de estos virus o que inclusive podrían albergar virus propios. Los intentos por dilucidar el papel que estas malezas juegan en el contexto de las epidemias virales no han arrojado hasta ahora resultados concluyentes. Por ejemplo, en Costa Rica, para el caso del virus del moteado amarillo del tomate (ToYMoV), se realizaron muestreos extensivos en diferentes épocas del año para determinar si las malezas desempeñan un papel como hospedantes alternos de este virus (Jovel *et al.* 1999). Los resultados mostraron, en contraposición a lo esperado, que las malezas no fueron reservorios importantes del ToYMoV, en analogía con la situación reportada para el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV), en Costa Rica, del virus del moteado del tomate (ToMoV-[FL]), en Florida, y del virus del mosaico africano de la yuca (ACMV) (Hilje *et al.* 2001).

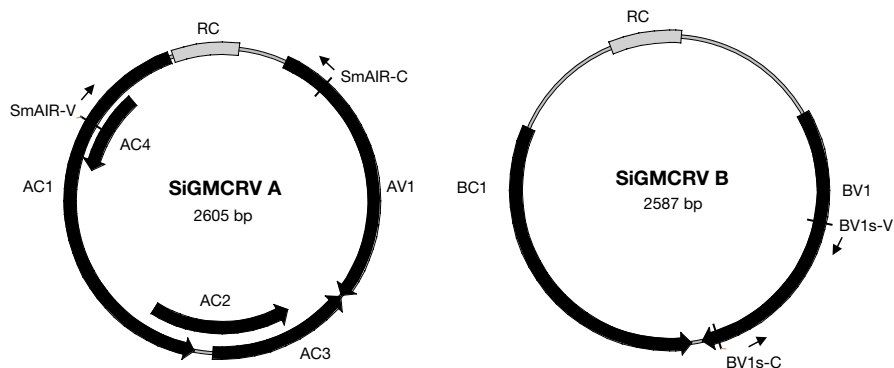


Figura 1. Mapa del genoma del SiGMCRV. Aparecen indicados la región común (RC) entre ambos componentes genómicos (la cual contiene elementos genéticos necesarios para la transreplicación e inicio de la transcripción), y los genes codificados por cada componente, así como los cebadores utilizados para la preparación de las sondas para hibridación.

El presente estudio explora la patogenicidad del virus costarricense del mosaico dorado de la Sida (SiGMCRV; Höfer *et al.* 1997b) en diferentes especies de plantas cultivadas, y su posible interacción con otros begomovirus (virus del mosaico del Abutilon, AbMV; virus del mosaico dorado del tomate, TGMV; virus africano de la yuca, ACMV) y un curtovirus (virus del enrollamiento de la hoja de remolacha, BCTV).

Materiales y métodos

Plantas y virus

Los experimentos de infección de plantas se llevaron a cabo en un invernadero de la Universidad de Stuttgart, Alemania, donde se simularon condiciones climáticas tropicales (temperatura de 20-25°C, humedad relativa de 40-50%). Los experimentos de determinación del ámbito de hospedantes del virus incluyeron las siguientes especies: tomate (*L. esculentum*), chile dulce (*C. annuum*), pepino (*C. sativus*), frijol (*P. vulgaris*), y tabaco (*N. tabacum*). Los experimentos de infecciones mixtas fueron realizados en tabaco y en *N. benthamiana*.

Los clones agroinfectivos utilizados para la infección de plantas han sido previamente descritos (BCTV: Frischmuth *et al.* 1997a; SiGMCRV: Höfer *et al.* 1997b; AbMV, ACMV, TGMV: Wege *et al.* 2001). Las bacterias que contienen los plásmidos virales fueron multiplicadas en cajas de Petri con medio de crecimiento LB (Luria-Bertani; Sambrook y Russell 2001). Se utilizaron rifampicina (50 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml) como agentes selectivos. La suspensión bacteriana correspondiente a cada geminivirus, así como a sus ADN A y ADN B, fue ajustada a la misma densidad óptica (OD₆₀₀) mediante un espectrofotómetro (Ultrospec II, LKB, Biochrom).

Métodos de inoculación

Agroinfección. Se inocularon las plantas de cada una de las especies analizadas en el estadio de 1-2 hojas verdaderas, colocando 5 µl de suspensión bacteriana y pinchando tres veces el pedicelo de dichas hojas con una aguja para agroinoculación. Se inocularon las plantas control con agrobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*) sin virus.

Balística. Se lavaron 60 mg de oro pulverizado (1 µm de diámetro, Bio-Rad) dos veces en EtOH 70% y una vez en agua destilada, bajo agitación vigorosa, durante 10 min y precipitados por centrifugación (10 segundos, 14000 rpm). Las partículas de oro fueron resuspendidas en 0,5 ml de glicerol 98% y 0,5 µl de agua

bidestilada. Cada 10 µl [1 µg/µl] de ADN viral (5 µg ADN A y 5 µg ADN B, en el caso de genomas bipartitas) fueron mezclados con 50 µl de suspensión de oro y vigorosamente agitados durante 3 min. Se agregaron 10 µl de 0,1 M espermidina a la pared del tubo de reacción, previamente colocado en posición horizontal, y 50 µl de 2,5 M CaCl₂ fueron adicionados al tubo, en agitación durante 4 min. La suspensión se centrifugó (6 segundos, 14000 rpm; temperatura ambiente, TA), se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces en 250 µl de EtOH 70%, disolviéndolo con un agitador y centrifugándolo como se describió anteriormente. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 72 µl de EtOH y se distribuyeron 6 µl sobre cada uno de los 10 discos portadores. Los microproyectiles fueron disparados con un equipo de balística (PDS-1000/He; Bio-Rad) sobre plantas de chile dulce con 4-5 hojas verdaderas, utilizando para ello discos de ruptura de 450 psi y una presión de vacío de 26 in/Hg. Las plantas control fueron bombardeadas con microproyectiles con ADN del vector de clonación BlueScript II KS(+) (Stratagene), el cual no es patogénico en plantas.

