

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS
QUE AFECTAN A LA HIGUERA (*Ficus carica* L.) EN CHILE MEDIANTE RT-
PCR**

**Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención Sanidad Vegetal**

PAOLA UBIDIA VÁSQUEZ

Profesores Guía

NICOLA FIORE

NICOLÁS FRANCK

Profesores Consejeros

JAIME AUGER

LORETO PRAT

Santiago, Chile

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**Identificación y caracterización molecular de los virus
que afectan a la higuera (*Ficus carica* L.) en Chile mediante RT-PCR**

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención Sanidad Vegetal

PAOLA UBIDIA VÁSQUEZ

Calificaciones

PROFESOR GUÍA:

Nicola Fiore Ing. Agr. Ph.D.	Aprobado	-----
------------------------------	----------	-------

PROFESOR COLABORADOR:

Nicolás Franck Ing. Agr. Ph.D.	Aprobado	-----
--------------------------------	----------	-------

PROFESORES EVALUADORES:

Jaime Auger Ing. Agr. Ph.D.	Aprobado	-----
-----------------------------	----------	-------

Loreto Prat Ing. Agr. Ph.D.	Aprobado	-----
-----------------------------	----------	-------

Santiago, Chile

2014

A mi familia querida que siempre ha estado
conmigo a pesar de la distancia.

A mi Byron, gracias por tu
infinito apoyo y ayuda

A Dios, que siempre me ha
cuidado en esta gran travesía

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y colaboración de muchas personas e instituciones, y también hay a quienes debo demasiado.

A la Universidad de Chile por su respaldo institucional, científico y económico, en especial a la Facultad de Agronomía y personal administrativo. A Jeannette, que como “Mamá Gallina” siempre está pendiente de nosotros y dispuesta a ayudarnos en lo que se pueda. De verdad, muchas gracias...

Al Dr. Nicola Fiore, director de esta tesis de disertación, por sus sabios consejos, ayuda oportuna, confianza y especialmente paciencia infinita. Muchas, muchísimas gracias...

Al Dr. Nicolás Franck por sus consejos guía y paciencia.

Al Dr. Alan Zamorano por su invaluable ayuda en todos los temas del laboratorio, por sus consejos e infinita disposición para cualquier necesidad de todos los que conformamos el laboratorio de Fitovirología, por su desinteresada tutela y enseñanza de muchos de los aspectos importantes de la biología molecular práctica necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A Ximena González, Lucy Rivera, Valeria Longone, Andrea Cerda, Claudia y Ana María Pino, por su preocupación y constante interés, porque supieron compartir algunos de sus conocimientos profesionales en el manejo de este trabajo. Gracias por su ayuda y disposición constante. El laboratorio no caminaría sin ustedes.

A Vicente Medina Piles, que me ayudó con las fotos de microscopía electrónica.

A aquellas personas que me dieron todas las facilidades en las plantaciones de higuera, especialmente a Cristián Muñoz, Luciano Campos, Víctor Muñoz, Fernando Catalán y Rogelio Cataldo.

A mi familia, que aunque estando lejos sin ver las largas horas de trabajo, siempre estaban preocupados de mí. Por los días enteros que me perdía del mundo cibernético por la tesis, a cada uno de ustedes, mil gracias...

A la mejor de mis amigas, Mayerly, quien supo darme aquellas palabras de aliento en el momento preciso cuando me sentía perdida y desorientada.

A ti, que me apoyaste en cada minuto del día para avanzar en el trabajo, por tantas veces que me fuiste a ver cuando me quedaba hasta tan tarde en la Universidad, por todo el tiempo que me donaste, sin importar si alzaba la mirada para verte. Mil gracias ahora y siempre... Gracias por ser un faro de esperanza y una razón más para seguir.

A Dios, porque sin tu mano, esta tesis nunca hubiera podido ser escrita.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
El cultivo de la higuera	3
Origen y generalidades.....	3
Descripción biológica y requerimientos	3
Usos y beneficios de la higuera.....	3
Producción mundial y chilena.....	4
Enfermedades y plagas de la higuera	4
Enfermedades de origen viral en higuera.....	5
La enfermedad del Mosaico de la Higuera	5
Virus detectados en higuera	6
Distribución geográfica.....	9
Medidas de control.....	10
Justificación.....	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
Hipótesis.....	12
Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Recolección de muestras de higuera en el campo.....	13
Área de muestreo.....	13
Observación de la sintomatología	14
Microscopía electrónica	15
Análisis molecular.....	16
Extracción de ácidos nucleicos totales (TNA).....	16
Transcripción reversa	16
Detección de virus con PCR	17
Caracterización molecular.....	19
Purificación	19
Clonamiento	20
Secuenciación.....	20
Caracterización de zonas más amplias del genoma	20
Análisis bioinformático.....	21
RESULTADOS.....	22
Recolección de muestras de higuera en el campo.....	22

Sintomatología observada	26
Microscopía electrónica	29
Análisis molecular.....	31
Caracterización molecular.....	31
DISCUSIÓN	37
Prospección	37
Síntomatología	38
Microscopía.....	39
Caracterización molecular.....	39
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
APÉNDICES	50

RESUMEN

La Enfermedad del Mosaico de la Higuera está ampliamente distribuida en el mundo y ha sido reportada en varios países, especialmente en la cuenca del Mediterráneo. Sin embargo, para Chile no existe ningún registro de la situación viral de la higuera. En este trabajo se realizó una prospección en los principales cultivos comerciales de este frutal distribuidos en las Regiones de Coquimbo (IV), Valparaíso (V), Libertador Bernardo O'Higgins (VI) y Región Metropolitana. Las variedades "Black Mission" (higo negro) y "Kadota" (higo blanco) fueron encontradas más comúnmente. La detección en las 120 muestras estudiadas se realizó mediante la técnica de RT-PCR. Los virus prospectados fueron FLMaV-1, FLMaV-2, FMV, FMaV, FFkaV, AFCV-2, FBV-1, FCV, FLV-1 y AFCV-1, de los cuales no fueron detectados los tres últimos. El virus que fue encontrado con mayor frecuencia fue FBV-1 (84,03%), seguido por FMV con una incidencia de 69,75% y FLMaV-1 en 62,18% de las muestras. Las infecciones virales fueron simples (20%), dobles (20,83%), triples (29,17%), cuádruples (25,83%) o quintuples (0,83%), y 3,33% de las plantas no presentaron ninguno de los virus prospectados. Finalmente, se realizó una caracterización molecular de los aislados virales encontrados en Chile para los virus FMV, FLMaV-1, FLMaV-2, FFkaV, FMaV y AFCV-2, que confirman esta prospección y clasifican a estos virus a nivel molecular con otras cepas encontradas en diversos países.

Palabras clave: prospección viral, sintomatología, interacción, secuenciación, aislados chilenos

ABSTRACT

The Fig Mosaic Disease (FMD) is widely distributed worldwide and it has been reported in several countries, especially around the Mediterranean basin. However, there is no record of the viral situation of fig trees in Chile. In this research, a viral prospection was done in the main commercial fig orchards, distributed in the regions of Coquimbo (IV), Valparaíso (V), Libertador Bernardo O'Higgins (VI) and Metropolitan Region. "Black Mission" (black fig) and "Kadota" (white fig) were the fig varieties that were most commonly found. 120 samples were analyzed and the detection was made with RT-PCR. FLMaV-1, FLMaV-2, FMV, FMMAV, FFkaV, AFCV-2, FBV-1, FCV, FLV-1 and AFCV-1 were analyzed in each sample, and the last three viruses named here were not found. The most frequent virus was FBV-1, found in 84,03% of the samples, followed by FMV (69,75%) and FLMaV-1 (62,18%). The viral infections were simple (20%), double (20,83%), triple (29,17%), quadruple (25,83%) or quintuple (0,83%), and 3,33% of the plants did not present any of the analyzed virus. Finally, a molecular characterization of the viral isolates found in Chile was conducted for FMV, FLMaV-1, FLMaV-2, FFkaV, FMMAV and AFCV-2, which confirms the results of this prospection and classifies these viruses at a molecular level with viral isolates of other countries.

Keywords: viral prospection, symptoms, interaction, sequencing, Chilean isolates

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la higuera

Origen y generalidades

La higuera pertenece a la familia de las moráceas y al género *Ficus*, que incluye entre 600 y 1400 especies, las cuales se encuentran en su mayoría en las regiones tropicales o subtropicales. El único miembro perteneciente a este género que es cultivado por sus frutos es *Ficus carica* L. (Lavin y Reyes, 2004; Stover y Aradhya, 2007). Esta especie tiene su origen en el Asia Oriental y la cuenca del Mediterráneo (Lavin y Reyes, 2004).

Descripción biológica y requerimientos

El comúnmente denominado fruto, es en realidad un siconio, un pedúnculo hueco y carnoso que contiene a las pequeñas flores adheridas a la pared interior (Starr *et al.*, 2003; Lavin y Reyes, 2004). Los frutos verdaderos son pequeños aquenios que se desarrollan de estas flores.

La producción comercial no requiere de polinización, y su propagación es por estacas, lo cual facilita la multiplicación y el cultivo extensivo de este frutal (Brien y Hardy, 2002; Romero, 2005; Stover y Aradhya, 2007). No requiere de injertación, ya que se cultiva sobre sus propias raíces.

La higuera puede soportar temperaturas de hasta -9°C. Es tolerante a la sequía, sin embargo, su producción depende directamente de la disponibilidad de agua durante el crecimiento. El riego generalmente es por goteo o micro aspersión. La cantidad de agua ideal es de 350-400 mm por año.

Usos y beneficios de la higuera

El higo y la breva se consumen en fresco, como fruto deshidratado, en mermeladas y en postres (Brien y Hardy, 2002; Bravo *et al.*, 2011). Su consumo es muy beneficioso para la salud, ya que contiene gran cantidad de fito-nutrientes benéficos, anti oxidantes y vitaminas (Lansky y Paavilainen, 2011; Ghazi *et al.*, 2012). Adicionalmente, su alto contenido de calcio y potasio ayuda a mantener la presión sanguínea y a promover la densidad ósea; los frutos son efectivos para controlar el peso y reducir el colesterol; las hojas de la higuera son útiles para reducir el consumo de insulina en pacientes diabéticos; su consumo ayuda a prevenir el riesgo de cáncer de mama y de estómago (Sirisha *et al.*, 2010; Hashemi *et al.*, 2011); mejora la memoria; y el triptófano presente en los higos contribuye a mejorar el sueño y eliminar el insomnio (Pandey y Rizvi,

2009). El consumo de látex también ha sido usado para tratar úlceras y gota (Sirisha *et al.*, 2010; Ghazi *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los antioxidantes y polifenoles en hojas y frutos son potentes anti-inflamatorios, anti-alérgicos y anti-microbianos.

Producción mundial y chilena

El cultivo de la higuera cubre aproximadamente 427.000 ha a nivel mundial, siendo Turquía el principal productor (58.356 ha, 244.351 ton) (Elci *et al.*, 2012), seguido por Egipto (Elbeshehy y Elbeaino, 2011), Irán, Jordania, Israel, Grecia, Algeria y España (Caglar *et al.*, 2010).

En Chile, la producción de higos y brevas se ha limitado a pequeñas extensiones principalmente en huertos o quintas familiares (Romero, 2005). Sin embargo, durante los últimos años se ha notado un interés especial por la explotación a nivel comercial. Para el año 2009, se encuentran aproximadamente 107 ha plantadas, especialmente en las Regiones de Coquimbo (IV), Valparaíso (V), Libertador Bernardo O'Higgins (VI) y Región Metropolitana. Las variedades "Black Mission" (higo negro) y "Kadota" (higo blanco) son las más utilizadas para este propósito, con un rendimiento de 2-2,5 ton/ha en huertos jóvenes y de 10-14 ton/ha en huertos adultos (Romero, 2005). El fruto fresco, está dirigido principalmente a los mercados de contra-estación en Europa como Inglaterra, Suiza y Alemania, y recientemente, también a Canadá (Gatica, 2007) y a Estados Unidos desde el 2010 (USDA, 2001). Japón, Corea del Sur y Singapur son potenciales nuevos mercados¹.

Enfermedades y plagas de la higuera

La higuera puede verse afectada por diversas plagas y enfermedades. Los trips (*Graphidothrips stuardoi* Moulton), la conchuela blanca de la higuera (*Lepidosaphes ficus* Hall), el eriófido de la hoja (*Aceria ficus* Cotte) y las avispa (*Vespa germanica* F.) son los insectos que principalmente presentan un problema serio en las higueras. La roya (*Cerotelium fici* (Butl.) Arth. y *Phomopsis cinerescens* Trav. son hongos comunes cuando las condiciones de humedad los favorecen (Palmateer *et al.*, 2010). En Chile, se ha detectado *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, *Penicillium minioluteum* Dierckx, *Alternaria altemata* (Fr.) Keissler, *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., *Fusarium flocciferum* Corda y *Cladosporium herbarum* (Pers.) en pudriciones de postcosecha (Montealegre *et al.*, 2000). Los nemátodos (*Meloidogyne* spp.) son plagas importantes en este cultivo, especialmente en suelos arenosos. Adicionalmente, resulta gravemente

¹ Comunicación personal con Sr. Cristián Muñoz, gerente general de Hortícola Sudamericana, uno de los principales productores de higos de exportación.

afectada por la enfermedad denominada Mosaico de la Higuera, una virosis que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo.

Enfermedades de origen viral en higuera

La enfermedad del Mosaico de la Higuera

Los primeros registros de la enfermedad del Mosaico de la Higuera (Fig Mosaic Disease – FMD) fueron realizados por Condit en 1922 y Swingle en 1928 (Cağlayan *et al.*, 2009; Hafez *et al.*, 2011). Sin embargo, el primer estudio crítico fue conducido por Condit y Horne (1933). Las enfermedades virales en la higuera generalmente se presentan, tanto en hojas como en frutos, con manchas cloróticas claramente delimitadas, venas y hojas deformes o decoloradas, anillos cloróticos, necrosis localizada, caída prematura de frutos, hojas con mosaico en diversos patrones (Burnett, 1960; Elbeaino *et al.*, 2006). Los síntomas varían entre cada árbol, pues se pueden encontrar diferentes síntomas en una misma rama (Tzanetakis *et al.*, 2010). Por mucho tiempo, se ha considerado que estos síntomas estuvieran asociados a un complejo de virus que induce FMD y su gran variabilidad dependería de la interacción entre ellos (Elbeaino *et al.*, 2007a; Caglar *et al.*, 2010). Sin embargo, la etiología de esta enfermedad todavía no ha sido elucidada.

