

UN NUEVO TEST MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL PARA EL ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE LAS VENAS AMARILLAS DEL PEPINO (CVYV) Y EL VIRUS DEL AMARILLO DEL PEPINO (CYSDV) EN *CUCURBITACEAE*

FRANCISCO M. GIL-SALAS,
DIRK JANSSEN
ISABEL M. CUADRADO

Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria
y de la Producción Ecológica (I.F.A.P.A., C.I.C.E.),
Junta de Andalucía, 04745 La Mojonera, Almería, España

RESUMEN

Un ensayo basado en tecnología Taqman® ha sido desarrollado para el estudio epidemiológico de los dos virus de mayor incidencia e impacto económico presentes en los cultivos de cucurbitáceas en la región de Almería. A través del análisis de forma individual de su vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci*, ambos virus fueron detectados y cuantificados con el objeto de conseguir una herramienta fiable, rápida y sensible para este tipo de estudios. Este método incluye un control interno para la detección de un gen de *Bemisia tabaci* (18S), de esta forma los resultados obtenidos pueden ser normalizados y además evitar falsos positivos. Este test sería también de mucha utilidad para el estudio de las relaciones planta-virus-vector.

Palabras clave: *Cucumber vein yellowing virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, Taqman®, *Bemisia tabaci*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Controles positivos de aislados de CVYV y CYSDV fueron recogidos de cultivos de cucurbitáceas en la provincia de Almería y mantenidos en plantas de pepino, *Cucumis sativus* variedad Marianna RZ, en jaulas mediante transmisión por mosca blanca. Los adultos de *Bemisia tabaci* a analizar se recogieron el 15 de febrero, 1 de abril y 23 y 28 de mayo de cultivos de pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*Cucumis melo* L.), calabacín

(*Cucurbita pepo* L.), sandía (*Citrullus lanatus* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) de invernaderos del poniente almeriense. Las moscas blancas se guardaron en micro tubos que contenían etanol al 70%.

Un total de 592 moscas blancas fueron recogidas de los cultivos anteriormente señalados, extraídos sus ácidos nucleicos y analizadas de forma individual para cada uno de los dos virus (CVYV y CYSDV), así como para el control interno diseñado para ellas (18S). Para estos análisis se diseñaron primers y sondas específicos (tabla 1) basándonos en secuencias disponibles en bases de datos públicas y utilizando el programa informático Primer Express 2.0.

Las reacciones RT-PCR a tiempo real fueron realizadas en tubos individuales (25µL) en placas de reacción de 96 pocillos en un ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Los extractos de mosca blanca (1µL) se añadieron a un mix (24µL) que contenía los reactivos necesarios para la reacción.

Las condiciones de reacción usadas fueron 30 min a 48 °C para la retrotranscripción, 10 min a 95 °C como paso inicial para la activación de la polimerasa, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Todos los análisis, incluidos aquellos para la construcción de las curvas estándar, fueron realizados por duplicado. Las concentraciones de los primers y las sondas se optimizaron como se describe en el protocolo Taqman® universal PCR master mix (Applied Biosystems).

El incremento en la intensidad de emisión de la radiación fue medido durante la etapa de amplificación por el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7900 HT. La adquisición de datos y su manejo se realizaron con la versión 2.2.2. del programa de detección de secuencias (Applied Biosystems). Brevemente indicar que un umbral fue asignado en la fase logarítmica del producto de acumulación. Así, el punto al cual la curva de amplificación cruza el umbral es definido como el valor de ciclo umbral, determinado éste por C_T . Cuando se producen incrementos de la secuencia buscada en la PCR, los valores de C_T decrecen linealmente pudiéndose así utilizar este parámetro como medida cuantitativa de la cantidad de secuencia objetivo encontrada en la muestra. Valores de C_T por debajo de 40 ciclos muestran resultados positivos y por lo tanto C_T iguales o superiores a 40 se consideraron negativos (figura 1).

ANÁLISIS CUANTITATIVO RELATIVO

Productos de PCR de CVYV, CYSDV y *Bemisia tabaci* fueron cuantificados usando el reactivo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (invitrogen). A partir de ellos se elaboraron curvas estándar para hacer una presentación gráfica de los resultados además de una comparación estadística de las cantidades de virus presentes en las moscas blancas recogidas de los distintos cultivos mediante un análisis de regresión. La expresión normalizada media (MNE) fue calculada de acuerdo a la ecuación 1. Esta ecuación usa el valor medio de las C_T de los virus (cada muestra se hace por duplicado), el valor medio de la C_T del control interno (también por duplicado) y sus correspondientes ordenadas en origen y pendientes a partir de las curvas estándar calculadas.