Aislamiento e identificación de formas replicativas virales

Extracción de ácidos nucleicos totales. Debido al elevado número de plantas utilizadas en cada experimento, un análisis de *tissue-blot* fue realizado para discriminar plantas sanas de infectadas. Este método consiste en cortar una hoja del ápice de la planta e impregnar la savia que emana del pecíolo en una membrana de nylon. Posteriormente, se realiza la hibridación de ácidos nucleicos (ver descripción más abajo). Las muestras que resultaron positivas fueron seleccionadas para análisis posteriores. Para la extracción de los ácidos nucleicos totales de plantas infectadas, una pequeña hoja (aprox. 0,5 cm de longitud), dentro de un tubo Eppendorf, fue congelada en nitrógeno líquido y pulverizada con un pistilo de vidrio. Se agregaron 1 ml de solución de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,6% SDS; 100 mM DTT) más un volumen de fenol-cloroformo (FC, 9:1), y la suspensión fue agitada vigorosamente (15 min, TA). Después de la centrifugación (5 min, 14000 rpm, TA), 500 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo con un volumen de FC (1:1), agitado y centrifugado como ya se describió. Se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un nuevo tubo con 40 µl de 3 M NaAc (pH 4,8) y se agregaron dos volúmenes de

EtOH para facilitar la precipitación del ADN, durante 30 min, a -20°C . La suspensión fue centrifugada (30 min, 14000 rpm, 4°C), el sobrenadante descartado, el precipitado lavado con 500 μl de EtOH 70% (5 min, TA), nuevamente centrifugado (10 min, 14000 rpm, TA), secado al vacío, y finalmente resuspendido en 50 μl 1x TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 7,5).

Transferencia de Southern e hibridación de ácidos nucleicos. Se cargó 1 mg de ácidos nucleicos totales de plantas en un gel de agarosa (1%) con 0,4 mg/ml de EtBr y 0,5x tampón TBE y corrido en un aparato de electroforesis en presencia del mismo tampón, bajo una corriente eléctrica de 4 voltios/cm (distancia entre electrodos). El gel fue agitado suavemente durante 20 min en una solución alcalina de transferencia y el ADN se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+) mediante el método de Southern, en presencia de la misma solución de transferencia. La membrana fue incubada durante 3 h en una solución de pre-hibridación a 42°C y finalmente hibridada (16 h, 42°C). Para el ADN A, un fragmento comprendido entre los genes AC1 y AV1 fue amplificado mediante PCR a partir de los plásmidos con el ADN A de SiGMCRV (cebadores **SmAIR-V**:5'-TTAGCTCCCTGAATGTTCCGG-3' y **SmAIR-C**:5'-GGGCTTCCTGTACATGGGCC-3'). Para el ADN B, se utilizó un fragmento del gen BV1 (cebadores **BV1s-V** 5'-TGCGTTTCAAAGGCACTGTG-3' y **BV1s-C** 5'-GATACAAATGTAGATGCTT-3') (Fig. 1). Dichos fragmentos fueron marcados con digoxigenina-11-(d)UTP (Roche, Mannheim, Alemania) y detectados como se indica en las instrucciones suministradas por el proveedor².

Resultados

Ámbito de hospedantes del SiGMCRV

En un esfuerzo preliminar por determinar el ámbito de hospedantes del SiGMCRV, se demostró que dicho virus induce síntomas moderados en plantas de tomate y tabaco, y severos en una variedad no identificada de frijol (Höfer *et al.* 1997b). En este estudio, el número de especies evaluadas se incrementó y, además, se incluyeron diferentes variedades de frijol que predominan entre los agricultores centroamericanos. Las plantas de diferentes especies cultivadas se infectaron a través del método de agroinoculación y

en cada uno de los experimentos se incluyeron como control 30 plantas de *N. benthamiana*, la cual es una especie altamente susceptible a dicho virus (Fig. 4B). Sin excepciones, el 100% de las plantas control presentaron síntomas severos típicos del SiGMCRV, lo cual indica que el inóculo viral era capaz de inducir una infección en cada uno de los experimentos. Sin embargo, la patogenicidad del virus fue muy variable en diferentes especies de plantas cultivadas.