Según Segarra *et al.*, (2005), FMD puede reducir el vigor y la producción hasta un 30% o más, sin embargo la evaluación del verdadero impacto económico de esta enfermedad es difícil de dilucidar porque, al igual lo que sucede con otras virosis, los síntomas generalmente se confunden con el resultado de la acción de otros agentes tanto bióticos como abióticos. El desconocimiento de la enfermedad induce a un mayor costo de producción, tanto en vivero como en los huertos comerciales, debido a la aplicación de medidas de control inapropiadas.

En estudios ultra estructurales se han encontrado cuerpos de doble membrana (double membrane bodies - DMBs) asociados a plantas que presentaban síntomas de FMD (Serrano *et al.*, 2004; Salomon *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2008; Cağlayan *et al.*, 2009; Tzanetakis *et al.*, 2010; Elbeshehy y Elbeaino, 2011; Hafez *et al.*, 2011). Generalmente se encuentran asociados a células parenquimáticas o floemáticas (Castellano *et al.*, 2007). Se ha observado que estos cuerpos son de dos tipos: redondos a ovoides de 160-200 nm de tamaño, y partículas elongadas a casi flexuosas hasta de 1 µm de largo (Hafez *et al.*, 2011). Estos DMBs contienen un material proteináceo, finas fibrillas y, generalmente, se encuentran cerca de agregados de elementos filamentosos, semi rígidos que contienen carbohidratos y son parcialmente digeridos por pronasa (Hafez *et al.*, 2011). Se pensaba que estos cuerpos eran en realidad estructuras de virus de la familia Potyviridae, sin embargo también se encontraron en casi todos los miembros del

género *Emaravirus* (Serrano *et al.*, 2008; Çağlayan *et al.*, 2009; Hafez *et al.*, 2011; Walia *et al.*, 2012).

Tzanetakis *et al.*, (2010) lograron transmitir mecánicamente solo *Arkansas fig closterovirus 2* (AFCV-2) y *Fig badnavirus 1* (FBV-1) en *Glycine max*, *Nicotiana occidentalis*, *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. sylvestris* y *Pisum sativum* desde plantas con Mosaico de la Higuera.

Existe también una posibilidad de que los agentes causales de FMD no sean solamente de origen viral. Çağlayan *et al.*, (2007), encontraron un fitoplasma infectando a una reducida cantidad de plantas de higuera, lo cual fue confirmado por observaciones ultra estructurales (Çağlayan *et al.*, 2009). Por otro lado, Yakoubi *et al.*, (2007) detectaron la presencia de *Hop stunt viroid* (HSVd) y *Citrus exocortis viroid* (CEVd).

La higuera es hospedero de varias especies virales pertenecientes a diferentes familias (Closteroviridae, Bunyaviridae, Tymoviridae, Flexiviridae, Partitiviridae y Caulimoviridae) (Shahmirzaie *et al.*, 2012). También se han encontrado miembros putativos de la familia Potyviridae en Croacia, y se piensa que también podrían estar asociados con la enfermedad (Hafez *et al.*, 2011). Estas investigaciones comprueban la complejidad de FMD, cuya causa podría estar asociada a la interacción entre diferentes virus y/o patógenos.

Virus detectados en higuera

Fig leaf mottle-associated virus 1 (FLMaV-1)

Es un miembro de la familia Closteroviridae, género *Closterovirus*. Está constituido por un RNA de simple hebra (ssRNA) polaridad positiva (+), de aproximadamente 17,5 - 18 Kbp (Elbeaino *et al.*, 2007a). Es un virus filamentosos de hasta 1800 nm de largo (Elbeaino *et al.*, 2006). Está presente en plantas con síntomas de FMD. Es posible que su transmisión ocurra por *Planococcus ficus* (Caglar *et al.*, 2010; Elbeshehy y Elbeaino, 2011). La identificación de este virus se realiza mediante el análisis de un fragmento de 620 bp del gen homólogo de la proteína HSP70 (Elbeaino *et al.*, 2006). Este virus ha sido secuenciado parcialmente.

Fig leaf mottle-associated virus 2 (FLMaV-2)

También es miembro de la familia Closteroviridae, género *Ampelovirus* (Elbeaino *et al.*, 2006; Çağlayan *et al.*, 2010). Es un virus filamentosos ssRNA (+) de alrededor de 2100 nm de largo y 19Kbp aproximadamente. No se ha podido transmitir mecánicamente a plantas herbáceas (Elbeaino *et al.*, 2007a). La identificación de este virus se realiza mediante el análisis de un fragmento de 625 bp del gen homólogo de la proteína HSP70 (Elbeaino *et al.*, 2006). Guarda una identidad aminoacídica de 45% y nucleotídica de 28% con FLMaV-1. Es posible que su transmisión sea también por *Planococcus ficus* (Elbeshehy y Elbeaino, 2011). Este virus ha sido secuenciado parcialmente. Los

síntomas que probablemente están asociados a este virus, y a FLMaV-1 son manchas cloróticas irregulares y una decoloración general en las venas foliares (Elbeaino *et al.*, 2007a).

Fig mild mottle-associated virus (FMMaV)

Otro miembro de la familia Closteroviridae, género *Closterovirus* es *Fig mild mottle-associated virus* (FMMaV). Es un virus filamentoso de ssRNA (+) de aproximadamente 2000 nm de largo con una secuencia total de 6290 nt (Elbeaino *et al.*, 2009a; Elbeaino *et al.*, 2010).

Posee siete marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para diferentes proteínas: proteína homóloga a la HSP70; RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp); proteína de la cápside (CP); proteína menor de la cápside (CPm); una proteína hidrofóbica; una proteína de 64 KDa que siempre se presenta subsecuentemente después del gen HSP70h en los miembros de la familia Closteroviridae; una proteína de función desconocida (Elbeaino *et al.*, 2010). Ha sido secuenciado casi en su totalidad.

Arkansas fig closterovirus 1 y 2 (AFCV-1 y AFCV-2)

Recientemente se han descubierto dos virus de la familia Closteroviridae, género *Closterovirus*, asociados a la higuera, que están estrechamente relacionados con *Fig leaf mottle-associated virus 1 y 2*, y que se han denominado *Arkansas fig closterovirus 1 y 2* (AFCV-1 y AFCV-2) (Tzanetakis *et al.*, 2010). La detección de ambos virus se realiza con partidores que amplifican 375 bp y 1671 bp respectivamente (Tzanetakis *et al.*, 2010). Se presentan en plantas sintomáticas y asintomáticas. No existe mayor información de estos dos virus, incluso no hay secuencias disponibles en GenBank para AFCV-2.

Fig cryptic virus (FCV)

También se ha detectado la presencia de un virus de RNA de doble hebra (dsRNA) con un genoma bipartido, que fue denominado *Fig cryptic virus* (FCV) (Elbeaino *et al.*, 2011a). Cada segmento de RNA tiene un solo marco abierto de lectura (ORF); el primer fragmento potencialmente codifica para una proteína homóloga a RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), mientras el segundo codifica para la proteína de cápside (CP). FCV es miembro de la familia Partitiviridae, género propuesto *Deltapartitivirus*. Parece ser transmitido en forma natural por semilla y polen. Elbeaino *et al.*, (2011a) obtuvieron la secuencia nucleotídica completa de este virus.

Fig badnavirus 1 (FBV-1)

Es un virus de la familia Caulimoviridae, género *Badnavirus*. Los miembros del género *Badnavirus* generalmente son transmitidos por algunos áfidos y coccinélidos, y, aunque se desconoce el vector de FBV-1, no es improbable que sea transmitido de esta forma, e incluso pueda compartir vectores con algunos de los closterovirus (Tzanetakis *et al.*,

2010). Este es el único virus de DNA que se ha encontrado en higuera hasta el momento. Es un pararetrovirus de DNA de doble hebra (dsDNA) que puede integrarse con facilidad en el genoma del hospedero, pero también puede replicarse como virus episomal infeccioso. Tiene un genoma de 7140 nt, y como los badnavirus, tiene genoma circular de 7-8 Kbp que es encapsidado en viriones baciliformes sin envoltura. Este virus está completamente secuenciado, sin embargo su caracterización bioquímica todavía está en estudio. Tzanetakis *et al.*, (2010) detectaron FBV-1 amplificando un fragmento genómico de 474 bp. Es un virus que está ganando importancia en la fitovirología de las higueras porque ha demostrado una gran facilidad de ser transmitido mecánicamente, presenta alta prevalencia tanto en plantas sintomáticas y asintomáticas (Laney *et al.*, 2012).

Fig mosaic virus (FMV)

FMV es el virus más frecuente, y quizás el más importante componente de FMD, aunque se piensa que la interacción de este virus con los otros es lo que produce la gran variabilidad de síntomas en las plantas afectadas (Caglar *et al.*, 2010).

Es un virus multipartido de ssRNA. Hafez *et al.*, (2011) propusieron que el RNA de FMV es de sentido positivo y el virus pertenece a la familia Potyviridae. Sin embargo Elbeaino *et al.*, (2009b) contradicen estos datos, indicando que el RNA de este virus tiene un sentido negativo y es parte del género *Emaravirus*, familia Bunyaviridae, conclusiones compartidas por otros investigadores (Mielke y Muhlbach, 2012; Walia *et al.*, 2012; Elbeaino *et al.*, 2013). Inicialmente, Elbeaino *et al.*, (2009c) habían caracterizado cuatro segmentos de RNA, pero Ishikawa *et al.*, (2012a) identificaron dos segmentos adicionales. Estos segmentos codifican para: la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), un polipéptido similar a un precursor de glicoproteína, la proteína de la nucleocápside y tres proteínas desconocidas. Al parecer la presencia del virus en las células vegetales está directamente asociada con la aparición de partículas de doble membrana (DMBs) que han sido encontradas mediante microscopía electrónica en plantas sintomáticas (Cağlayan *et al.*, 2009; Walia *et al.*, 2009; Cağlayan *et al.*, 2010; Tzanetakis *et al.*, 2010), e incluso es posible que estas estructuras sean partículas de FMV (Cağlayan *et al.*, 2010).

FMV es transmitido por *Aceria ficus* (Eriophyidae) (Abou-Awad *et al.*, 2000; Hafez *et al.*, 2011). También se transmite a través de la propagación vegetativa de la higuera (Elbeaino *et al.*, 2009c). La secuencia completa del genoma de este virus está disponible.

Fig fleck-associated virus (FFkaV)

Posee un ssRNA (+), es miembro de la familia Tymoviridae, género *Maculavirus* (Elbeaino *et al.*, 2011b). Es un virus con un genoma de 7046 nt que incluye dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para una proteína que se asimila a proteínas asociadas con la replicación y a otras proteínas putativas de movimiento de *Tymovirus*

(Elbeaino *et al.*, 2011b). Los síntomas en higuera que han sido asociados a la presencia de este virus corresponden a una decoloración discreta de la nervaduras (flecking) (Elbeaino *et al.*, 2011b). El genoma de este virus está totalmente secuenciado.

Fig latent virus 1 (FLV-1)

Gattoni *et al.*, (2009) indican la presencia de otro virus asociado a la higuera que se presenta tanto en plantas con y sin síntomas: *Fig latent virus-1* (FLV-1), que pertenece a la familia Betaflexiviridae, género *Trichovirus* y es el único virus de higuera transmisible por semillas (Castellano *et al.*, 2009; Shahmirzaie *et al.*, 2012). Este virus está parcialmente secuenciado. Para la detección se amplifica un fragmento de 389 bp perteneciente al gen que codifica para la CP. Tiene una estructura filamentosa de aproximadamente 700 nm de largo. Es un virus de ssRNA (+) y con un genoma del tamaño aproximado de 8000 nt, del cual han sido secuenciados 6620 nt (Gattoni *et al.*, 2009; Gattoni *et al.*, 2010).

Posee cuatro ORFs identificados que codifican para una proteína asociada a la replicación viral, para la proteína de movimiento (MP), para la proteína de cápside (CP) y para una proteína con propiedades de unión de ácidos nucleicos (Gattoni *et al.*, 2009).

Distribución geográfica

Este trabajo de tesis es la primera prospección que considera los diez virus hasta ahora conocidos que afectan a la higuera.

En Turquía, principal productor de higos a nivel mundial, se ha realizado la mayoría de trabajos publicados. Elci *et al.*, (2012) indican que el 83% de las muestras analizadas están infectadas con al menos un virus, siendo el más común FBV-1 y FMV con un 79% de prevalencia. Caglar *et al.*, (2010) demostraron que FLMaV-2 afectaba a un número reducido de muestras.

En Egipto se observó que el 90% de las plantas analizadas tenían al menos un virus, y se concluyó que FLMaV-1 fue el más frecuente con un 68,3% de prevalencia, seguido por FMV con un 46,7% (Elbeashehy y Elbeaino, 2011). En Irán se detectaron FLV-1, FLMaV-1 y FMV, mientras que FLMaV-2 y FMMaV no fueron encontrados (Shahmirzaie *et al.*, 2010; Shahmirzaie *et al.*, 2012). En Líbano se observó la presencia de FLMaV-1 con un 47%, seguido por FMV con un 42%, FLMaV-2, FMMaV y FFkaV con porcentajes de infección más bajos (Elbeaino *et al.*, 2007b; Elbeaino *et al.*, 2012). En Arabia Saudita también existen informaciones acerca de la presencia de varios virus infectando a la higuera, especialmente FLMaV-1 y FMV (Alhudaib, 2012). En Nueva Zelanda se observó que FMV y FBV-1 fueron los más frecuentes (Minafra *et al.*, 2012). En muestras provenientes de México y Sudáfrica se encontró FLMaV-1 (Castellano *et al.*, 2007). Elbeaino *et al.*, (2011a) encontraron que el virus más común en los países de la cuenca del Mediterráneo es FLMaV-1 seguido por FLMaV-2 y FMV.

En Japón se observó la presencia de FMV en 34% de los huertos comerciales (Ishikawa *et al.*, 2012b).

Medidas de control

Al igual que todas las enfermedades virales, el control es prevalentemente preventivo, por lo que la mayoría de estrategias siempre han sido dirigidas a evitar las condiciones que favorecen la infección.