Ecuación 1.

$$MNE = \frac{10 \frac{\text{average } (T_{CT1}, T_{CT2}) - \text{Intercept}_T}{\text{Slope}_T}}{10 \frac{\text{average } (R_{CT1}, R_{CT2}) - \text{Intercept}_R}{\text{Slope}_R}}$$

Todos los parámetros de la ecuación anterior tienen disponibles errores asociados con ellos mismos, por lo tanto es posible calcular la varianza (ecuación 2) y también el error estándar del valor de MNE usando una aproximación de la serie de Taylor. De esta forma un análisis de regresión ponderado fue realizado utilizando el error calculado.

Ecuación 2.

$$\sigma_{MNE}^2 \approx \left(\ln 10 * 10^{\left[\frac{x-b}{z} - \frac{a-c}{y} \right]} \right)^2 \left(\frac{\sigma_x^2}{z^2} + \frac{\sigma_a^2}{y^2} + \frac{\sigma_b^2}{z^2} + \frac{\sigma_c^2}{y^2} + \frac{(a-c)^2 \sigma_y^2}{y^4} + \frac{(x-b)^2 \sigma_z^2}{z^4} \right)$$

Virus, cultivos y efectos de interacción fueron investigados y estudiados a un nivel de significancia del 5%. Los análisis se realizaron usando el programa estadístico GenStat® 8.

RESULTADOS

Un total de 592 adultos de *Bemisia tabaci* recogidos de los cultivos de pepino, melón, sandía, calabacín (huéspedes naturales) y pimiento (no huésped) fueron analizados individualmente. El uso de primers y sonda específicos para *Bemisia tabaci* permitió confirmar que RNA amplificable había en todas las muestras, es decir, era de buena calidad y no contenía inhibidores de la PCR que pudieran impedir la amplificación dando como resultado falsos negativos. De todas estas moscas blancas, 82 (13,9%) fueron positivas para CVYV y 59 (10,0%) para CYSDV. Moscas blancas virulíferas fueron detectadas en todos los cultivos excepto en el de sandía (0/15), y sólo 2 insectos de los 60 recogidos en pimiento tenían cantidades detectables de virus (figura 2). Diecinueve (3,2%) de los individuos tenían dobles infecciones (CVYV y CYSDV), así que el 23,2% de los insectos infectados con CVYV estaban coinfectados con CYSDV y el 32,2% de los insectos con CYSDV estaban coinfectados con CVYV. La cantidad normalizada media (log MNE) de DNA específico de virus cuantificada en las 141 moscas blancas recogidas de los distintos tipos de cultivo varió de -3,24 a -0,38 en el caso de CVYV y de -3,48 a 1,11 en el caso de CYSDV.

El análisis de regresión reveló importantes diferencias entre los dos virus en relación al cultivo del cual las moscas blancas fueron recogidas (tablas 2 y 3). Las cantidades de CYSDV detectadas en las moscas blancas procedentes de melón y calabacín fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que las de CVYV. En cambio las moscas blancas recogidas de cultivos de pepino tenían cantidades mayores de CVYV que de CYSDV. Las cantidades de CYSDV en estas últimas moscas blancas fueron también significativamente menores que aquellas encontradas en melón y calabacín. Por el contrario, los niveles de CVYV en las moscas blancas procedentes de pepino fueron más altos que los de las moscas blancas procedentes de melón y calabacín (figura 3). Las cantidades normalizadas de virus en moscas blancas recogidas de cultivos de pimiento, excluidas del análisis de regresión, fueron entre -1,59 y -2,92 para CVYV y -2,29 para CYSDV.

DISCUSIÓN

Los tres elementos más importantes identificados para predecir la incidencia de CVYV y CYSDV en invernaderos de cucurbitáceas son el número de inmigrantes adultos de *Bemisia tabaci*, las diferentes dinámicas de expansión de CVYV y CYSDV en el

cultivo y en el caso de CYSDV sólo las máximas temperaturas alcanzadas en el invernadero. La determinación de la infectividad de las moscas blancas puede constituir otro importante factor de riesgo en un sistema de monitorización para mejorar las estrategias de control de estos virus. Recientemente la aplicación de técnicas moleculares para la detección de virus tales como hibridaciones dot-blot o RT-PCR lo han hecho posible. Sin embargo, ambos métodos tienden a ser laboriosos, carecen de un control interno y/o requieren una batería de muestras en el caso de la hibridación molecular. Estos inconvenientes han sido resueltos mediante el desarrollo de este ensayo Taqman® para CVYV y CYSDV. Además del ensayo virus específico, un control interno ha sido diseñado para el gen 18S rRNA de *Bemisia tabaci* permitiendo así éste en cada reacción confirmar si las extracciones de RNA del vector fueron satisfactorias previniendo la aparición de resultados falsos y negativos. Esta detección del gen 18S rRNA resulta también crucial para normalizar los datos obtenidos para la cuantificación.