La Fig. 2 presenta un resumen de los resultados de la detección de formas replicativas del SiGMCRV en las diferentes especies evaluadas. A manera de ejemplo, se presentan tres plantas de cada una de las especies o variedades que resultaron positivas en el análisis de *tissue blot*. Debido a que las plantas fueron muestreadas en las hojas del ápice, tres semanas después de la inoculación, el ADN viral detectado corresponde a aquel sintetizado *in planta*, y excluye el ADN viral utilizado como inóculo. Un control adicional es el ADN de plantas de *S. rhombifolia* (de las cuales se aisló el SiGMCRV), y sirve como referencia para identificar el tamaño de las formas replicativas correspondientes a geminivirus. Un resultado llamativo en este análisis fue la ausencia de ADN de una sola cadena (ADNsc) —la forma viral que es encapsidada— en las muestras de frijol (pozos 1-6); sin embargo, no se llevaron a cabo análisis más detallados para discernir si dicha ausencia se debió a la pérdida de ADNsc durante la extracción de ácidos nucleicos o a la composición de ADN viral en las plantas. La acumulación de ADN viral en tomate fue muy elevada (pozos 7-9), intermedia en chile dulce (pozos 10-12) y muy baja en pepino (pozos 13-15).

Sintomatología inducida por el SiGMCRV

L. esculentum var. 'Money Maker'. A partir de estudios previos realizados en el laboratorio del Instituto de Biología Molecular y Virología de Plantas de la Universidad de Stuttgart, se sabe que esta variedad de tomate es susceptible a la infección por geminivirus. Sin embargo, la proporción de plantas de tomate infectadas con el SiGMCRV en este estudio fue baja (3/40 y 4/20; Cuadro 1) y los síntomas fueron moderados: enanismo y mosaico clorótico leve. Sin embargo, la reducción en la distancia entre nudos del tallo principal fue notoria. Las plantas fueron reinoculadas tres veces, a intervalos semanales, para delimitar un posi-

² Se puede solicitar protocolos detallados de los métodos utilizados en este estudio directamente al primer autor mediante correo electrónico.

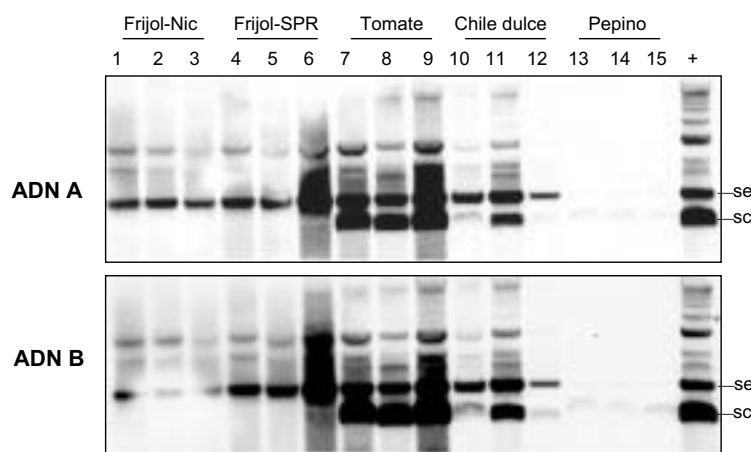


Figura 2. Análisis de hibridación de ADN viral. Tres plantas de cada una de las especies que resultaron infectadas fueron incluidas en el análisis a manera de ejemplo. Las sondas utilizadas en cada caso aparecen descritas en la Fig. 1. La posición del ADN superenrollado (se; indicativo de la replicación de geminivirus) y de una sola cadena (sc; la forma de ADN viral que se encapsida y se transmite a otras plantas) aparecen indicadas en el borde derecho.

ble período crítico de susceptibilidad. Ninguna planta adicional resultó infectada, lo cual sugiere que las etapas iniciales de desarrollo del cultivo son las de mayor susceptibilidad.

C. annuum var. ‘Agronomic’. Debido a que la transformación de plantas de chile dulce mediante agrobacteria no aparece en la literatura, se utilizó también el método de balística para la inoculación del SiGMCRV en dicha especie. Ninguna de las 120 plantas agroinoculadas (40 en cada uno de tres experimentos) resultó infectada. Sin embargo, el 100% y el 65% (20/20 y 13/20) de plantas “bombardeadas” resultaron infectadas (Cuadro 1). Al inicio de la infección, las plantas presentaron un enanismo leve, pero posteriormente fueron visualmente indistinguibles de las

plantas control, y no se pudo detectar ADN viral ocho semanas después de la inoculación. La misma situación ha sido observada para el TYLCV³.

N. tabacum var. ‘Samsun’ NN. El porcentaje de plantas de tabaco infectadas con el SiGMCRV fue de 35% y 70% (7/20 y 14/20; Cuadro 1) y los síntomas fueron severos: deformación de la lámina foliar, enanismo y mosaicos cloróticos.

P. vulgaris var. ‘Sacapobres rojo’ (SPR). En consistencia con lo expresado por Höfer *et al.* (1997b) para una variedad desconocida de frijol, el SiGMCRV fue extremadamente severo en plantas de la variedad SPR, tanto en la incidencia (58/70, 18/20; Cuadro 1) como en la severidad de los síntomas inducidos:

Cuadro 1. Número de plantas infectadas por el SiGMCRV en cada especie y experimento.