Existen algunos estudios de susceptibilidad y resistencia a FMD en diferentes especies de *Ficus* (Burnett, 1960; y Alfieri, 1967), lo cual podría ser de interés al momento de la propagación de la higuera, ya que se podría considerar utilizar portainjertos resistentes.

En Chile no existe ninguna regulación de ingreso de material propagativo para la higuera, e incluso, en muchos de los casos las higueras comerciales no tienen un origen conocido o su propagación es a partir de plantas de jardín.

En el caso de la higuera no se conocen con precisión los vectores que estarían ocasionando FMD, con excepción de la transmisión de FMV por *Aceria ficus*, por lo que es necesario generar mayor información acerca de los posibles vectores de los diferentes virus identificados en higuera. En Chile se ha observado la presencia de *Aceria ficus*, el eriófido de la yema de la higuera (Peralta, 1993).

Para la higuera, las herramientas de poda no parecen ser un vehículo de infección importante, con la exclusión de FBV-1. Dada la alta prevalencia de este virus en otras zonas productoras de higueras, se aconseja desinfectar las tijeras y material de poda.

Para sanear plantas infectadas por virus es necesaria la termoterapia, o tratamiento térmico, que puede complementarse con el cultivo *in vitro* de explantes de meristemo. Para la termoterapia en higuera se ha obtenido un cierto éxito, cuando trozos de ramillas de 1 cm de diámetro procedentes de plantas con síntomas, se sumergen en agua a 37°C por 20 días. Haelterman *et al.*, (1994) detalla la metodología para la micropropagación de este material.

Justificación

La investigación en fitovirología en Chile se ha enfocado en los frutales más importantes, como la vid, los cítricos, las pomáceas, los frutales de carozo y el arándano (Auger, 1989; Herrera, 1996; Herrera, 1997; Besoain *et al.*, 2000; Fiore *et al.* 2008; Fiore, *et al.*, 2010), pero se sabe muy poco de aquellos no tradicionales, que rápidamente están ganando importancia en el mercado local e internacional. En el caso

de la higuera, la información es inexistente para Chile, y muy reducida en el resto del mundo, por lo que este trabajo es una contribución relevante al estudio y entendimiento de las enfermedades virales en este cultivo. Adicionalmente, este trabajo es el primer paso para lograr plantas de higuera libres de virus, que mejorarán la calidad y cantidad de la producción de higos chilenos, abriendo el paso a nuevos mercados internacionales para la exportación de esta fruta. En Chile se ha observado la presencia de FMD (Lavín y Reyes, 2004), pero no se habían realizado análisis de laboratorio para establecer cuál es la situación sanitaria de la higuera con respecto a los virus presentes. La técnica de RT-PCR es una herramienta ampliamente utilizada para la detección de virus fitopatógenos, ya que se destaca por su eficiencia y precisión, especialmente cuando los virus a estudiar son basados en RNA. La caracterización molecular de los aislados virales chilenos constituye un aporte para entender mejor esta enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los aislados chilenos de las especies de virus que infectan a la higuera (*Ficus carica* L.) son similares a nivel genético y molecular con respecto a los que se encuentran en las otras regiones del mundo donde se cultiva la higuera.

Objetivos

Objetivo general

Determinar cuáles son los virus que infectan a la higuera (*Ficus carica* L.) en Chile, utilizando la amplificación de regiones conservadas de los genomas virales mediante la técnica de RT-PCR para la detección e identificación de estos patógenos.

Objetivos específicos

- Determinar presencia y distribución de diez virus que infectan a la higuera en las Regiones de Coquimbo (IV), Valparaíso (V), Libertador Bernardo O'Higgins (VI) y Región Metropolitana, principales productoras de higos en Chile.
- Caracterizar molecularmente los virus encontrados en el cultivo de la higuera, mediante el alineamiento de secuencias y construcción de árboles fenéticos para determinar la similitud posible con los aislados encontrados en otros países.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de higuera en el campo

Área de muestreo

Se realizó una prospección en las Regiones de Coquimbo (IV), Valparaíso (V), Libertador Bernardo O'Higgins (VI) y Región Metropolitana (Figura 1).



Figura 1.- Mapa de zonas de muestreo para la prospección de virus de higuera en Chile.

Se muestrearon hojas de una planta elegida al azar, por cada dos hectáreas, por un total de 56 muestras. Es interesante recalcar que todos los predios visitados presentaron el 100% de plantas con síntomas. Esta prospección se llevó a cabo en los principales huertos comerciales de higuera, principalmente de la variedad “Black Mission” (higo negro), que es la más plantada en Chile. Adicionalmente se hizo una visita a una colección de variedades en la Estación Experimental “Las Cardas” de la Universidad de Chile, ubicada en la región de Coquimbo, donde se colectó una muestra de cada variedad. La lista de las variedades analizadas se encuentra en el Apéndice I.

Considerando las muestras desde huertos comerciales y las de Las Cardas, en total se colectaron 120 muestras (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Distribución de muestras de higueras colectadas en cada localidad.

Región	Localidad	Coordenadas	Numero de muestras
Coquimbo	Montepatria	S 30°42'25.10"; O 70°54'59.50"	6
Coquimbo	Las Cardas	S 30°13'42.40"; O 71°15'16.80"	64
Libertador Bernardo O'Higgins	Lolol	S 34°24'57.48"; O 71°44'12.55"	9
Metropolitana	Lampa	S 33°15'25.20"; O 70°53'39.80"	15
Metropolitana	Cajón del Maipo	S 33°44'1.49"; O 70°18'39.52"	4
Metropolitana	Santiago	S 33°34'3.23" O 70°38'0.73"	11
Valparaíso	San Felipe	S 32°40'16.90"; O 70°36'6.80"	11
Total de muestras			120

Se determinó la prevalencia de cada virus en el total de las muestras analizadas, constatando también si las infecciones son mixtas o individuales.

Observación de la sintomatología

El muestreo se realizó en primavera, junto con un registro fotográfico detallado de los síntomas presentes en cada muestra. Los síntomas se encontraron principalmente en hojas, y, ocasionalmente, en los frutos.

Los síntomas observados fueron: mosaico irregular, anillos cloróticos irregulares, bandeamiento de nervaduras, clorosis, hojas palmeadas, hojas sin lóbulos y deformación de lámina (Figura 2 y 3). Se determinó cuántas plantas presentaban estos síntomas en cada combinación viral.

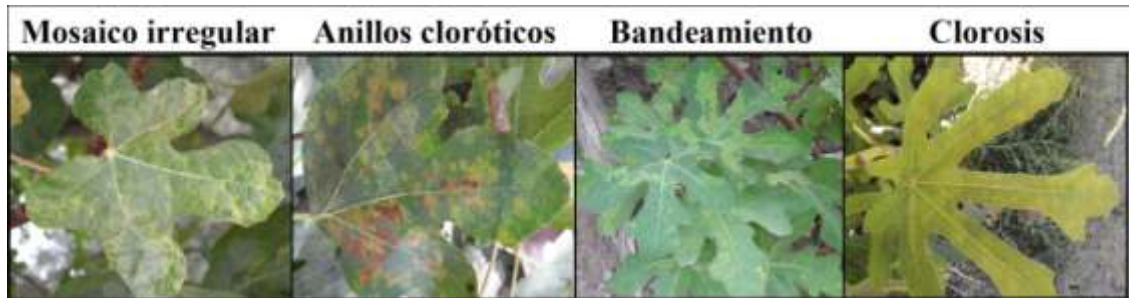


Figura 2.- Síntomas de decoloración observados en las plantas de higuera afectadas por virosis.

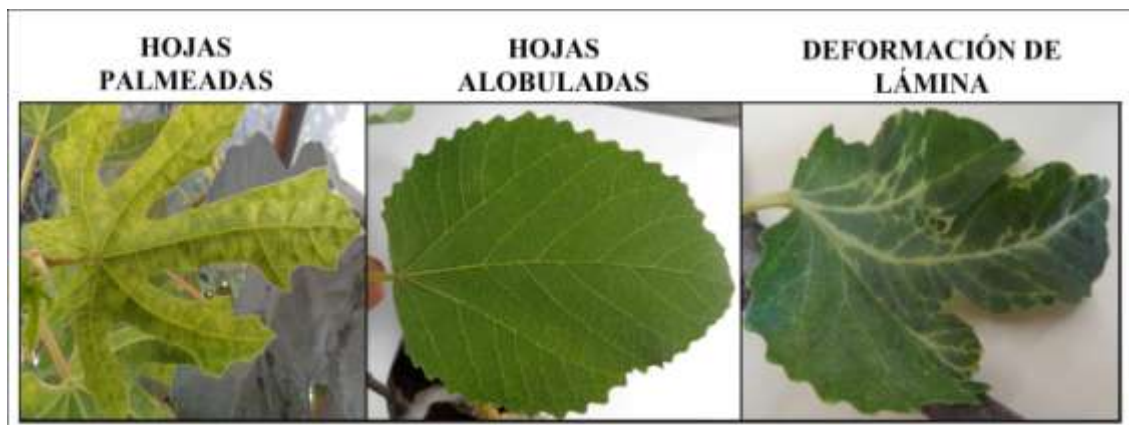


Figura 3.- Síntomas de deformación observados en las plantas de higuera afectadas por virosis.

Microscopía electrónica

Se realizó la microscopía electrónica en siete muestras de hoja que presentaban sintomatología viral y en las cuales se habían detectado virus. Los síntomas y virus que afectaban a estas muestras son detallados en el Apéndice II. La microscopía electrónica se realizó en Lérida, España por el Dr. Vicente Medina Piles, académico del Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal de la Universidad de Lérida, España.

Análisis molecular

Extracción de ácidos nucleicos totales (TNA)

Para la extracción de ácidos nucleicos se realizó la extracción con sílica descrita por Spigel y Martin (1993), con la cual se analizaron todas las muestras. La extracción se realizó utilizando trozos de nervadura y de lámina foliar.

Todas las soluciones utilizadas se encuentran detalladas en el Apéndice III.

En un mortero estéril, se agregaron 0,15 gr de tejido vegetal y 1,5 mL de tampón de macerado (previamente se añadió 10 μ L de 2-mercaptoetanol por cada ml de tampón). El macerado se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL. Se agregaron 300 μ L de sodio lauril sarcosil (NaLS) al 10%. Se homogenizó en un vórtex por 1 minuto y luego se incubó a 70°C por 10 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirieron 300 μ L del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 150 μ L de etanol al 100%, 300 μ L de ioduro de sodio (NAI) 6M y 50 μ L de solución de sílica. Se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos agitando constantemente. Luego se centrifugó a 8000 rpm y se eliminó el sobrenadante vaciando el tubo Eppendorf en un contenedor con tapa. Se lavó el sedimento con 500 μ L de tampón de lavado usando el vórtex para resuspenderlo totalmente. Se repitió la última centrifugación y el lavado hasta que el sedimento quedó blanco y se resuspendía fácilmente. A continuación se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 150 μ L de H₂O-bidestilada (BD) estéril-DPC y se incubó a 70°C por 4 minutos en baño termostático. Luego se homogenizó usando el vórtex y se centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 0,6 mL. Finalmente se almacenó a -20°C.

Transcripción reversa

Debido a que casi todos los virus que se analizaron son de RNA y la técnica de PCR se basa en la amplificación de fragmentos de DNA, fue necesario sintetizar DNA complementario (cDNA). Para esto se realizó una transcripción reversa (RT), descrita por Mackenzie *et al.*, (1997).

Se preparó un mix con 19 μ L de H₂O-BD estéril-DPC, 1 μ L de partidores al azar y 10 μ L del extracto de TNA de cada muestra en un tubo Eppendorf de 0,6 mL. Adicionalmente se preparó un blanco sin muestra y con agua, como control negativo. Esta mezcla se puso a 95°C por 5 minutos en un termociclador. Inmediatamente después se puso cada tubo Eppendorf en hielo por 5 minutos. Se preparó el mix para RT

con 4,1 µL de H₂O-BD estéril-DPC, 10 µL de tampón MMLV 5x, 2,4 µL de DTT 0,1M, 2,5 µL de dNTPs 10mM y 1 µL de la enzima MMLV para cada muestra, incluyendo el control negativo. Se programó el termociclador con 10 minutos a 39°C, 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 72°C. El cDNA resultante se almacenó a 4°C. Todas las soluciones se encuentran detalladas en el Apéndice III.

Detección de virus con PCR

Se recurrió a esta técnica de amplificación génica, precedida por transcripción reversa (RT-PCR), para la detección de los diez virus que actualmente han sido encontrados en higuera: FLMaV-1, FLMaV-2, FMMaV, AFCV-1, AFCV-2, FCV, FBV-1, FMV, FFkaV y FLV-1. Para cada virus se utilizaron los partidores específicos de regiones altamente conservadas, indicados en el Cuadro 2 (Castellano *et al.*, 2009; Elbeaino *et al.*, 2009b; Caglar *et al.*, 2010; Elbeaino *et al.*, 2010; Gattoni *et al.*, 2010; Tzanetakis *et al.*, 2010; Elbeaino *et al.*, 2011a; Elbeaino *et al.*, 2011b; Alhudaib, 2012). La amplificación se realizó en programas de 35-40 ciclos. A un tubo de PCR de 0,6 mL se añadieron 3 µL de tampón para PCR 10x, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTPs, 1 µL del primer 'forward', 1 µL del primer 'reverse', 21 µL de H₂O-BD estéril-DPC y 0,2 µL de Taq polimerasa. Para cada reacción se utilizaron 2,5 µL de cDNA de cada muestra, llegando a un volumen final aproximado de 31 µL.

Cuadro 2.- Partidores utilizados para la detección de virus en higuera.

