

Caracterización molecular de virus
emergentes patógenos de tomate y pimiento
y virus persistentes de aguacate

FRANCISCO VILLANUEVA MONTIEL



Tesis Doctoral
Universidad de Málaga
2014





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, GENÉTICA Y FISIOLÓGIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

TESIS DOCTORAL

Caracterización molecular de virus emergentes patógenos de tomate y pimiento y virus persistentes de aguacate

Memoria presentada por el Licenciado en Biología

Francisco Villanueva Montiel

para optar al grado de

Doctor en Biología
por la Universidad de Málaga

Director

Dr. Jesús Navas Castillo



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea

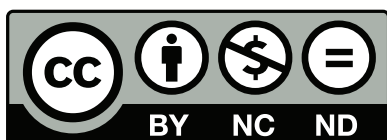
Málaga, enero de 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Francisco Villanueva Montiel

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

RESUMEN

La mayoría de virus de plantas han sido descubiertos por producir enfermedades en especies de interés agronómico. Estos virus están asociados al huésped en una relación a corto plazo: infectan la planta, se replican rápidamente causando síntomas, son transmitidos horizontalmente por contacto o mediante un vector biológico y finalmente se convierten en infecciones crónicas o provocan la muerte de su hospedador. Sin embargo, también existen virus que mantienen un estilo de vida persistente en la planta sin causar síntomas aparentes, a los que se ha denominado virus crípticos. Este trabajo se ha centrado en virus patogénicos que afectan a los dos principales cultivos hortícolas intensivos del sureste peninsular español, tomate y pimiento y en virus persistentes del principal cultivo subtropical de nuestro país, el aguacate.

La extendida utilización del control biológico de insectos en los cultivos protegidos de pimiento en el sudeste peninsular ha conseguido limitar los niveles de insectos vectores de virus como mosca blanca y trips. Sin embargo, parece estar produciendo un aumento de los brotes de pulgones, también vectores de virus que afectan a este cultivo. Por ello, se planteó analizar el estado sanitario del cultivo de pimiento en relación a la presencia de virosis, fundamentalmente aquellas transmitidas por insectos. Se llevaron a cabo muestreos sistemáticos en las tres principales provincias del sudeste peninsular productoras de pimiento (Málaga, Almería y Murcia) durante tres temporadas consecutivas utilizando métodos de diagnóstico serológicos y moleculares para los principales virus que afectan a este cultivo en la cuenca del Mediterráneo. Los virus transmitidos por mosca blanca o trips apenas están presentes en las zonas estudiadas. Por otra parte, los virus transmitidos por pulgones sólo parecen tener una relativa importancia en la provincia de Málaga, donde coexisten los cultivos protegidos con los cultivos al aire libre y el control biológico con el control químico tradicional. Los análisis llevados a cabo han permitido detectar por primera vez la presencia del polerovirus *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) en España.

Una de las enfermedades transmisibles por mosca blanca emergentes a nivel mundial es el amarilleo del tomate causado por el crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Este virus está ampliamente distribuido en todas las zonas costeras mediterráneas de nuestro país así como en las

Islas Canarias y afecta principalmente a tomate y pimiento. En este trabajo se ha llevado a cabo la secuenciación completa del genoma (RNA1, RNA2) de cuatro aislados de ToCV, tres de España (uno de ellos proveniente de pimiento) y uno de Brasil. La disponibilidad de la primera secuencia completa de un aislado de ToCV de América del Sur y de tres nuevos aislados de España ha puesto de manifiesto la alta identidad entre aislados geográficamente alejados y la existencia de dos tipos de RNA2, confirmando la diversidad previamente descrita para el RNA1. La secuenciación del aislado español 2.5 de ToCV pone de manifiesto la importancia de fenómenos de pseudorrecombinación en la generación de adicional complejidad en la familia *Closteroviridae*.

En relación a los virus crípticos o persistentes de aguacate, en este trabajo se ha confirmado la naturaleza viral de las bandas de RNA de doble cadena (dsRNA) presentes en numerosos cultivares de aguacate. La clonación, secuenciación y análisis filogenético de una de estas bandas de alto peso molecular (13459 pb) presentes en el cultivar Fuerte, ha puesto de manifiesto que corresponde al genoma de un nuevo miembro del género *Endornavirus* (familia *Endornaviridae*), para el que se propone el nombre *Persea americana endornavirus* (PaEV), que es el primer miembro de esta familia caracterizado a partir de un huésped leñoso. Las infecciones por PaEV llevan asociadas una molécula de dsRNA de pequeño tamaño que ha sido caracterizada molecularmente y que parece corresponder al primer dsRNA satélite descrito asociado a un miembro de la familia *Endornaviridae*. Asimismo se ha caracterizado un nuevo virus de dsRNA tripartito presente en el cultivar Fuerte que está filogenéticamente relacionado con los miembros del género *Chrysovirus* (familia *Chrysoviridae*) y que podría constituir un nuevo género en esta familia.