Especies de plantas	Experimento		
	1	2	3
Tomate	3/40	4/20	—
Tomate (reinoculaciones)	3/40	4/20	—
Chile dulce (agroinoculadas)	0/40	0/40	0/40
Chile dulce (balística)	20/20	13/20	—
Tabaco	7/20	14/20	—
Frijol (SPR)	58/70	18/20	—
Frijol (nicaragüense)	35/50	15/20	—
Frijol (Talamanca)	0/50	—	—
Frijol (DOR 364)	0/43	—	—
Pepino	5/60	3/37	—

*# plantas infectadas/#plantas inoculadas

³ Morilla, G. 2003. España, Universidad de Málaga (Comunicación personal).

enanismo, deformación de hojas jóvenes producto del desarrollo reducido de las nervaduras y, en etapas posteriores, proliferación excesiva de hojas en el ápice de la planta, las cuales nunca completaron su desarrollo (Fig. 3A-C). En forma eventual, una de las yemas laterales asumió el crecimiento ortotrópico típico de esta variedad de guía larga. Diez semanas después de la inoculación, ni flores ni vainas fueron observadas en la mayoría de las plantas infectadas.



Figura 3. Patogenicidad del SiGMCRV en la variedad de frijol 'sacapobres rojo'. Al inicio de la infección las plantas detienen abruptamente su crecimiento (A). Posteriormente se inicia una proliferación de hojas muy pequeñas (B), que finalmente conduce a plantas en forma de roseta (C). Estos síntomas son muy similares, si no idénticos, a los reportados por Costa (1975) en plantas de frijol infectadas con el virus del mosaico enano del frijol.

Adicionalmente, en una variedad nicaragüense no identificada de frijol de grano rojo y guía larga, la incidencia y severidad del SiGMCRV fueron comparables con las obtenidas en el caso de la variedad SPR (Cuadro 1).

P. vulgaris var. 'Talamanca' y línea DOR 364. Estos dos genotipos se destacan por su resistencia a la infección por el virus del mosaico dorado amarillo del frijol (BGYMV). En forma consistente, ninguna de 50 y 43 plantas inoculadas con el SiGMCRV, de la variedad 'Talamanca' y la línea DOR 364, respectivamente, resultó infectada.

C. sativus var. 'Poinsett'. La incidencia del SiGMCRV en esta variedad de pepino fue muy baja (5/60 y 3/37) y las plantas permanecieron libres de síntomas hasta el final del período de observación (ocho semanas después de la inoculación).

Infecciones mixtas

Como el SiGMCRV es transmitido por la mosca blanca (Höhnle *et al.* 2001), existe la posibilidad de que dicho virus concorra en forma natural, en la misma planta, con otros virus cuyo ámbito de hospedantes traslape con el del SiGMCRV. Con el objetivo de estudiar las posibles interacciones de diferentes geminivirus que comparten las mismas plantas infectadas, se llevaron a cabo experimentos de coinoculación del SiGMCRV con otros geminivirus; en tomate, tabaco, y *N. benthamiana*, con la raza común del TGMV, y en tabaco y *N. benthamiana* con el TGMV, el AbMV, el ACMV, y el BCTV. En general, el SiGMCRV fue más virulento cuando se inoculó solo que cuando fue coinoculado con cualquiera de los otros virus. El TGMV redujo la virulencia del SiGMCRV en cada caso. Ninguna de las 40 y 20 plantas de tomate y tabaco, respectivamente, resultó infectada por el SiGMCRV cuando este fue coinoculado con el TGMV. Una situación similar fue observada para el AbMV, ACMV y BCTV, en tabaco (Cuadro 2).

Sin embargo, el escenario fue más interesante en *N. benthamiana*, el cual es un hospedante susceptible a todos los virus incluidos. El SiGMCRV induce síntomas muy severos en *N. benthamiana*, los cuales incluyen enanismo, arrugamiento foliar, y disrupción de la dominancia apical que resulta en plantas enanas con muchas hojas pequeñas (Fig. 4B). Cuando este virus fue coinoculado con el AbMV, el porcentaje de

Cuadro 2. Coinfección de diferentes especies de plantas con el SiGMCRV y otros geminivirus.

Virus coinoculados	No. de plantas inoculadas / no. de plantas infectadas**		
	<i>L. esculentum</i>	<i>N. tabacum</i> NN	<i>N. benthamiana</i>
TGMV	0/40***	0/20	23/30
AbMV	—	6/20	22/30
ACMV	—	8/20	28/30
BCTV	—	5/20	16/30
SiGMC/CR	5/40	10/20	30/30
SiGMC/CR + TGMV	0/40	0/20	12/30
+ AbMV	—	2/20	15/30
+ ACMV	—	3/20	17/30
+ BCTV	—	0/20	6/30

* No. de plantas infectadas / no. de plantas inoculadas.

** Las cifras corresponden al promedio de dos experimentos independientes.

*** Los clones infectivos del TGMV infectan e inducen síntomas severos en *N. benthamiana*, pero no infectan tomate.

plantas infectadas descendió ligeramente, al igual que en el caso de los otros virus “competidores” (Cuadro 2), pero el efecto más notable fue la atenuación de la severidad de los síntomas (Fig. 4D). En etapas iniciales de la infección, las plantas coinoculadas fueron más grandes que aquellas infectadas solo con SiGMCRV y las hojas completaron un desarrollo casi normal, exceptuando un arrugamiento moderado. Sin embargo, semanas más tarde, los síntomas típicos del SiGMCRV aparecieron en la mayoría, aunque no en todas, las plantas infectadas y permanecieron hasta el final del período de observación (ocho semanas después de la coinoculación). El AbMV induce síntomas moderados en *N. benthamiana*, similares a los observados en etapas tempranas de estos experimentos de coinoculación con SiGMCRV.