Las proporciones de individuos virulíferos presentes en las poblaciones totales de insectos están relacionadas con la incidencia de virus en los cultivos y el número de virotes presentes en cada una de las moscas blancas constituye un umbral para la eficiencia de su transmisión como se ha podido ver en el Lettuce infectious yellows *Crinivirus*. Este ensayo Taqman® ha hecho posible estimar las proporciones de virus presentes en cada uno de los 5 tipos de cultivos distintos estudiados así como las cantidades de virus detectadas en cada insecto de forma individual (figuras 2 y 3).

En definitiva, el test RT-PCR a tiempo real desarrollado en este artículo es un método rápido, sensible y específico para detectar estos dos virus (incluidos ambos en la lista de acción A2 de patógenos de la EPPO), en moscas blancas *Bemisia tabaci* individuales. Este test también permitirá futuros estudios de relación planta-vector-virus, ya que constituye la mejor herramienta disponible para evaluar la presencia de vectores virulíferos en el campo pudiendo ser incluido además como un procedimiento de rutina para el estudio de riesgo por CVYV y CYSDV.

Tabla 1. Secuencias para los primers y las sondas^a diseñados para el ensayo Taqman® RT-PCR a tiempo real

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Posición	Dye	Quencher
CVYV-For	CGA AGG TCT CGA ATA AGC GTT C	9518–9539	–	–
CVYV-Rev	GAA TAC CCC ACA CCG AAC TTC A	9613–9634	–	–
CVYV-Pak	TAT TTA CGG TTT TAG TAA GAG TTT GGG ATC CGC AG	9552–9587	FAM	BHQ1
CYSDV-For	GCT TAA TGT GGG AGA AGT TCT CCT A	843–867	–	–
CYSDV-Rev	TCT GGA TAT AAC CTT CAG ACA CTC CTT	930–956	–	–
CYSDV-Lid	CTC CGT GCG CTC GTT AGG TAC CGG	882–905	VIC	MGB-NFQ
Bemisia-3F	AAG GAT CAT TGT CGA ACT CGA	3–18	–	–
Bemisia-65R	CCT GTG TCC CGC GGG	51–61	–	–
Bemisia-27T	AAG GTC TAT CCG ACC CCG AGC CG	27–49	JOE	TAMRA

^a FAM, 6-carboxyfluorescein; VIC, PEBiosystems; JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein; BHQ1, black hole quencher-1; MGB-NFQ, minor groove binder-non-fluorescence quencher; TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine.

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza acumulado de la cantidad media normalizada (Log MNE) procedentes del análisis de regresión de los virus CVYV y CYSDV en moscas blancas recogidas de cultivos de pepino, melón y calabacín

Grupo	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Varianza ratio	F Probabilidad
Virus	1	0.77	0.77	1.24	0.267
Cultivo	2	1.17	0.58	0.95	0.391
Virus*Cultivo	2	34.87	17.44	28.27	<0.001
Residual	132	81.42	0.62		
Total	137	118.23	0.86		

Tabla 3. Parámetros estimados^a de la cantidad normalizada (Log MNE) procedentes del análisis de regresión de los virus CVYV y CYSDV en moscas blancas recogidas de cultivos de pepino, melón y calabacín

Parámetro	Estimado	Standard Error	t – valor (132)	t Probabilidad
Constante	-1.66	0.11	-14.51	<0.001
Virus CYSDV	-0.65	0.17	-3.76	<0.001
Cultivo Melón	-0.40	0.20	-2.02	0.045
Cultivo Zucchini	-0.90	0.21	-4.24	<0.001
Virus CYSDV*Cultivo Melón	1.38	0.30	4.53	<0.001
Virus CYSDV*Cultivo Zucchini	2.57	0.37	6.99	<0.001

^a Los parámetros estimados son las diferencias comparadas con el nivel de virus referencia, CVYV y cultivo de pepino (la constante).