ABSTRACT

Most plant viruses have been discovered because they cause diseases in crops. These viruses are associated with the host in a short term relationship including infection of the plant, rapid replication causing symptoms, and horizontal transmission by contact or by a biological vector. However, some plant viruses maintain a persistent lifestyle in the host without causing any apparent symptoms; they have been called cryptic viruses. This work has focused on pathogenic viruses affecting the two main intensive horticultural crops in southeastern Spain, tomato and pepper, and persistent viruses infecting the main subtropical tree crop grown in our country, avocado.

The widespread use of biological control of insects in protected pepper crops in southeastern Spain has limited the levels of insect vectors of viruses as whiteflies and thrips. However, this seems to be causing an increase in outbreaks of aphids, vectors of viruses also affecting pepper. Therefore, in this work we analyzed the prevalence of viruses infecting pepper crops, mainly those transmitted by insects. We carried out systematic sampling in the three main producer provinces of southeastern Spain (Malaga, Almería and Murcia) during three consecutive seasons using serological and molecular methods for diagnosis of the main viruses affecting this crop in the Mediterranean basin. Viruses transmitted by whiteflies or thrips were barely present. Moreover, viruses transmitted by aphids only appeared to have a relative importance in the province of Málaga, where protected and open-field crops and biological and traditional chemical control coexist. We also reported by the first time the presence of the polerovirus Pepper vein yellows virus (PeVYV) in Spain.

One of the most important emerging whitefly-transmitted virus disease is the yellowing of tomato caused by the crinivirus (genus Crinivirus, family Closteroviridae) Tomato chlorosis virus (TOCV). This virus is widely distributed in the Mediterranean coastal areas of Spain and in the Canary Islands, affecting tomato and pepper. In this work we have obtained the complete sequencing of the genome (RNA1, RNA2) of four TOCV isolates, three from Spain (one from pepper) and one from Brazil. The availability of the first complete sequence of a ToCV isolate from South America and three new isolates from Spain has revealed a high identity between isolates geographically distant and the existence of two types of RNA2, thus confirming the diversity previously described for RNA1. The sequence of the Spanish ToCV isolate 2.5

has highlighted the importance of pseudo-recombination in generating additional genome complexity in the family Closteroviridae.

In relation to the cryptic avocado viruses, the viral nature of the double-stranded RNA (dsRNA) bands present in many cultivars has been established. Cloning, sequencing and phylogenetic analysis of the high molecular weight band (13459 bp) present in cv. Fuerte have revealed that it corresponds to the genome of a new member of the genus Endornavirus (family Endornaviridae), for which we propose the name *Persea americana endornavirus (PaEV)*. PaEV is the first member of this family isolated from a woody plant host. Associated to PaEV infections, we have found a small dsRNA molecule that, after molecular characterization, seems to correspond to the first dsRNA satellite associated with a member of the family Endornaviridae. We have also characterized a novel tripartite dsRNA virus present in cv. Fuerte that is phylogenetically related to members of the genus Chrysovirus (family Chrysoviridae) which could constitute a new genus in this family.

CONCLUSIONES

1. La extendida utilización del control biológico de insectos en los cultivos protegidos de pimiento en el sudeste peninsular español parece limitar significativamente la presencia de virus en este cultivo. Los virus transmitidos por pulgón sólo parecen tener una relativa importancia en la provincia de Málaga, donde coexisten los cultivos protegidos con los cultivos al aire libre y el control biológico con el control químico tradicional.
2. Se ha detectado por primera vez en España la presencia *Pepper vein yellows virus*, un polerovirus que podría ocasionar serios daños en la producción de pimiento.
3. La disponibilidad de la primera secuencia completa de un aislado de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) de América del Sur y tres nuevas de España ha puesto de manifiesto por una parte la alta identidad entre aislados geográficamente alejados y por otra la existencia de dos tipos de RNA2, confirmando la variabilidad existente en el RNA1.
4. La secuenciación del aislado 2.5 de ToCV pone de manifiesto la importancia de fenómenos de pseudorrecombinación en la generación de adicional complejidad en la familia *Closteroviridae*.
5. La disponibilidad de la secuencia completa de un aislado de ToCV de pimiento proporciona la base para posteriores estudios de adaptación al huésped.
6. Se confirma la naturaleza viral de la bandas de RNA de doble cadena presentes en numerosos cultivares de aguacate, habiéndose caracterizado molecularmente el patrón de dichas bandas en el cultivar Fuerte.
7. Una de estas bandas corresponde al genoma de un nuevo miembro de la familia *Endornaviridae*, *Persea americana endornavirus* (PaEV), el primero caracterizado en un huésped leñoso, el cual está relacionado con otros endornavirus de plantas como los que infectan arroz cultivado, arroz salvaje y judía.

- 8.** La banda de RNA de doble cadena de pequeño tamaño asociada a las infecciones de PaEV podría corresponder al primer RNA de doble cadena satélite asociado a un virus de la familia *Endornaviridae*.
- 9.** La caracterización de *Persea americana* chrysovirus (PaCV), un virus persistente de aguacate con genoma tripartito de RNA de doble cadena, apoya la creación de un nuevo género en la familia *Chrysoviridae* cuyos miembros infectan plantas.
- 10.** El endornavirus y el chrysovirus caracterizados en el cultivar Fuerte están presentes en otras entradas de aguacate del banco de variedades del IHSM “La Mayora”.