De forma análoga, la coinoculación del SiGMCRV con el TGMV o el ACMV, resultó en síntomas iniciales típicos del virus competidor. La coinoculación del SiGMCRV + TGMV resultó en hojas cloróticas con bordes arrugados (Fig. 4C), como correspondió a plantas inoculadas solo con el TGMV. Plantas coinoculadas con SiGMCRV + ACMV presentaron enanismo severo, clorosis intensa, y hojas lanceoladas (Fig. 4E), comparables a los síntomas de plantas inoculadas sólo con el ACMV. Sin embargo, aquellas coinoculadas con SiGMCRV+BCTV presentaron síntomas híbridos, parcialmente típicos de ambos virus (Fig. 4F): las hojas inicialmente infectadas presentaron un arrugamiento típico del BCTV, pero las hojas que emergieron posteriormente presentaban síntomas típicos del SiGMCRV. En general, en etapas tardías, algunas de las plantas coinoculadas presentaron síntomas típicos del

SiGMCRV, pero este fenotipo fue más frecuente en el caso del AbMV y del BCTV que en el caso del ACMV o del TGMV. En ninguno de los casos se observó un incremento en la severidad de la infección con respecto a las plantas infectadas con cada uno de los virus por separado, lo cual señala que la relación de los diferentes geminivirus con el SiGMCRV fue de competencia.

SiGMCRV: un pariente cercano del virus del mosaico enano del frijol (BDMV)

Análisis filogenéticos demuestran que el SiGMCRV es un pariente cercano, posiblemente ancestral, del BDMV (Fig. 5A, B). Esto explica la patogenicidad del SiGMCRV en las variedades SPR y nicaragüense de frijol. El ADN A del SiGMCRV presenta una secuencia de nucleótidos muy similar a la correspondiente en el BDMV (homología = 89%; según Fauquet *et al.* (2003), el límite para considerar dos begomovirus como de la misma especie es de 90%). Para el caso del ADN B, la variación fue mayor que en el ADN A, pero el grupo de begomovirus de la Sida también incluyó el BDMV como vecino más cercano (Fig. 5B).

Con el objetivo de explorar más detalladamente la relación filogenética del SiGMCRV con otros begomovirus, las secuencias presentadas en la Fig. 5 fueron sometidas a un análisis de recombinación mediante el programa GENECONV, el cual determina la probabilidad de que fragmentos similares en dos secuencias de ADN se hayan originado por recombinación. El programa fue gentilmente provisto por su autor, el Dr. Stanley Sawyer, de la Universidad de Washington y está, además, disponible gratuitamente en Internet (<http://www.math.wustl.edu/~sawyer/geneconv>). Las

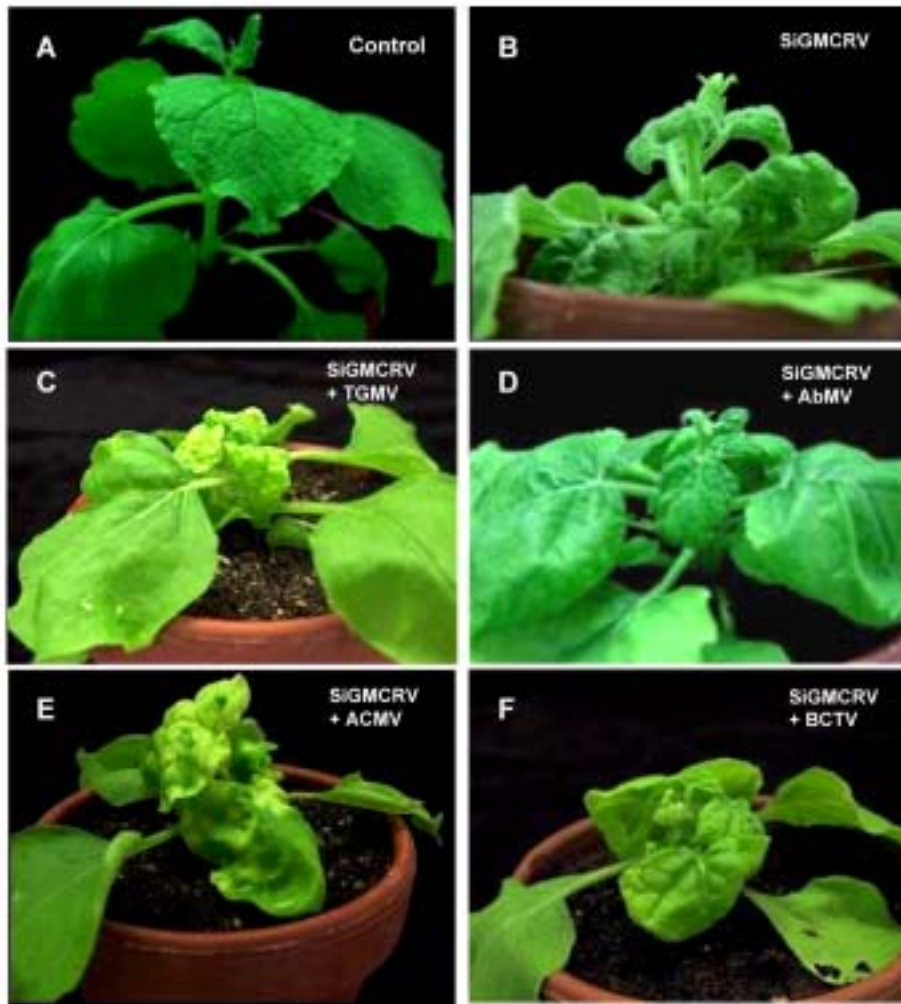


Figura 4. Plantas de *N. benthamiana* sana (A), infectada con: SiGMCRV (B), SiGMCRV+TGMV (C), SiGMCRV+AbMV (D), SiGMCRV+ACMV (E), SiGMCRV+BCTV (F).