Virus	Partidores	Secuencia	Producto de amplificación (bp)	Gen	T° óptima de annealing	Referencia bibliográfica
FLMaV-1	N17 s	5' CGTGGCTGATGCAAAGTTTA 3'	350	HSP70	54°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2006
	N17 a	3' GTTAACGCATGCTTCCATGA 5'				
FLMaV-2	F3 s	5' GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG 3'	360	HSP70	57°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2007a
	F3 a	3' TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA 5'				
FMV	E5 s	5' CGGTAGCAAATGGAATGAAA 3'	302	CP	51°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2009b
	E5 a	3' AACACTGTTTTTTCGATTGG 5'				
FMMaV	LM3 s	5' AAGGGGAATCTACAAGGGTCG 3'	309	HSP70	53°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2010
	LM3 a	3' TATTACGCGCTTGAGGATTGC 5'				
FCV	FCV-R1 s	5' TCGGATTGTCTTTGCAGAGG 3'	353	RdRp	53°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2011a
	FCV-R1 a	3' CGCATCCACAGTATCCCATT 5'				
FFkaV	CP-Fk s	5' ATGACGACTGTCAACTCCCT 3'	669	CP	53°C	Elbeaino <i>et al.</i> , 2011b
	CP-Fk a	3' TTAAGCCAGGGTGGGAGTGTG 5'				
FLV-1	Cptr s	5' CCATCTTCACCACACAAATGTC 3'	381	CP	53°C	Gattoni <i>et al.</i> , 2009
	Cptr a	3' CAATCTTCTTGGCCTCCATAAG 5'				
AFCV-1	AFCV1 F	5' CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG 3'	375	N/D	53°C	Tzanetakis <i>et al.</i> , 2010
	AFCV1 R	3' ATGCTTCCTCGGCTGC 5'				
AFCV-2	AFCV2 F	5' GTTCGGAATTAGTTAATAGATACGGTC 3'	1671	HSP90	55°C	Tzanetakis <i>et al.</i> , 2010
	AFCV2 R	3' ACCCGCTAGAGTAATCAGTCAAAGTT 5'				
FBV-1	FBV F	5' ACCAGACGGAGGGAAGAAAT 3'	474	P2 (putative DNA binding protein)	55°C	Tzanetakis <i>et al.</i> , 2010
	FBV R	3' TCCTTGCCATCGGTTATCTC 5'				

Los productos de amplificación se separaron con electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se observaron con un transiluminador UV.

Caracterización molecular

Se eligieron algunos aislados de cada virus encontrado. En este caso particular, la caracterización molecular representa un trabajo complicado porque la información disponible para la comparación de secuencias no es numerosa, y muchos de los virus estudiados no han sido secuenciados ni caracterizados completamente.

Purificación

Para la purificación de productos de amplificación se utilizó el kit 'EZDNA Gel Extraction' de Omega®, y todos los reactivos utilizados en este proceso son parte del kit.

Luego de electroforesis en gel de agarosa, se procedió a cortar las bandas de DNA. Éstas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL y almacenadas a -20°C hasta su purificación; subsiguientemente fueron pesadas para determinar el volumen, asumiendo una densidad de 1 gr/mL. Se añadió un volumen igual de '*Binding Buffer (XP2)*', y luego se incubó en baño termostático a 50-60°C por 7 minutos. Se colocó la columna '*HiBind DNA Mini Column*' en el tubo colector de 2 mL. Se añadió la solución de DNA/agarosa a las columnas y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se desechó el líquido filtrado y se volvió a poner las columnas en el mismo tubo colector. Se añadieron 300 µL de '*Binding Buffer (XP2)*' a la columna y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se desechó el líquido filtrado y se volvió a poner las columnas en el mismo tubo colector. Se añadieron 700 µL de '*SPW Wash Buffer*' y se centrifugó a 13000 rpm a temperatura ambiente para lavar la columna. Se desechó el líquido filtrado y se puso las columnas en el mismo tubo colector de cada una. Se centrifugó la columna vacía por 2 minutos a velocidad máxima (> a 13000 rpm) para secar la matriz de la columna. Luego, se colocó la columna sobre un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio y se añadieron 37 µL de '*Elution Buffer*' (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) en la columna, y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Finalmente se centrifugó por 1 minuto a velocidad máxima (> a 13000 rpm) para eluir el DNA. Las muestras purificadas fueron guardadas a 4°C. Todas las purificaciones fueron comprobadas mediante electroforesis en agarosa.

Clonamiento

Para la reacción de ligamiento se utilizó el Kit pGEM-Teasy Vector®. Todos los reactivos usados en este protocolo son parte del kit. Se mezclaron 5 µL de tampón, 1 µL de plásmido p-GEM-T, 1 µL de enzima T4 ligasa y 3 µL del DNA purificado en un tubo Eppendorf de 0,2 mL. El tampón y el plásmido estaban previamente alicuotados y almacenados a -20°C. Luego, se incubó a 4°C durante toda la noche.

Para la transformación de células competentes de *Escherichia coli* cepa Top 10 con el plásmido se tomó un tubo de células competentes en stock (100 µL) y se descongeló sobre hielo. Se agregó todo el volumen de la reacción de ligamiento (10 µL) y se homogenizó suavemente, manteniendo en frío por 10 minutos. A continuación, se sometió a las células a un shock térmico de 42°C en baño termoregulado durante 2 minutos. Luego, se mantuvo en frío por 1-2 minutos. Se agregaron 400 µL de medio de cultivo LB a temperatura ambiente. Se incubó por 1 hora a 37°C agitando a 180-200 rpm. Se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente, se eliminaron 450 µL del sobrenadante y se resuspendieron los 50 µL restantes. Se colocaron 10-15 µL en placas de medio selectivo (*Cb*, *Str*, *IPTG* y *X-gal*) y se incubó a 37°C durante toda la noche. En un tubo Eppendorf de 0,6 mL se agregaron 10 µL de H₂O-BD estéril-DPC y se disolvió una colonia blanca. Posteriormente, se realizó un PCR de colonia usando los partidores SP6 y T7, agregando 1-2 µL de muestra para confirmar la inserción del amplicón en el plásmido. Finalmente, se purificó el resultado de este PCR a partir del gel de agarosa.

Secuenciación

Para la secuenciación, los productos de PCR purificados de las muestras positivas fueron enviadas a la compañía MacroGenUSA Corp. en Rockville, MD, Estados Unidos.

Caracterización de zonas más amplias del genoma

Se diseñaron nuevos partidores mediante el uso de los programas Vector NTI© y BioEdit © (Cuadro 3) para dos de los diez virus buscados: FLMaV-1 y FMV, con el fin de mejorar la detección y para completar la caracterización molecular de los aislados virales mismos. En el caso de AFCV-2 no existen secuencias disponibles en GenBank. En el caso de FFkaV, FLV-1 y FBV-1, los fragmentos de detección son suficientemente grandes para la caracterización. Para el resto de los virus estudiados la información en GenBank es limitada.

Cuadro 3.- Partidores diseñados en este estudio para la caracterización de FLMaV-1 y FMV.

Partidor	Secuencia	Producto de amplificación (bp)	Gen	T° óptima de annealing
FLMaV1- HSPF	5' GTTGAAGTTCGGGACGACGT 3'	602	HSP70	56°C
FLMaV1- HSPR	3' CGCCGCCGAAATCATAAACT 5'			
FMV- CPF	5' TAGTGAACTCCCATAATTAAC TCAA 3'	1440	CP	51°C
FMV- CPR	3' TCTAACAATGGTATCAATAAAGAAA 5'			

Análisis bioinformático

Se realizaron alineamientos de secuencias múltiples usando los programas CLUSTAL X© y BIOEDIT© con los parámetros de referencia del programa. Las secuencias de referencia para los alineamientos fueron encontradas en la base de datos del GenBank© y fueron comparadas nucleotídicamente con la herramienta BLAST©.

Adicionalmente, se realizaron análisis fenéticos para determinar las relaciones entre las secuencias encontradas en esta investigación, en comparación con las secuencias disponibles en GenBank©. Los árboles fenéticos fueron realizados por 'neighbor joining' con análisis de 'bootstrap' de 1000 réplicas con el programa MEGA© para determinar qué tan robustas son las relaciones.

RESULTADOS

Recolección de muestras de higuera en el campo

En total se recolectaron 120 muestras, de las cuales 64 plantas eran parte de la colección de variedades de la Estación Experimental Las Cardas. La variedad más común fue “Black Mission” con 37 plantas, de las cuales 33 se encontraron en huertos comerciales y 4 de ellas pertenecían a la colección de variedades. Sólo 2 plantas correspondían a la variedad “Kadota”, también parte de esta colección, 58 plantas eran de diferentes variedades de esta colección y 23 plantas fueron de variedades indeterminadas colectadas fuera de huertos comerciales. Todas las plantas estudiadas presentaron algún tipo de síntoma. En la Figura 4 se observan los resultados de los análisis virológicos en las plantas de huertos comerciales, en aquellas pertenecientes a la colección de variedades de Las Cardas y en las plantas de variedades indeterminadas.

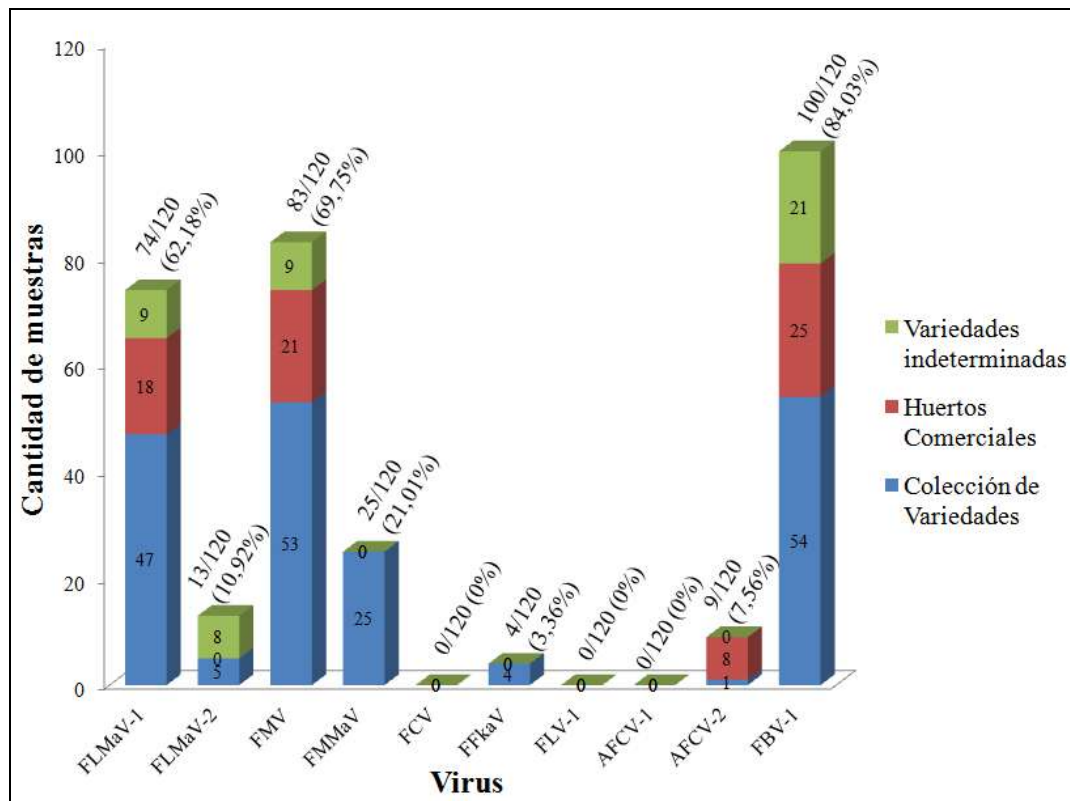


Figura 4.- Prevalencia de cada virus en las muestras de higuera analizadas. Las porciones en azul corresponden a las plantas de la colección de variedades de Las Cardas. Las porciones rojas, representan a las plantas que fueron colectadas en huertos comerciales; todas estas las plantas fueron “Black Mission”. Las porciones en verde, corresponden a las plantas de las cuales no se pudo identificar la variedad.

El virus detectado con mayor frecuencia fue FBV-1, con 100 muestras positivas (84,03%), seguido por FMV, que se encontró en 83 muestras (69,75%), FLMaV-1 en 74 muestras (62,18%), FMMaV en 25 muestras (21,01%), FLMaV-2 en 13 (10,92%), AFCV-2 en 9 (7,56%) y FFkaV en 4 muestras (3,36%). Los virus FCV, FLV-1 y AFCV-1 no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas. En la Figura 5 se observa la prevalencia de los virus presentes en cada localidad.

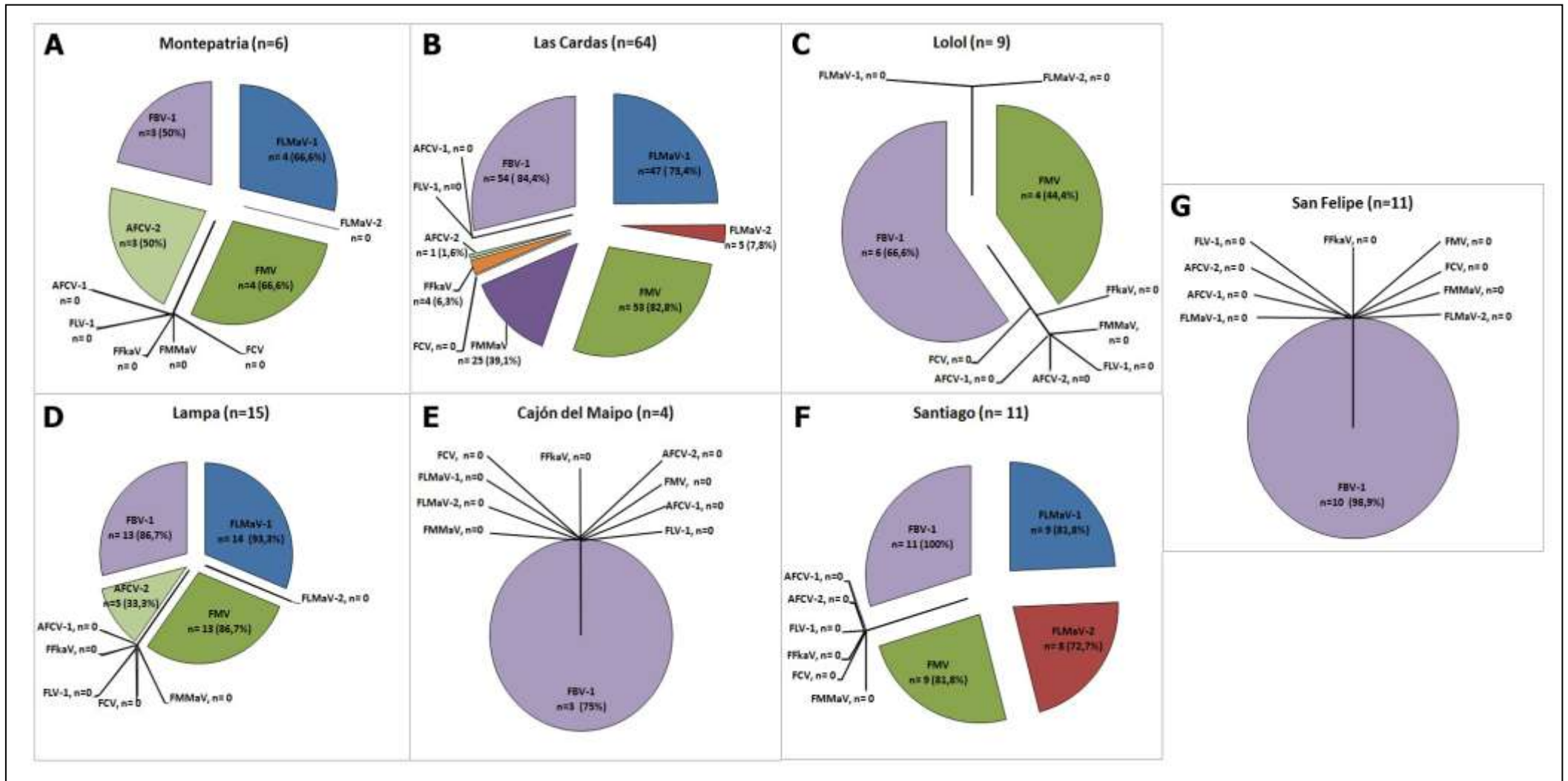


Figura 5.- Prevalencia de los virus encontrados en las plantas de cada localidad muestreada. A) Localidad de Montepatria – 6 muestras colectadas. B) Localidad de Las Cardas – 64 muestras colectadas. C) Localidad de Lolol – 9 muestras colectadas. D) Localidad de Lampa – 5 muestras colectadas. E) Localidad del Cajón del Maipo – 4 muestras colectadas. F) Localidad de Santiago – 11 muestras colectadas. G) Localidad de San Felipe – 11 muestras colectadas.

