

Utilización de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (ADN) y de amplificación mediante polimerasa (PCR) para la detección de geminivirus transmitidos por mosca blanca.

Douglas Maxwell, María R. Rojas y Robert Gilbertson. Departamento de Fitopatología, Universidad de Wisconsin, Madison, WI 53706 USA.

Los geminivirus son un grupo de virus de plantas importante económicamente, caracterizados por sus partículas pareadas y genoma de ADN de cadena sencilla. Su importancia como patógenos de plantas cultivadas ha crecido considerablemente en la última década (Brown y Bird, 1992). La evidencia científica reciente indica que existe variación genética entre los geminivirus que infectan el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y que esta variabilidad constituye una característica importante para considerar en la implementación de métodos de control de geminivirus. Para comprender la diversidad genética de estos virus, se requiere de técnicas especiales para caracterizar el genoma viral. Dos técnicas apropiadas son la **hibridación de ácidos nucleicos** y la **amplificación de ácidos nucleicos mediante polimerasa (PCR)**.

Métodos de hibridación de ADN. Los métodos de fijación de muestras a membranas absorbentes para su posterior hibridación con ADN complementario, requieren una preparación de muestra sencilla. Para la aplicación de una gota de la muestra a una membrana absorbente (dot blot), el tejido vegetal, (preferiblemente hojas jóvenes), es macerado en agua o solución amortiguadora, aplicando un pequeño volumen (5-10 μ l) sobre la membrana de nylon; y para la aplicación del tejido es la de macerar la muestra directamente sobre la membrana de nylon (squash blot), usando discos cortados de hojas (4 mm de diámetro). El tejido no absorbido es retirado antes de procesar la membrana tratada. Estas membranas pueden ser almacenadas por meses a temperatura ambiente o enviadas por correo. Las membranas tratadas son procesadas para realizar la hibridación en condiciones de baja o alta 'astringencia' [(condiciones físico-químicas que permiten la hibridación de ácidos nucleicos mediana (baja astringencia) o altamente relacionados (alta astringencia)] usando sondas de ADN 'generales' (que hibridizan con secuencias similares de ADN viral) o 'específicas' (que solo hibridizan con secuencias de ADN viral casi idénticas), respectivamente (Gilbertson *et al.*, 1991; Polston *et al.*, 1989). Por lo regular, se utilizan sondas radiactivas marcadas con 32 P. Sin embargo, se pueden usar métodos no radiactivos, tales como el uso de 'digoxigenina' (Genius Kit, Boehringer Mannheim) y 'biotina' (Photo Gene Nucleic Acid Detection Systems, Gibco BRL).

Las sondas 'generales' consisten en un mezcla de moléculas 'A' del ADN de diversos geminivirus representativos de la diversidad existente en el hemisferio occidental, por ejemplo, aislamientos del BGMV de America Central y del Sur, otros geminivirus de frijol, como el del mosaico enano y del 'calico'. Estos virus, sin embargo, pueden ser detectados específicamente por sondas preparadas a partir del componente 'B' del

genoma viral (el cual posee secuencias menos conservadas que el componente ADN-A de los geminivirus), en condiciones de alta astringencia (Gilbertson *et al.*, 1991).

Mediante el uso de sondas generales y específicas, Gilbertson *et al.* (1991) demostraron que varias malezas previamente relacionadas con el mosaico dorado del frijol en la República Dominicana, no eran hospederas del virus causal. Estas malezas incluían el *Croton lobatus*, *Urena lobata* y *Bastardia bivalvis*. Sorpresivamente, la especie *Rhynchosia mínima* hibridizó con sondas específicas para los aislamientos tanto de Centro America como de la America del Sur, así como para otro geminivirus del frijol (mosaico enano). Se desconoce si la *R. mínima* puede estar infectada con estos tres tipos de geminivirus o con un geminivirus relacionado a los tres tipos de geminivirus del frijol mencionados.

La concentración de un virus puede ser estimada también usando sondas de ADN, lo cual ha permitido establecer una relación entre grados intermedios de resistencia genética y títulos bajos del virus (Gilbertson *et al.*, 1991).

El Uso de iniciadores degenerados en PCR. La especificidad de la técnica de PCR esta basada en el uso de oligo-nucleotidos iniciadores (primers) complementarios a las regiones que flanquean la secuencia de ADN que se quiere amplificar. Los iniciadores degenerados han sido diseñados para amplificar tanto fragmentos del ADN-A como del ADN-B, aun cuando no hayan sido caracterizados previamente (Rojas *et al.*, 1993). Estos iniciadores han amplificado fragmentos de geminivirus de diversas plantas provenientes del hemisferio occidental, Africa, India, Taiwan, y Tailandia. Los fragmentos virales amplificados pueden ser detectados en geles de agarosa. Más aún, los fragmentos pueden ser clonados para ser usados como sondas de ADN específicas o, también, pueden ser secuenciados. La aplicación de esta tecnología ha permitido ampliar nuestro conocimiento sobre la diversidad genética de los geminivirus. Hasta el momento, siete geminivirus diferentes han sido secuenciados de tomate en el hemisferio occidental. La técnica del PCR ha sido usada también para amplificar ADN viral de mosca blanca vectoras, utilizando iniciadores específicos para el virus del enrollamiento y amarillamiento foliar del tomate (Navot *et al.*, 1992.).

Traducción: Francisco J. Morales, CIAT

Referencias

- Brown, J.K., and Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis.* 76:220-225.
- Gilbertson, R.L., Hidayat, S.H., Martinez, R.T., Leong, S.A., Faria, J.C., Morales, F., and Maxwell, D.P. 1991. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Dis.* 75:336-342.
- Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D., and Czosnek, H. 1992. Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 82:1199-1202.
- Polston, J.E., Dodds, J.A., and Perring, T.M. 1989. Nucleic acid probes for detection and strain discrimination of cucurbit geminiviruses. *Phytopathology* 79:1123-1127.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Russell, D.R. and Maxwell, D.P. 1993. Use of degenerated primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77:340-347.

English Summary*

DNA Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for Detection of Whitefly-transmitted Geminiviruses.

Geminiviruses are an economically important group of plant viruses characterized by their twinned virions and circular single stranded DNA genomes. Recent evidence indicates that genetic variation exists among geminiviruses infecting beans (*Phaseolus vulgaris*). Geminiviruses are well suited to detection and identification by DNA based technologies such as DNA hybridizations and polymerase chain reactions (PCR).

DNA Hybridization Methods. Dot and squash blot DNA hybridization methods involve simple sample preparation. For dot blots, leaf tissue is ground in water or a buffer and applied to nylon membranes.

General probes for detection of all known whitefly-transmitted bean-infecting geminiviruses are available. These probes are a mixture of DNA-A's of selected bean-infecting geminiviruses.

Specific probes (DNA-B's) for each of the bean-infecting geminiviruses are known and can be used to detect only isolates of BGMV type I, BGMV type II, BDMV or BCMoV, and these specific probes do not cross-hybridize.

* Prepared by F.J. Morales