corridas se efectuaron utilizando la siguiente línea de comando: GENECONVnombre_archivo.asf/c/g1/sp/w 123. Se puede encontrar más información sobre el funcionamiento de este programa en la página web referida arriba. Entre otros, GENECONV identificó un fragmento recombinante entre los ADN A del SiGMCRV y del BDMV, en la región 5' de la proteína de replicación (AC1), la cual es una región altamente propensa a recombinar (Jovel *et al.* 2003).

Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que el SiGMCRV presenta un ámbito amplio de hospedantes que incluye, preferiblemente, variedades susceptibles de frijol y tabaco. Sin embargo, otros cultivos menos susceptibles, como tomate y chile dulce, permiten la replicación abundante de este virus y

podrían fungir como hospedantes alternos. Desde el punto de vista práctico, estos hallazgos plantean la necesidad de considerar el control de malezas como una medida profiláctica que puede contribuir a reducir la incidencia de enfermedades virales, dependiendo de las características particulares de cada sistema de cultivo.

De manera similar, Gálvez y Morales (1989) reportan que el geminivirus del mosaico de *Rhynchosia*, proveniente de la maleza *Rhynchosia minima*, fue transmitido experimentalmente hacia plantas de frijol, las cuales presentaron mosaicos cloróticos, enanismo, y deformación foliar. El SiGMCRV no induce mosaicos cloróticos en el frijol (como sí es típico del BGYMV), pero otros desórdenes fenotípicos también pueden ser el resultado de infecciones por este virus (Fig. 3A-C). Los síntomas

inducidos por el SiGMCRV en las variedades susceptibles de frijol no fueron tan severos en todos los casos como los presentados en la Fig. 3C; lo que sí es cierto es que todas las plantas infectadas mostraron una reducción drástica en la producción de flores y vainas, indicando que la reducción de la productividad del frijol podría ser el resultado de una infección viral.

La cercanía filogenética del SiGMCRV con el BDMV (Fig. 5) y la patogenicidad severa del SiGMCRV en variedades susceptibles de frijol sugieren que el BDMV probablemente evolucionó a partir de este u otro virus cercanamente emparentado. Hace más de un cuarto de siglo, el Dr. Álvaro Santos Costa publicó un desorden fisiológico en plantas de frijol, al cual denominó “mosaico enano del frijol” y lo atribuyó a una cepa del AbMV, encontrado en malváceas nativas de Brasil (Costa 1975). Dichas plantas presentaron síntomas muy similares (visualmente idénticos) a los de las plantas infectadas con el SiGMCRV en este estudio (Fig. 3A-C). Hoy se sabe que varios virus que entonces eran considerados como cepas del AbMV pertenecen en realidad al complejo de begomovirus que afectan diferentes especies de *Sida* (Jovel *et al.* 2003). Además, bajo condiciones experimentales, plantas de *Sida* spp. fueron susceptibles a la infección con el BDMV (Morales *et al.* 1990). Rojas *et al.* (2000) reportaron la presencia de dos geminivirus en campos de tomate en Nicaragua, filogenéticamente muy cercanos a los virus del mosaico dorado de la *Sida* de Honduras (SiGMHV) y Costa Rica (SiGMCRV). En resumen, estos resultados indican que las malezas perennes, especialmente aquellas del género *Sida*, parecen estar estrechamente ligadas a la evolución de los begomovirus y haber servido como puentes evolutivos que propiciaron el paso de estos patógenos hacia plantas cultivadas.

El caso del tabaco es una situación que requiere ser analizada cuidadosamente, puesto que es una planta altamente susceptible a infecciones virales y, además, un hospedante apetecido de la mosca blanca. El SiGMCRV indujo síntomas severos en tabaco, y el área foliar promedio se redujo a aproximadamente la mitad en plantas infectadas (datos no presentados), lo cual tendría repercusiones económicas importantes en este caso.

Los cultivos tolerantes, como la variedad de chile dulce evaluada en este estudio, podrían ser eslabones críticos en la diseminación temporal de enfermedades. Si bien es cierto que ninguna epidemia viral causada por geminivirus ha sido atribuida formalmente al