De las 120 muestras, 4 de ellas no presentaron ninguno de los virus prospectados; 2 de estas plantas sin virus (variedad “Black Mission”) fueron encontradas en un huerto comercial en la localidad de Lolol y las 2 restantes se colectaron en la cercanía de huertos comerciales (variedades indeterminadas). Las infecciones simples se presentaron en 24 muestras, mientras que en 25 se presentaron infecciones dobles. Los tipos de infecciones más frecuentes fueron de tres y cuatro virus, con 35 muestras infectadas por tres virus (29,17%) y 31 con cuatro virus (25,83%). Solo 1 muestra presentó una infección mixta con cinco virus, correspondiente al 0,83% del total de muestras analizadas, la cual fue colectada en Las Cardas (variedad Nápoles). Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4.- Cantidad y porcentaje de muestras con infección simple y mixta. Cada letra en paréntesis (A-J) representa un virus: A) FLMaV-1; B) FLMaV-2; C) FMV; D) FMMaV; F) FFkaV; I) AFCV-1; J) FBV-1.

Número de virus	Virus	Cantidad de muestras	Total	Porcentaje
1	FMV (C)	2	24	20,00
	FBV-1 (J)	22		
2	FLMaV-1 / FMV (AC)	5	25	20,83
	FLMaV-1 / FMMaV (AD)	1		
	FLMaV-1 / AFCV-2 (AI)	1		
	FLMaV-1 / FBV-1 (AJ)	3		
	FMV / FMMaV (CD)	2		
	FMV / FBV-1 (CJ)	12		
3	FFkaV / FBV-1 (FJ)	1	35	29,17
	FLMaV-1 / FLMaV-2 / FMV (ABC)	1		
	FLMaV-1 / FLMaV-2 / FMMaV (ABD)	1		
	FLMaV-1 / FLMaV-2 / FBV-1 (ABJ)	1		
	FLMaV-1 / FMV / FMMaV (ACD)	1		
	FLMaV-1 / FMV / FFkaV (ACF)	1		
	FLMaV-1 / FMV / AFCV-2 (ACI)	1		
	FLMaV-1 / FMV / FBV-1 (ACJ)	23		
	FLMaV-1 / FMMaV / FBV-1 (ADJ)	3		
	FMV / FMMaV / FBV-1 (CDJ)	2		
	FMV / FFkaV / FBV-1 (CFJ)	1		
4	FLMaV-1 / FLMaV-2 / FMV / FBV-1 (ABCJ)	9	31	25,83
	FLMaV-1 / FMV / FMMaV / FBV-1 (ACDJ)	14		
	FLMaV-1 / FMV / FFkaV / FBV-1 (ACFJ)	1		
	FLMaV-1 / FMV / AFCV-2 / FBV-1 (ACIJ)	7		
5	FLMaV-1 / FLMaV-2 / FMV / FMMaV / FBV-1 (ABCDJ)	1	1	0,83
0		4 ^a	4 ^a	3,33 ^a
		Total	120	100 %

^aNúmero y porcentaje de muestras en las cuales no se detectó ninguno de los virus prospectados.

Sintomatología observada

Los síntomas se manifiestan principalmente en hojas, pero se observaron algunas muestras con síntomas también en frutos (Figura 6).



Figura 6.- Los síntomas de las virosis en higueras pueden presentarse tanto en hojas como en frutos. En esta figura, se pueden observar anillos cloróticos irregulares y bandeamiento en ambos órganos.

En hojas, los bordes del mosaico no están claros, ya que el color amarillo se mezcla gradualmente con el color verde del tejido sano. En algunas hojas, las manchas cloróticas son más pequeñas y están densamente distribuidas, de manera que el mosaico aparece como manchas puntiformes. Las manchas cloróticas más grandes no guardan ninguna relación definida con la posición de las venas. Estas manchas de mosaico se rodean de una borde de color café negruzco que luego puede expandirse hacia el interior hasta la aparición de verdaderas manchas necróticas, lo cual significa la muerte de las células epidérmicas vecinas. Los anillos cloróticos, a diferencia del mosaico irregular, presentan un borde muy definido y generalmente son de forma circular irregular. El bandeamiento de nervaduras abarca desde decoloraciones leves o severas de las venas hasta clorosis perinerval, que puede llegar a formar verdaderos arabescos en la hoja. La clorosis parcial o total de la hoja fue un síntoma bastante común y generalmente se presentaban en parches más grandes que las manchas cloróticas descritas anteriormente. Una manifestación aparentemente sistémica de la enfermedad es la malformación de las hojas, que puede encontrarse junto a hojas normales en una misma rama. Las hojas deformadas tienen infinitas formas y tamaños. Se observa una clara distinción entre hojas palmeadas y que no presentan los lóbulos bien definidos.

Los anillos cloróticos, la clorosis y el bandeamiento se pueden presentar también en el fruto (Figura 7). Al momento de coleccionar las muestras, se pudo observar que los frutos con síntomas tenían una gran facilidad para desprenderse.



Figura 7.- Síntomas observados en frutos de higueras afectadas con virosis. A) Frutos sin síntomas; B), C), D) y E) Anillos cloróticos irregulares en frutos; F) Clorosis; G) Presencia de bandeamiento.

Los resultados de la presencia de cada síntoma en las diferentes plantas se encuentran detallados en el Cuadro 5.

Cuadro 5.- Porcentaje de plantas que presentaron cada síntoma en cada una de las combinaciones. Cada letra (A-J) representa un virus: A) FLMaV-1; B) FLMaV-2; C) FMV; D) FMMaV; F) FFkaV; I) AFCV-1; J) FBV-1. El total de plantas por cada combinación se encuentra detallado junto a las letras que representan cada combinación.

Síntomas	Combinaciones virales																								
	0 (n=4)	C (n=2)	J (n=22)	AC (n=5)	AD (n=1)	AI (n=1)	AJ (n=3)	CD (n=2)	CJ (n=12)	FJ (n=1)	ABC (n=1)	ABD (n=1)	ABJ (n=1)	ACD (n=1)	ACF (n=1)	ACI (n=1)	ACJ (n=23)	ADJ (n=3)	CDJ (n=2)	CFJ (n=1)	ABCJ (n=9)	ACDJ (n=14)	ACFJ (n=1)	ACIJ (n=7)	ABCDJ (n=1)
Mosaico irregular	100	100	77,3	60,0	100	100	100	50,0	83,3	0	100	100	0	100	0	100	91,3	100	100	100	55,6	78,6	100	100	100
Anillos cloróticos irregulares	100	100	68,2	20,0	0	100	33,3	0	41,7	0	100	100	0	0	0	100	52,2	100	100	0	11,1	42,9	100	100	100
Bandeamiento de nervaduras	100	50,0	77,3	60,0	100	100	100	0	83,3	100	100	0	0	100	100	100	95,7	66,7	100	100	88,9	64,3	100	100	100
Clorosis	75,0	50,0	77,3	40,0	0	0	100	50,0	91,7	0	100	100	100	100	100	100	82,6	100	100	100	88,9	100	100	85,7	100
Hojas Palmeadas	0	0	40,9	20,0	0	0	0	50,0	16,7	0	100	0	0	100	0	0	13,0	0	100	0	0	7,1	100	85,7	0
Hojas Alobuladas	0	0	9,1	20,0	0	0	0	50,0	50,0	100	0	0	0	100	100	100	30,4	33,3	0	0	22,2	57,1	0	85,7	0
Deformación de Lámina	25,0	100	68,2	60,0	100	0	100	50,0	66,7	100	100	100	0	100	100	100	91,3	100	100	100	100	78,6	100	100	100

Microscopía electrónica

Mediante microscopía electrónica, se observó la presencia de cuerpos de doble membrana (DMBs) en las células sub-epidérmicas y del mesófilo de tejido foliar sintomático. Los DMBs generalmente aparecen cerca de los cloroplastos y están rodeados de muchas mitocondrias. Cuando son numerosos, aparecen alrededor de una masa granular. Las fotografías de microscopía electrónica corresponden a las Figuras 8, 9 y 10. Junto con la aparición de estas estructuras, se vio que las células presentan una intensa vacuolación en el citoplasma. Los núcleos son aparentemente normales, pero los cloroplastos se ven hinchados y redondeados, con grandes acumulaciones de almidón en los tilacoides. Las mitocondrias presentan un desarreglo de los cristales, que son menos numerosos que en las mitocondrias normales. La membrana citoplasmática se caracteriza por la proliferación de vesículas reticuladas que varían en forma y tamaño.

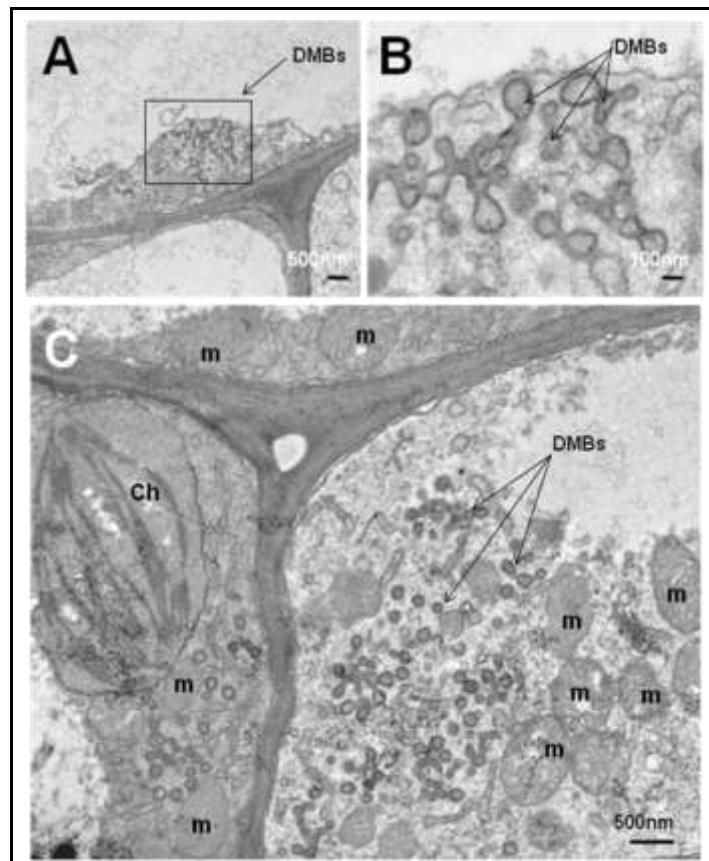


Figura 8.- Microscopía electrónica de hojas de higueras infectadas con virosis. Si bien todas las muestras utilizadas para la microscopía electrónica estaban infectadas por FMV, también estaban presentes otros virus, lo cual se puede observar en el Apéndice II. A) “Double membrane bodies” (DMBs) en células subepidérmicas; B) Detalle de A donde se observa que los DMBs en formación aparecen unidos y con aspecto pleomórfico; C) También suelen aparecer rodeados de muchas mitocondrias (m). Ch: cloroplasto. Cortesía del Dr. Vicente Medina.

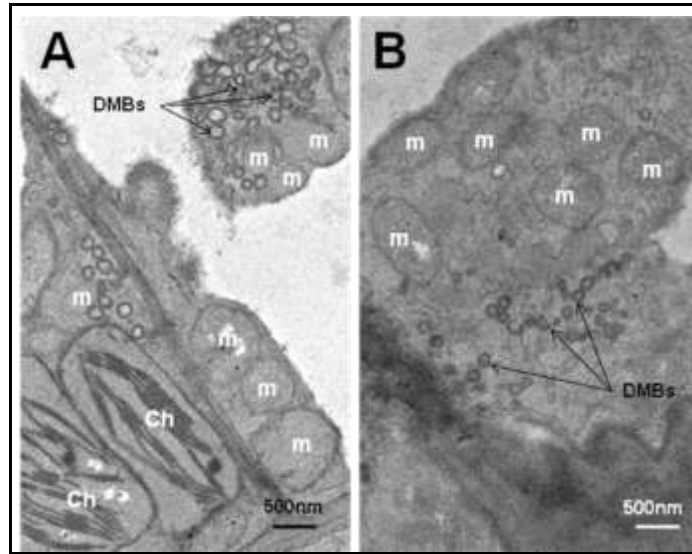


Figura 9.- Microscopía electrónica de hojas de higueras infectadas con virosis. Si bien todas las muestras utilizadas para la microscopía electrónica estaban infectadas por FMV, también estaban presentes otros virus, lo cual se puede observar en el Apéndice II. A) “Double membrane bodies” (DMBs) en células del mesófilo. B) Suelen aparecer rodeados de muchas mitocondrias (m). Ch: cloroplastos. Cortesía del Dr. Vicente Medina.