Figura 1. Campo de amplificación de una reacción. El umbral viene representado por la línea verde horizontal

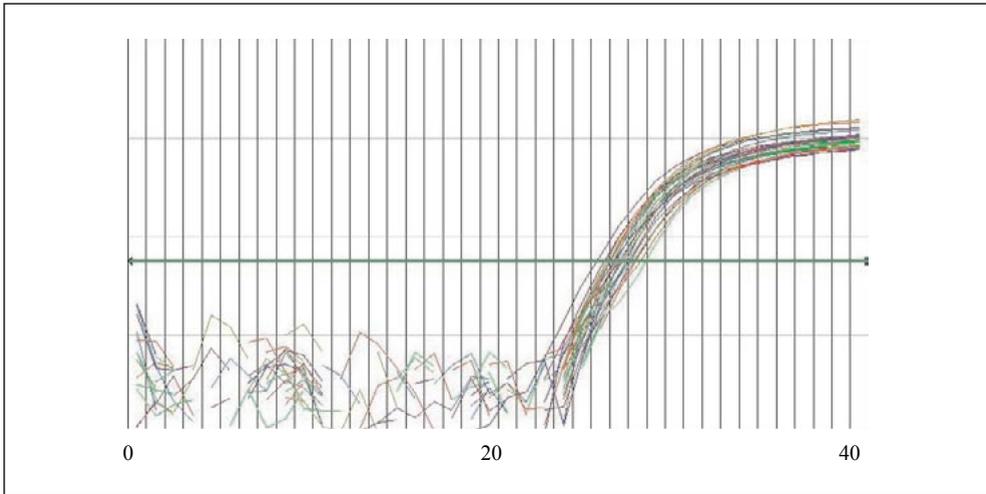


Figura 2. Aparición natural de CVYV y CYSDV en adultos de *Bemisia tabaci*. El número de moscas blancas detectadas con cada uno de los virus aparece indicado encima de cada barra

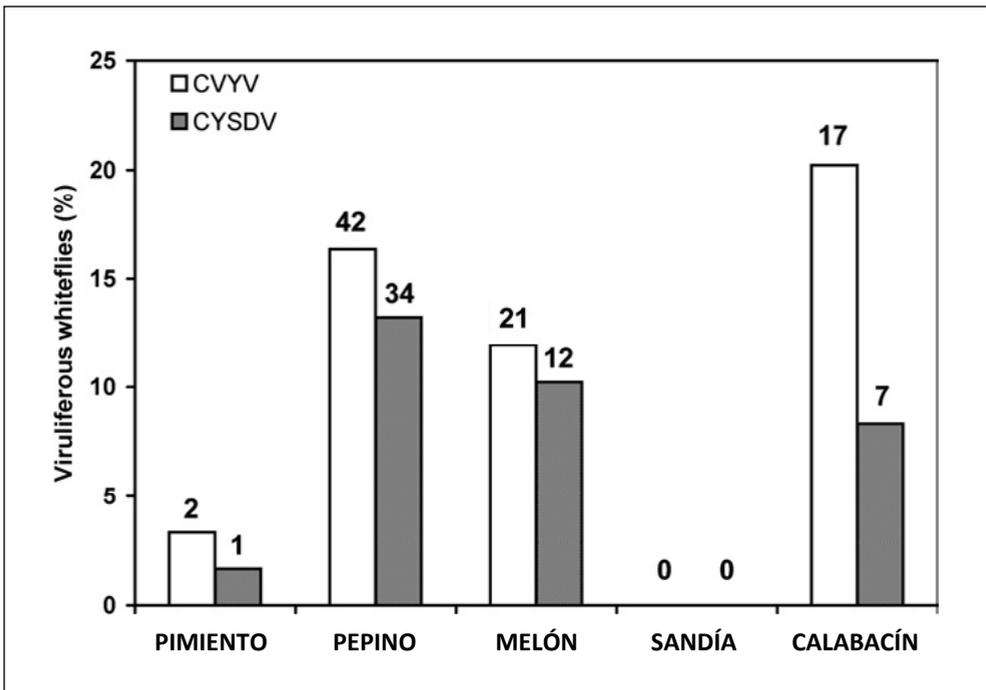


Figura 3. Cantidades normalizadas de CVYV y CYSDV (Log MNE) a un intervalo de confianza del 95% en individuos de *Bemisia tabaci* recogidos de diferentes cultivos