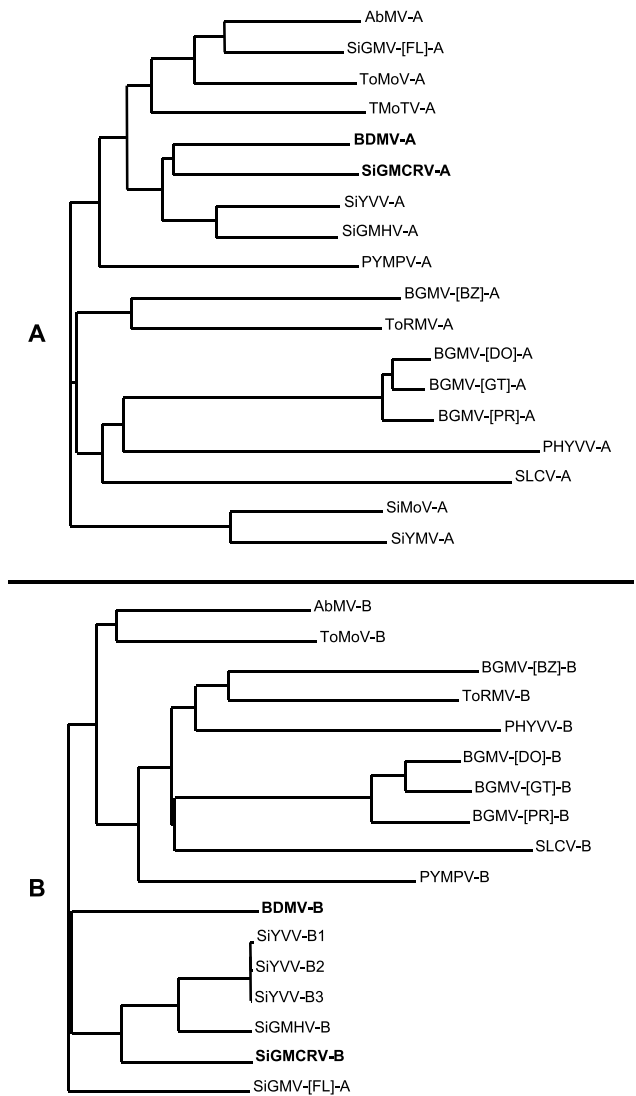


Figura 5. Árbol filogenético, incluyendo geminivirus del hemisferio occidental, calculado a partir de las secuencias completas del ADN A (A) o del ADN B (B). La nomenclatura utilizada es acorde con Fauquet *et al.* (2003).

SiGMCRV, también es cierto que, en la mayoría de los casos, el diagnóstico correspondiente no se lleva a cabo o se realiza mediante métodos parcialmente ambiguos. Una complicación adicional se deriva del hecho de que las epidemias virales podrían ser el resultado de infecciones mixtas e incluir virus de malezas y aquellos que típicamente inducen determinada sintomatología en un cultivo en particular. Por tanto, la importancia que los virus de malezas tienen con relación al brote de epidemias virales debe también considerarse en un contexto evolutivo. La evolución de un virus de plantas cultivadas a partir de uno

de plantas silvestres, y su posterior renombramiento, enmascara la contribución de los virus de malezas al brote de epidemias. No deberíamos esperar que dicha evolución involucre únicamente cambios menores en la secuencia de nucleótidos, puesto que pueden surgir genomas híbridos como producto de eventos de recombinación molecular entre diferentes virus, o bien la adaptación de un virus de malezas en un cultivo podría requerir cierto grado de modificación en la estructura y función de sus proteínas, favoreciendo la predominancia de ciertas formas mutantes mejor adaptadas al nuevo ambiente celular. Con esto en mente, la interpretación de los análisis filogenéticos debe ser realizada cuidadosamente.

¿Es el SiGMCRV un virus insociable?

El aparente antagonismo que el SiGMCRV exhibió, en etapas iniciales de la infección, con respecto a los otros geminivirus con los cuales fue coinoculado, es consecuente con la naturaleza específica de los geminivirus. Esta situación es consistente con un escenario general, en el cual el vector de begomovirus (*B. tabaci*) potencia la convergencia de diferentes begomovirus en las mismas plantas infectadas, dado su ámbito ampliado de hospedantes (Greathead 1986). De tal modo, la presión de selección, probablemente determinada por la eficiencia de las proteínas de cada virus para interactuar con factores de la planta necesarios para el éxito de la infección, determina si un virus prevalece o es atenuado.

El método de agroinoculación utilizado en este estudio excluye el efecto que la coexistencia temporal de diferentes begomovirus dentro del vector (*B. tabaci*) tiene sobre la predominancia de un virus que forma parte de un complejo viral. En este estudio se estudiaron detalladamente las interacciones planta-virus, y estas reflejan claramente la naturaleza competitiva de los geminivirus utilizados en los experimentos. Dicha situación, sin embargo, no es suficiente para especular acerca de la interacción de diferentes geminivirus en condiciones naturales. Existen numerosos reportes que evidencian que los begomovirus son capaces de intercambiar sus componentes genómicos en un fenómeno que se conoce como “pseudorrecombinación” (Frischmuth *et al.* 1997b, Höfer *et al.* 1997a, Unseld *et al.* 2000). La recombinación molecular de diferentes begomovirus ha sido también reportada bajo condiciones experimentales (Hou y Gilbertson 1996) y naturales (Berrie

et al. 2001, Monci *et al.* 2003, Jovel *et al.* 2003). Además, un efecto sinérgico ha sido reportado en la interacción de begomovirus infectando yuca (*Manihot esculenta*) en África (Fondong *et al.* 2000).