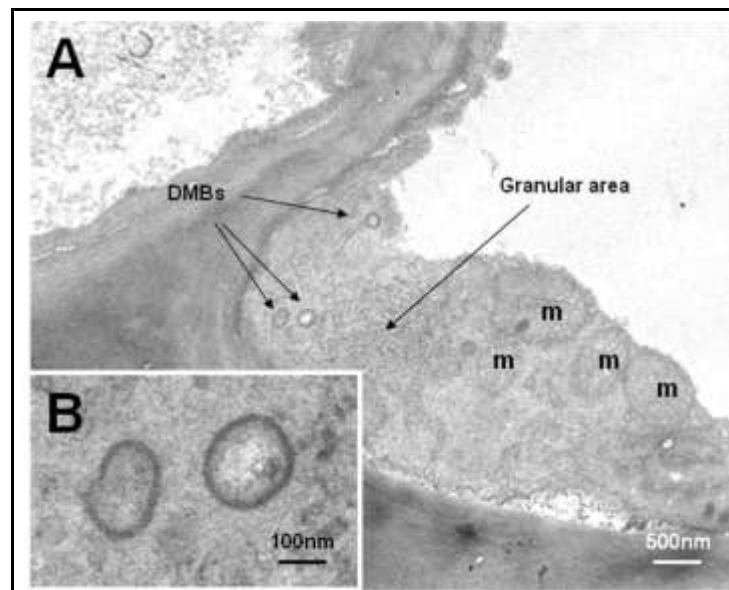


Figura 10.- Microscopía electrónica de hojas de higueras infectadas con virosis. Si bien todas las muestras utilizadas para la microscopía electrónica estaban infectadas por FMV, también estaban presentes otros virus, lo cual se puede observar en el Apéndice II. En esta figura se observan “Double membrane bodies” (DMBs) en células del mesófilo. A): Cuando hay muchos DMBs, estos aparecen alrededor de una masa granular (Granular area). B): es un detalle de A en el que se puede apreciar la doble membrana de los DMBs. Cortesía del Dr. Vicente Medina.

Análisis molecular

Como se mencionó anteriormente, solo siete de los diez virus prospectados fueron detectados en las muestras colectadas (Figura 11).



Figura 11.- Productos de amplificación obtenidos para la detección de los virus en higuera. 1) marcador molecular 100bp; 2) FLMaV-1 (350 bp); 3) FLMaV-2 (360 bp); 4) FMV (302 bp); 5) FMMaV (309 bp); 6) FCV (virus no detectado); 7) FFkaV (669 bp); 8) FLV-1 (virus no detectado); 9) AFCV-1 (virus no detectado); 10) AFCV-2 (1671 bp); 11) FBV-1 (474 bp).

Caracterización molecular

Para la comparación de secuencias nucleotídicas de FBV-1 se utilizaron seis aislados chilenos y once aislados de Estados Unidos. Además, como referencia externa, se utilizaron las secuencias de *Cacao swollen shoot virus* (CSSV), *Citrus yellow mosaic virus* (CYMV) y *Sugarcane bacilliform virus* (SBCV), tres miembros del género *Badnavirus*. Los números de accesoión se encuentran detallados en el Apéndice IV. El porcentaje de identidad entre los diferentes aislados de FBV-1 es de 98 a 100%. El árbol fenético (Figura 12) indica que todos los aislados de FBV-1 (chilenos y de Estados Unidos) forman un único grupo.

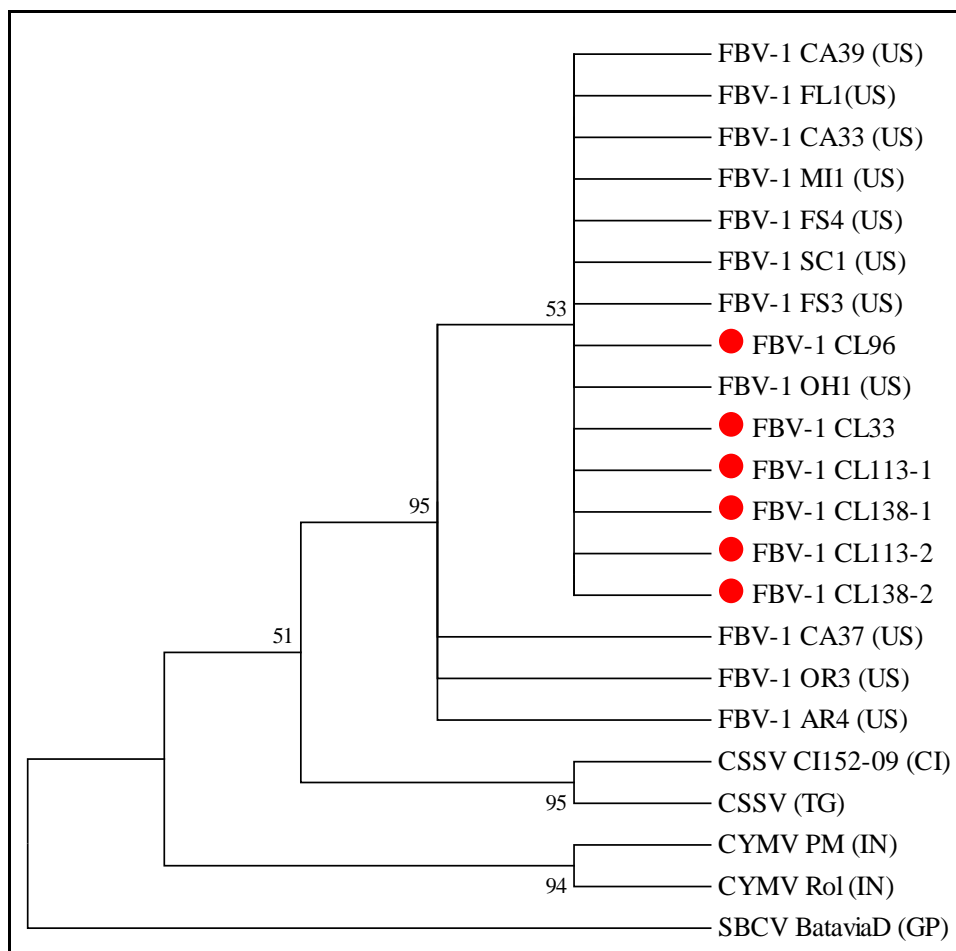


Figura 12.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para la P2 (“DNA binding protein”) de FBV-1. Los aislados chilenos de FBV-1 se encuentran marcados con un punto rojo.

El análisis de los aislados chilenos de FLMaV-2 y FMMAV se realizó sobre el gen HSP70, y siendo ambos miembros de la familia Closteroviridae, se realizó un análisis fenético que los involucrara a ambos virus, separándolos en sus grupos respectivos. Para FLMaV-2 se compararon tres aislados chilenos con nueve aislados encontrados en otros países, mientras que para FMMAV se utilizaron cuatro secuencias comparadas con la única secuencia disponible en GenBank. Los números de accesión se encuentran detallados en el Apéndice IV. Se observa claramente un agrupamiento definido para los aislados chilenos de FLMaV-2. Los porcentajes de similitud de los aislados chilenos con las otras cepas varían entre 82,5-87,6%. En el caso de FMMAV, tres de los aislados se agrupan junto con el aislado de Italia y guardan un 88,7- 91,3 % de identidad con la secuencia italiana, mientras que una muestra se separa ligeramente, pero se mantiene bajo una misma raíz. Los grupos externos fueron *Grapevine leafroll associated virus 1*, *Grapevine leafroll associated virus 2*, *Grapevine leafroll associated virus 3* y *Beet yellow virus*. Los resultados del análisis fenético se pueden observar en la Figura 13.

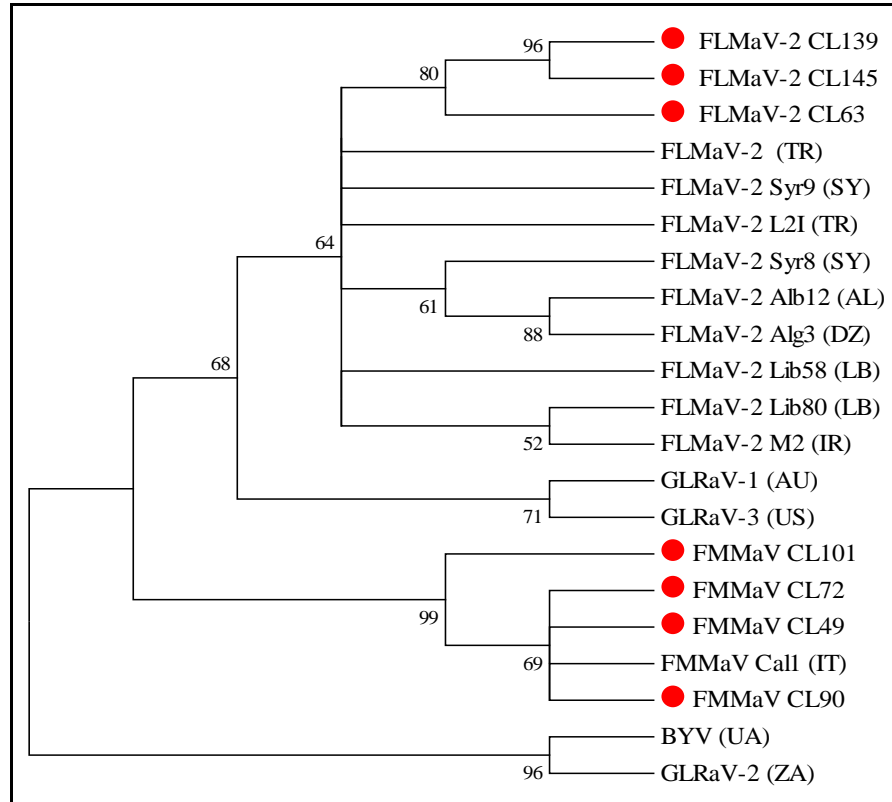


Figura 13.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para la HSP70 de FLMaV-2, y FMMaV comparadas con secuencias de virus de la familia Closteroviridae. Los aislados chilenos de FLMaV-2, y FMMaV se encuentran marcados con un punto rojo.

Para la secuencia del aislado chileno de FFkaV, se realizaron los análisis filogenéticos con seis aislados diferentes de este virus y cuatro grupos externos: *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Grapevine fleck virus* (GFkV) y *Pepino mosaic virus* (PepMV). Los números de accesoión se encuentran detallados en el Apéndice IV. Se puede observar que el aislado chileno se agrupa consistentemente con los otros aislados de FFkaV y se diferencia de los grupos externos. El porcentaje de identidad entre los aislados varía entre 83,3-99,7%. Los resultados del análisis fenético se observan en la Figura 14.

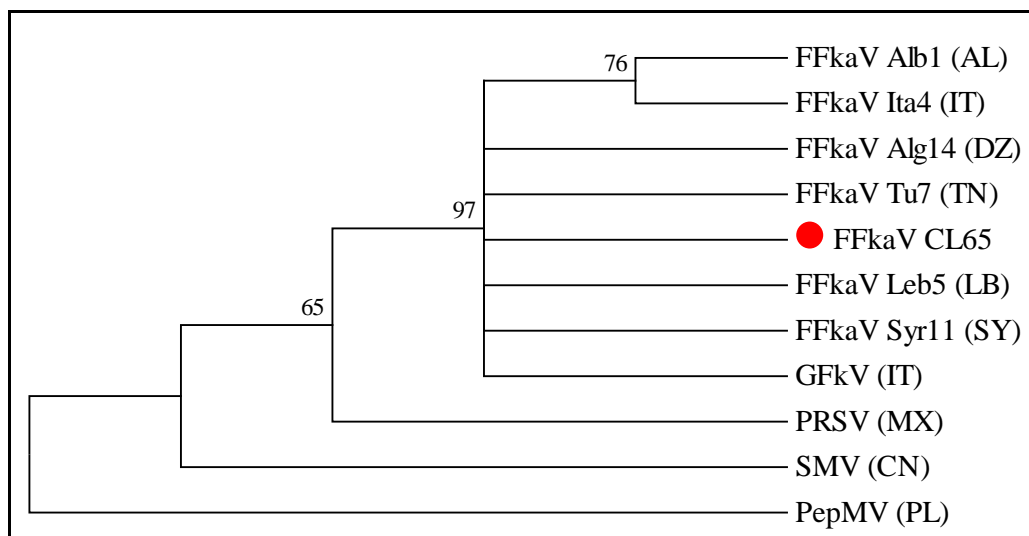


Figura 14.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas parciales del gen que codifica para la CP de FFkaV (el aislado chileno se encuentra marcado con un punto rojo) comparadas con secuencias de virus de la familia Closteroviridae.

Para los cuatro aislados chilenos de FMV se utilizaron como referencia dieciséis aislados presentes en GenBank y como grupo externo se usaron dos cepas de *European mountain ash ringspot virus* (EMARV). Los números de accesión se encuentran detallados en el Apéndice IV. Las cuatro secuencias chilenas se agrupan consistentemente con la mayoría de los aislados japoneses de FMV y con un aislado desde Canadá, separándose de los otros procedentes de Serbia, Italia y el JTTPa de Japón. El porcentaje de identidad entre los aislados de FMV fue de entre 93,4-99,5%. Los resultados del análisis fenético se encuentran detallados en la Figura 15.