El hecho de que no se haya encontrado una interacción de sinergismo entre el SiGMCRV y el resto de geminivirus evaluados es, probablemente, consecuencia del corto período de tiempo en el cual dichos virus pueden coexistir en un hospedante como *N. benthamiana*, el cual escasamente sobrevive veinte semanas. En la naturaleza, por otro lado, los procesos de adaptación —mediante la recombinación, la mutación, o las interacciones sinérgicas con otros virus para formar complejos virales—, o de selección —mediante la competencia entre virus o la incompatibilidad con factores de la planta—, posiblemente ocurren a lo largo de prolongados períodos de tiempo y han conducido a la variabilidad genética y a la evolución dinámica que hoy observamos en los geminivirus.

Agradecimientos

Al Dr. Thomas Frischmuth y a la Dra. Christina Wege, por facilitar los clones infectivos de los virus incluidos en este estudio; al Prof. Dr. Holger Jeske, por brindarnos un espacio en su laboratorio; a la Dra. Pilar Ramírez, por facilitar las semillas de las variedades de frijol analizadas.

Literatura citada

- Abouzeid, AM; Polston, JE; Hiebert, E. 1998. Molecular characterization of a geminivirus infecting *Sida santaremensis* in Florida. Disponible en la base de datos NBI, bajo el número de acceso NC 002046.
- Bedford, ID; Briddon, RW; Brown, JK; Rosell, RC; Markham, PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* 125:311-325.
- Berrie, LC; Rybicki, EP; Rey, MEC. 2001. Complete nucleotide sequence and host range of South African cassava mosaic virus: further evidence for recombination amongst begomoviruses. *Journal of General Virology* 82:53-58.
- Costa, AS. 1975. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In Bird, J; Maramorosch, K. eds. *Tropical diseases of legumes*. New York, Academic Press. p. 27-49.
- Fauquet, CM; Bisaro, DM; Briddon, RW; Brown, JK; Harrison, BD; Rybicki, EP; Stenger, DC; Stanley, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421.
- Fondong, VN; Pita, JS; Rey, MEC; Kochko, A; Beachy, R; Fauquet, CM. 2000. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* 81:287-297.

- Frischmuth, T; Engel, M; Jeske, H. 1997a. Beet curly top virus DI DNA-mediated resistance is linked to its size. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement* 3:213-217.
- _____; Engel, M; Lauster, S; Jeske, H. 1997b Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted *Sida*-infecting geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology* 78:2375-2682.
- Gálvez, GE; Morales, FJ. 1989. Whitefly-transmitted viruses. *In* Schanertz, HF; Pastor-Corrales, MA. eds. *Bean production in the tropics*. Colombia, CIAT. p. 379-406.
- Greathead, AH. 1986. Host Plants. *In* Cock, MJW. ed. *Bemisia tabaci* -A literature survey. Silwood Park, UK, CAB International Institute of Biological Control. p. 17-26.
- Hanley-Bowdoin, L; Settlege, SB; Orozco, BM; Nagar, S; Robertson, D. 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Science* 18(1):71-106.
- Hilje, L; Costa, HS; Stansly, PA. 2001. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. *Crop Protection* 20:801-812.
- Höfer, P; Engel, M; Jeske H; Frischmuth, T. 1997a. Host range limitation of a pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite geminiviruses. *Molecular plant-microbe interactions : (MPMI)* 10:1019-1022.
- _____; Engel, M; Jeske, H; Frischmuth, T. 1997b. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Journal of General Virology* 78:1785-1790.
- Höhnle, M; Höfer, P; Bedford, ID; Briddon, RW; Markham, PG; Frischmuth, T. 2001. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a non-transmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology* 290:164-171.
- Hou, Y; Gilbertson, RL. 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. *Journal of Virology* 70(8):5430-5436.
- Jovel, J; Ramírez, P; Valverde, B; Hilje, L. 1999. Determinación de las fuentes de inóculo del moteado amarillo del tomate (ToYMoV), en Guayabo, Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* 54:20-26.
- _____; Reski, G; Rothenstein, D; Ringel, M; Frischmuth, T; Jeske, H. 2003. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus. *Archives of Virology* (en prensa).
- Moffat, A. 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* 286: 1835.
- Monci, F; Sánchez-Campos, S; Navas-Castillo, J; Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303:317-326.
- Morales, F; Niessen, A; Ramírez, B; Castaño, M. 1990. Isolation and partial characterisation of a geminivirus causing bean dwarf mosaic virus. *Phytopathology* 80:96-101.
- Padidam, M; Sawyer, S; Fauquet, C. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
- Polston, JE; Anderson, PK. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81(12):1358-1369.
- Rybicki, EP; Briddon, RW; Brown, JK; Fauquet, CM; Maxwell, DP; Harrison, BD; Markham, PG; Bisaro, DM; Robinson, D; Stanley, J. 2000. Family *Geminiviridae*. *In* Regenmortel, MHV; Fauquet, CM; Bishop, DHL. eds. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. San Diego, CA, US, Academic Press. p. 285-297.
- Rojas, A; Kvarnheden, A; Valkonen, JPT. 2000. Geminiviruses infecting tomato crops in Nicaragua. *Plant Disease* 84:843-846.
- Sambrook, J; Russell, DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3 ed. New York, CSHL Press.
- Unsel, S; Ringel, M; Konrad, A; Lauster, S, Frischmuth, T. 2000. Virus-specific adaptations for the production of a pseudorecombinant virus formed by two distinct bipartite geminiviruses from Central America. *Virology* 274:179-188.
- Wege, C; Saunders, K; Stanley, J; Jeske, H. 2001. Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminiviruses. *Journal of Phytopathology* 149:359-368.