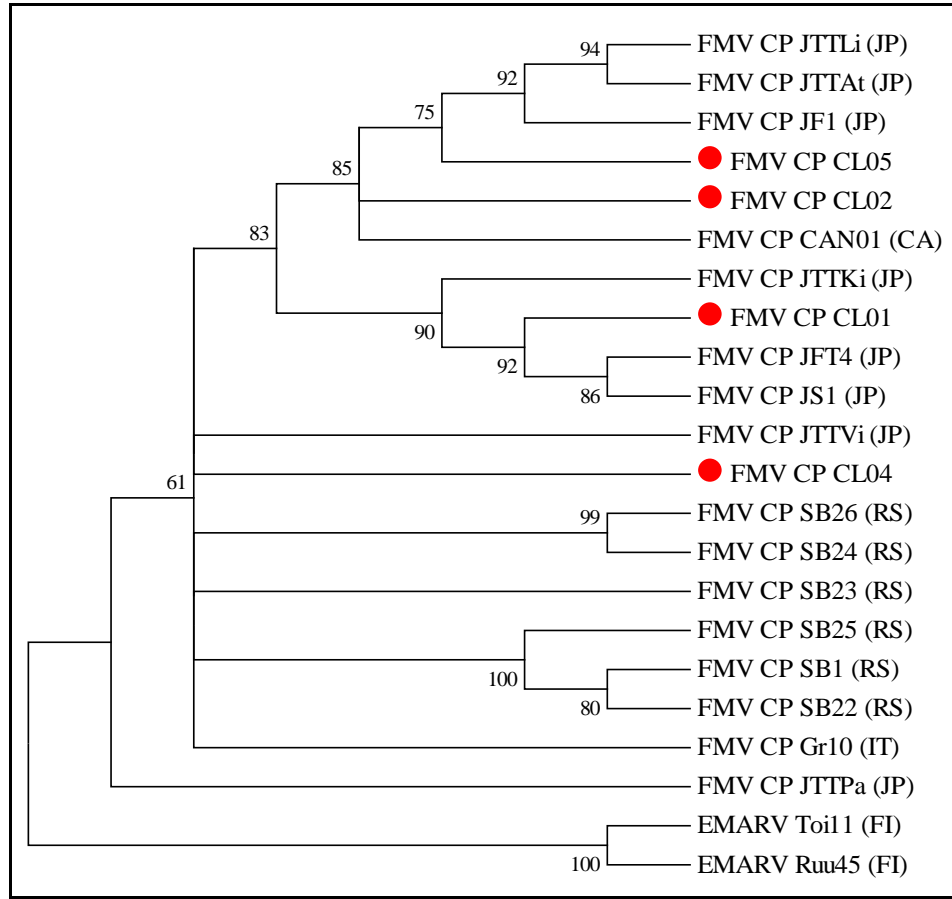


Figura 15.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la CP de FMV comparadas con dos secuencias de *European mountain ash ringspot virus* (EMARV). Los aislados chilenos de FMV se encuentran marcados con un punto rojo.

Para FLMaV-1, la caracterización molecular se realizó con dos aislados chilenos comparados con un aislado de referencia del mismo virus procedente de Italia, y adicionalmente se utilizó cepas de *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) y *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), una cepa chilena y otra italiana de FMMaV y a *Beet yellow virus* (BYV) como aislados de referencia, todos miembros de la familia Closteroviridae. Los números de accesoión se encuentran detallados en el Apéndice IV. Se observa un claro agrupamiento de los aislados de FLMaV-1. Los resultados del análisis fenético se presentan en la Figura 16.

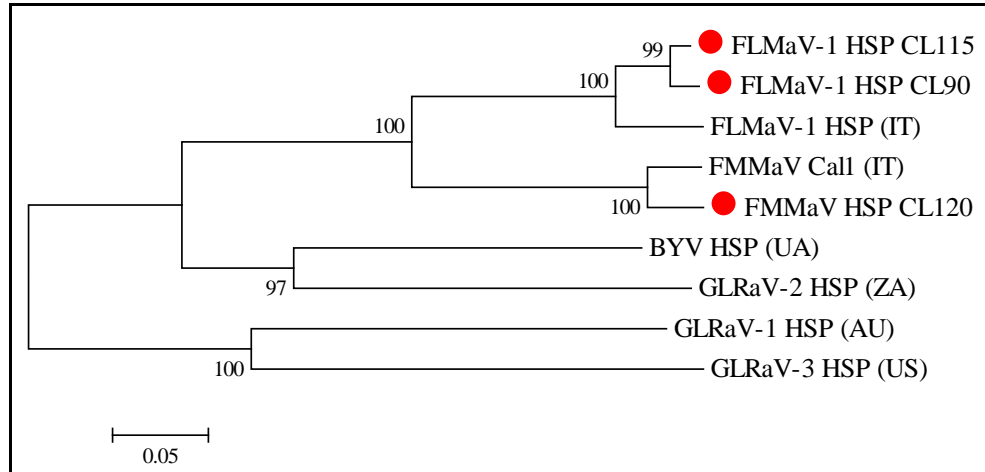


Figura 16.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la HSP70 de FLMaV-1 comparadas con secuencias de *Fig mild mottle-associated virus*. Los aislados chilenos de FLMaV-1 y FMMaV se encuentran marcados con un punto rojo.

Finalmente, para AFCV-2 no existen secuencias para comparar molecularmente, obstáculo que fue subsanado usando únicamente grupos de referencia externos, miembros de la familia Closteroviridae. Los números de accesoión se encuentran detallados en el Apéndice IV. Al no existir secuencias de referencia de AFCV-2 sólo se puede afirmar que este virus es el mismo detectado por Tzanetakakis *et al.*, (2010) y que este virus pertenece a la familia Closteroviridae. Los resultados del análisis fenético se observan en la Figura 17.

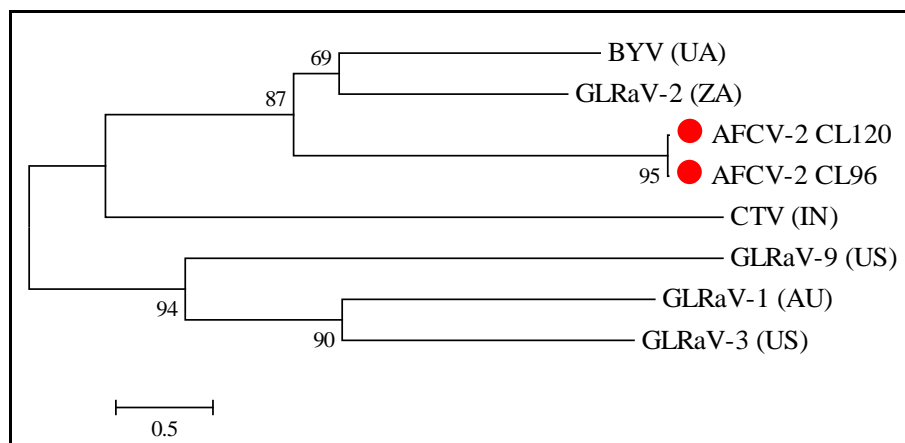


Figura 17.- Árbol fenético para comparación de secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la HSP90 de AFCV-2 comparadas con secuencias de otros miembros de la familia Closteroviridae. Los aislados chilenos de AFCV-2 se encuentran marcados con un punto rojo.

DISCUSIÓN

Con este trabajo de investigación no sólo se confirma la presencia de FMD en Chile, pero también se observa que esta enfermedad es producida por un complejo patogénico, en el cual participan algunos virus, y no únicamente FMV como se pensó en algún momento (Caglar *et al.*, 2010). La caracterización molecular de los virus encontrados en este trabajo constituye un aporte para el entendimiento de esta enfermedad y de los virus asociados a ella.

La evaluación del impacto económico de FMD a nivel mundial es complicada ya que es difícil encontrar huertos sanos que sirvan como referencia (Segarra *et al.*, 2005). Esto concuerda con lo observado durante la prospección realizada en Chile, donde no fue posible encontrar plantas sin síntomas.

Prospección

La alta prevalencia de FBV-1 y FMV en las muestras chilenas analizadas concuerda con los datos obtenidos en otros países. En Nueva Zelanda, al igual que en Chile, FLV-1 no fue detectado, mientras que FMV y FBV-1 fueron los más frecuentes (Minafra *et al.*, 2012). El alto porcentaje de plantas infectadas con FBV-1 se debe a la capacidad del virus de integrarse en el genoma del hospedero, y a la facilidad con la cual se transmite mecánicamente (Laney *et al.*, 2012).

La presencia de FLMaV-1 y FLMaV-2 en 62,18% y en 10,92% de las muestras también es consistente con los resultados reportados en otros países como Egipto, Líbano y Arabia Saudita (Elbeaino *et al.*, 2007b; Elbeashehy y Elbeaino, 2011; Elbeaino *et al.*, 2012). Es necesario confirmar la transmisibilidad del posible vector reportado para estos virus, *Planococcus ficus*.

Para FMMaV, los resultados de Elbeaino *et al.*, (2012) también son consistentes, ya que los porcentajes de plantas infectadas con este virus, (20,01% en Chile y 26,5% en Líbano) son similares. AFCV-2 y FFkaV se encontraron en porcentajes de 7,56% y 3,36% respectivamente en las muestras analizadas. Estos porcentajes menores podrían indicar que estos virus juegan un papel menor, pero no inexistente en el desarrollo de la Enfermedad del Mosaico de la Higuera (FMD).

La ausencia de FCV, FLV-1 y AFCV-1 se puede atribuir a la distribución irregular de estos virus en los diferentes países. Aunque es oportuno recordar que la savia o látex de

la higuera contiene una alta concentración de polifenoles que, en nuestro estudio, podrían haber dificultado la detección. De hecho, fue necesario cambiar la metodología inicial de extracción de ácidos nucleicos totales (TNA) con litio descrita por Hughes y Galau (1989) a la de sílica, descrita por Mackenzie *et al.*, (1997), debido a la presencia de falsos positivos y en general por la baja eficiencia de detección de los otros virus.

Las infecciones mixtas de virus fitopatógenos son muy comunes en la naturaleza, y un número importante de enfermedades virales son el resultado de las interacciones de sus agentes causantes (Elbeaino *et al.*, 2011c; Elci *et al.*, 2012). Los virus de plantas que co-infectan a un mismo hospedero generalmente interactúan en una forma antagonista o sinérgica (García-Cano *et al.*, 2006; Tzanetakis *et al.*, 2010; Syller, 2011). En esta investigación, las infecciones mixtas son más comunes que las infecciones individuales, lo cual es respaldado por lo observado por Elci *et al.*, (2012). Los mismos autores indican que el 83% de las muestras analizadas están infectadas con al menos un virus, siendo el más común FBV-1 con 82% y FMV con un 79% de prevalencia. Esto también se evidencia con los resultados de la presente investigación, en la cual los virus más comúnmente encontrados fueron los mismos y con una incidencia similar, especialmente con FBV-1. Las infecciones mixtas constituyen un problema al momento de definir una asociación entre especie viral presente y síntomas observados.

Síntomatología

En otros estudios se ha observado que los virus FMMAV y FFkaV podrían ser responsables de deformaciones de láminas, hojas palmeadas, y decoloraciones, (Elbeaino *et al.*, 2010). Un síntoma que ha sido asociado a FFkaV es una decoloración discreta de las venas, es decir un ‘flecking’ (Elbeaino *et al.*, 2011b), que en este estudio fue considerado como un tipo de bandeamiento de nervaduras.

El virus AFCV-2 está generalmente asociado con la presencia de anillos cloróticos y bandeamiento de nervaduras en las muestras observadas. Las deformaciones no parecerían ser a causa de este virus.

Por otro lado FLMAV-1 y FLMAV-2 podrían estar más involucrados en el bandeamiento de nervaduras que cualquier otro síntoma, ya que aunque no fue registrado como un síntoma separado, las nervaduras de las hojas aparecían especialmente decoloradas en las muestras con cualquiera de estos dos virus.

Las diversas combinaciones virales presentaron una gran variabilidad de síntomas en las plantas muestreadas, que no guardaban una relación aparente con la presencia de un

determinado virus. Establecer una relación entre la sintomatología y la presencia o ausencia de los virus requeriría de otro tipo de estudios comparativos.

Sin embargo, es posible que existan posibles relaciones antagónicas y sinérgicas entre los virus detectados, ya que en algunas combinaciones se observó una posible atenuación de los síntomas y en otras, un aumento en la severidad de éstos. Este análisis se realizó únicamente de manera visual.

La expresión de síntomas distintos y de diversos tipos en una misma ramilla es un hecho que ha sido observado por otros autores (Hafez *et al.*, 2011). Esto también fue observado en esta investigación, y se podría afirmar que la distribución de un determinado virus en la planta es bastante aleatoria y por lo tanto éste no se acumula siguiendo una lógica determinada. Otro factor que pudo haber influido en esta situación es que la variedad más común encontrada en el campo fue “Black Mission” con 35 plantas, sólo 2 plantas eran de la variedad “Kadota” y 58 plantas eran de diferentes variedades. Las diversas variedades podrían haber expresado diferencialmente los síntomas, información que fue sugerida por Burnett (1960).

Adicionalmente, otros virus o patógenos no conocidos y/o no considerados en este estudio, podrían influir en la aparición de los síntomas. Esto explicaría porque en cuatro muestras con síntomas no se detectó ninguno de los diez virus buscados. Esto confirma la necesidad de considerar que la Enfermedad del Mosaico de la Higuera no está asociada con la presencia exclusiva de FMV.

Microscopía

En estudios anteriores, se ha encontrado la presencia de DMBs, junto con una acumulación de gránulos de almidón cerca de estas partículas (Hafez *et al.*, 2011; Çağlayan *et al.*, 2009). En este trabajo se comprueba la aparición de estas partículas en tejidos foliares infectados con virus. La presencia de estas partículas en nuestro trabajo podría sugerir que los DMBs están involucrados en la etiología de FMD.

Caracterización molecular

FMD es una enfermedad en la cual todavía se requiere de mucha investigación para determinar cuáles son los virus asociados. La poca información existente sobre la caracterización molecular de estos patógenos dificultó este trabajo ya que en muchos casos existía solamente un número muy limitado de secuencias con cuales comparar, y en algunos casos, la información era inexistente como en el caso de AFCV-2.

Los análisis fenéticos permitieron determinar las relaciones entre los aislados virales encontrados en Chile y otros aislados reportados en otros países.

En el caso de FBV-1, todos los aislados chilenos se agruparon consistentemente con todos los aislados de referencia. Los porcentajes de similitud de secuencias chilenas con aquellas de referencia (entre 98 y 100%) confirman la identificación positiva, y por lo tanto la presencia de este virus en Chile. Adicionalmente, esta alta similitud entre las diferentes secuencias podría explicarse por la facilidad que tiene este virus de integrarse en el genoma del hospedero y por lo tanto protegerse de la maquinaria defensiva del hospedero y evitar modificaciones y mutaciones puntuales (Laney *et al.*, 2012).

En el caso de FLMaV-2 también se observa una diferencia clara entre los aislados chilenos y las secuencias de referencia encontradas en otros países. En el caso de FMMaV, a pesar del alto porcentaje de identidad, tres de los aislados chilenos (FMMaV CL-72, FMMaV CL-49 y FMMaV CL-90) se separan en un subgrupo junto con el aislado de referencia, mientras que la cepa FMMaV CL-101 diverge de estas cuatro secuencias, pero mantiene su identidad dentro de la misma raíz. Esta divergencia indicaría que los orígenes de esta cepa viral todavía requieren de estudios posteriores. En el caso de FFkaV, el aislado chileno se encuentra en un subgrupo aparte del resto de aislados pero dentro de un mismo taxón basal y con un alto porcentaje de identidad entre las otras secuencias. Sin embargo, los altos porcentajes de identidad entre las secuencias de FLMaV-2, FMMaV y FFkaV con sus respectivos aislados de referencia confirman la identificación positiva, y por lo tanto la presencia de estos virus en las higueras chilenas.

En el caso de FMV, la caracterización fue mucho más sencilla ya que existe una gran diversidad de aislados publicados en GenBank con los cuales se puede hacer una comparación fenética. La mayoría de los aislados de referencia son japoneses y los aislados chilenos se relacionan cercanamente con estos aislados, con excepción del aislado FMV CP CL-4, que se encuentra separado de la agrupación de aislados chilenos, pero dentro del gran grupo de FMV. Esta secuencia no se relaciona cercanamente con los aislados japoneses ni con los aislados serbios, por lo que los orígenes de esta cepa viral todavía requieren de estudios posteriores. El porcentaje de identidad fue bastante alto (93,4-99,5%), lo cual confirma la identidad de los aislados chilenos como FMV.

En el caso de FLMaV-1, dos de los aislados chilenos son muy similares entre sí (98,9% de identidad) a pesar de haber sido encontrados en diferentes localidades de muestreo. Se mantienen agrupados en una misma rama común a la secuencia de referencia italiana. El porcentaje de identidad entre los aislados chilenos y el aislado de referencia es de 92,7%. Se pudo observar claramente la diferenciación entre este virus y FMMaV, que fue ubicado en un subgrupo distinto. Se confirma la presencia en Chile de FLMaV-1 y FMMaV.

El caso de AFCV-2 fue sin duda el que presentó una mayor complicación en el análisis filogenético ya que no existen secuencias de referencia, y además la detección de este fragmento se basa en la utilización del gen HSP90, que no está muy bien estudiado, incluso en otras familias virales. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, la separación de AFCV-2 de los grupos externos permite constatar que este virus tiene características moleculares diferentes a los otros virus, por lo tanto se podría considerar como un nuevo virus perteneciente a la familia Closteroviridae, siempre y cuando se obtengan mayores informaciones acerca de su genoma.

Durante esta investigación se determinó la presencia de siete virus que infectan a la higuera en Chile. La caracterización molecular de estos aislados indica que no se diferencian de aquellos encontrados en otras zonas frutícolas del mundo. Solo en el caso de AFCV-2, se obtuvieron por primera vez secuencias parciales del virus, que contribuirá a definir si verdaderamente se trata de un nuevo virus presente en la higuera.

CONCLUSIONES

Este estudio es una contribución para el mejor entendimiento de la Enfermedad del Mosaico de la Higuera y sus agentes causales, y también para la fitovirología chilena.

Se confirma que la Enfermedad del Mosaico de la Higuera no es causada únicamente por FMV, sino que es resultado de la interacción de un complejo viral, que posiblemente incluya a otros patógenos.

De los diez virus prospectados, se encontró que sólo siete de ellos están infectando a las higueras chilenas: FBV-1, FMV, FLMaV-1, FMMaV, FLMaV-2, AFCV-2 y FFkaV; de los cuales los más comunes fueron los tres primeros, encontrados en más del 60% de las muestras analizadas.

Se observaron infecciones múltiples, constituidas principalmente de tres y cuatro virus y sólo en cuatro plantas no se detectó ninguno de los virus analizados. Es necesario prestar especial atención a las interacciones de los virus en infecciones múltiples, ya que podría ayudar a dilucidar la verdadera etiología de la Enfermedad del Mosaico de la Higuera.

Se observó una amplia variabilidad de síntomas en las plantas de higuera muestreadas, como decoloraciones y deformaciones, que también variaban en intensidad; sin embargo, no se puede establecer una relación entre estos síntomas, su intensidad y la presencia o ausencia de virus determinados.

La caracterización molecular de los aislados chilenos confirma la detección e indica que no presentan diferencias importantes con aislados encontrados en otros países.

Con esta investigación se da el primer paso para obtener plantas de higuera libres de virus, lo cual es un aporte importante para controlar eficazmente esta enfermedad en los predios chilenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abou-Awad, B.A.; El-Sawaf, B.M.; Reda, A.S.; Abdel-Khalek, A.A. 2000. Environmental management and biological aspects of the two eriophyoid fig mites *Aceria ficus* (Cotte) and *Rhyncaphytoptus ficifoliae* Keifer in Egypt. *Anzeiger SchÄdlingskunde* 73(1): 5-12.
2. Alfieri, S.A. 1967. Fig mosaic. Plant Pathology Circular Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture: 2 p.
3. Alhudaib, K. 2012. Incidence of Fig leaf mottle-associated virus and Fig mosaic virus in eastern province of Saudi Arabia. *International Journal of Virology* 8(1): 128-132.
4. Auger, A.J. 1989. Tomato ringspot virus associated with brownline disease on prune trees in Chile. *Acta Hortic.* 235:191-204.
5. Besoaín, X.A.; Valenzuela, M.; Castro, M.; Ballester-Olmos, J.F. 2000. Current status of some virus and virus-like diseases of citrus in Chile. *Fitopatología.* 35(2):98-104.
6. Bravo, J. 2011. El mercado de fruta fresca 2010. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Gobierno de Chile: 15.p.
7. Brien, J. y Hardy T.S. 2002. Fig growing in NSW. AGFACTS. NSW Agriculture: 8 p.
8. Burnett, H.C. 1960. Species of *Ficus* Susceptible to the Fig Mosaic Virus. *Florida State Horticultural Society*: 316-321.
9. Caglar, B.K.; Fidan, H.; Guldur, M.E.; Elbeaino, T. 2010. The Prevalence of Three Viruses Infecting Fig in Southern Turkey. *Journal of Phytopathology* 159(3): 181-183.
10. Çağlayan, K.M.; Gazel, M.; Uluba Serçe, C.; Soylu, S.; Yalcin, S. 2007. Is a phytoplasma responsible for fig mosaic disease? *Bulletin if Insectology* 60(2): 149-150.
11. Çağlayan, K.V.; Medina, V.; Gazel, M.; Serçe, C.U.; Serrano, L.; Achon, M.A.; Soylu, S.; Caliskan, O.; Gumus, M. 2009. Putative agents of fig mosaic disease in Turkey. *Turk J. Agrc. For.* 33: 469-476.

12. Çağlayan, K.V.; Serçe, C.U.; Barutçu, E.; Kaya, K. 2010. Comparison by Sequence-Based and Electron Microscopic Analyses of Fig mosaic virus Isolates Obtained from Field and Experimentally Inoculated Fig Plants. *Plant Disease* 94(12): 1448-1452.
13. Castellano, M.A.; Gattoni, G.; Minafra, A.; Conti, M.; Martelli, G. 2007. Fig Mosaic in Mexico and South Africa. *Journal of Plant Pathology* 89(3): 441-444.
14. Castellano, M.A.; De Stradis, A.; Minafra, A.; Boscia, D.; Martelli, G. 2009. Seed Transmission of Fig Latent Virus 1. *Journal of Plant Pathology* 91(3): 697-700.
15. Condit I.J. y Horne W.T. 1933. A mosaic of the fig in California, *Phytopathology*, 23: 887-896.
16. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; De Stradis, A.; Martelli, G. 2006. Partial Characterization of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig." *Journal of Plant Pathology* 88(2): 187-192.
17. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; De Stradis, A.; Martelli, G. 2007a. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology* 89(1): 119-124.
18. Elbeaino, T.E.; Choueiri, E.; Hobeika, C.; Digiario, M. 2007b. Presence of Fig Leaf Mottle - Associated Virus 1 and 2 in lebaniese Fig Orchards. *Journal of Plant Pathology* 89(3): 409-411.
19. Elbeaino, T.E.; Nahdi, S.; Digiario, M; Alabdullah, A.; Martelli, G. 2009a. Detection of FLMaV-1 and FLMaV-2 in the Mediterranean Region and Study on Sequence Variation of the HSP70 Gene. *Journal of Plant Pathology* 91(2): 425-431.
20. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Alabdullah, A.; De Stradis, A.; Minafra, A.; Mielke, N.; Castellano, M.A.; Martelli, G. 2009b. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology* 90(5): 1281-1288.
21. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Martelli, G. 2009c. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of Virology* 154(11): 1719-1727.
22. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Heinoun, A.; De Stradis, A.; Martelli, G. 2010. Fig Mild Mottle - Associated Virus, A novel Closterovirus Infecting Fig. *Journal of Plant Pathology* 92(1): 165-172.

23. Elbeaino, T.E.; Kubaa, R.; Digiario, M.; Minafra, A.; Martelli, G. 2011a. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Fig cryptic virus*, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes* 42(3): 415-421.
24. Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Martelli, G. 2011b. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research* 161(2): 198-202.
25. Elbeaino, T.E.; González Rodríguez, A.M.; Grajal - Martín, M.J.; Digiario, M.; 2011c. Survey of Fig Viruses in the Canary Islands. *Journal of Plant Pathology* 93(3): 737-739.
26. Elbeaino, T.E.; Mortada, C.; Digiario, M.; Choueiri, E. 2012. Survey on Fig Viruses in Lebanon. *Acta Horticulturae* 940: 665-668.
27. Elbeaino, T.E.; Whitfield, A.; Sharma, M.; Digiario, M. 2013. Emaravirus-specific degenerate PCR primers allowed the identification of partial RNA-dependent RNA polymerase sequences of Maize red stripe virus and Pigeonpea sterility mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 189(1-2): 37-40.
28. Elbeshehy, E.K.F. y Elbeaino, T.E. 2011. Viruses infecting figs in Egypt. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 327-332.
29. Elci, E.; Cigdem, U.; Serçe, C.U.; Çağlayan, K.V. 2012. Molecular Detection and Comparative Sequence Analysis of Viruses in Fig Trees in Turkey. *Journal of Phytopathology* 160: 418-423.
30. Fiore N.; Prodan S.; Montealegre J.; Aballay E.; Pino A.M.; Zamorano A. 2008. Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 90: 125-130.
31. Fiore N.; Araya C.; Zamorano A.; González, F.; Mora R.; Sánchez-Navarro J.; Pallás V.; Rosales I.M. 2010. Tracking *Plum pox* virus in Chile throughout the year by three different methods and molecular characterization of Chilean isolates. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 156-161.
32. García-Cano, E.; Resende, R.O.; Fernandez-Muñoz, R.; Morines, E. 2006. Synergistic interaction between tomato chlorosis virus and tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance of tomato. *Phytopathology* 96: 1263-1269.
33. Gatica, L. 2007. El despertar de los higos y las granadas. *Revista del Campo, Diario el Mercurio*. Fecha de publicación: 2 de mayo de 2007. Santiago, Chile.

[<http://www.chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/3583/El-despertar-de-los-higos-y-las-granadas.html>] Consulta: 13 - Abr - 2013.

34. Gattoni, G.A.; Minafra, A.; Castellano, M.A.; De Stradis, A.; Boscia, D.; Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Martelli, G. 2009. Some properties of Fig Latent Virus 1, a new member of the family Flexiviridae. *Journal of Plant Pathology* 91(3): 555-564.
35. Gattoni, G.A.; Minafra, A.; Castellano, M.A.; De Stradis, A.; Boscia, D.; Elbeaino, T.E.; Digiario, M.; Martelli, G. 2010. Worldwide diffusion of Fig latent virus 1 in fig accessions and its detection by serological and molecular tools. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.
36. Ghazi, F.; Rahmat, A.; Yassin, Z.; Ramli, N.S.; Buslima, N.A. 2012. Determination of Total Polyphenols and Nutritional Composition of Two Different Types of *Ficus carica* Leaves Cultivated in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Nutrition* 11(11): 1061-1065.
37. Haelterman, R. y Docampo, D. 1994. In Vitro propagation of Mosaic-Free Fig (*Ficus carica* L.) cultivars, using thermotherapy and shoot tip cultures. *RIA. INTA, Argentina* 25(3): 15-22.
38. Hafez, E., El-Morsi. A.A.; Abdelkhalek, A.A. 2011. Biological and Molecular Characterization of the Fig Mosaic Disease. *Molecular Pathogens* 2(2): 10-17.
39. Hashemi, S.A.; Abediankenan, S.; Ghasemi, M.; Azadbakht, M.; Yusefzadeh, Y.; Dehpour, A.A. 2011. The Effect of Fig Tree Latex (*Ficus carica*) on Stomach Cancer Line. *Iranian Red Crescen Medical Journal* 13(4): 272-275.
40. Herrera, M.G. 1996. Panorama virológico en frutales de carozo, pomáceas y vides en la zona central de Chile. *Simiente* 66:35-36.
41. Herrera, M.G. 1997. Enfermedades causadas por virus en frutales; panorama y perspectivas. p. 132-136. *In Anuario del Campo*. Ediciones Lo Castillo, Santiago, Chile.
42. Hughes, W. D. y Galau, G. 1989. Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Molecular Biology Reporter* 6(4): 253-257.
43. Ishikawa, K.; Maejima, K.; Komatsu, K.; Kitazawa, Y.; Hashimoto, M.; Takata, D.; Yamaji, Y.; Namba, S. 2012a. Identification and characterization of two novel genomic RNA segments of fig mosaic virus, RNA5 and RNA6. *Journal of General Virology* 93(Pt 7): 1612-1619.

44. Ishikawa, K.; Maejima, K.; Nagashima, S.; Sawamura, N.; Takinami, Y.; Komatsu, K.; Hashimoto, M.; Yamaji, Y.; Yamamoto, J.; Namba, S. 2012b. First report of fig mosaic virus infecting common fig (*Ficus carica*) in Japan. *J. Gen. Plant. Pathol.* 78: 136-139.
45. Laney, A.G.; Hassan, M.; Tzanetakis, I.E. 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germoplasm. *Phytopathology* 102(12): 1182-1189.
46. Lansky, E.P. y Paavilainen, H.M. (Eds). 2011. *Figs: The Genus Ficus. Traditional Herbal Medicines for Modern Times*, CRS Press. 387 p.
47. Lavin, A. y Reyes, M. 2004. Higuera (*Ficus carica*) *En: Frutales: especies con potencial en el secano interior*. A. Lavin and K. Matsuya. Chillán, INIA. 120: 149.
48. Mackenzie, D.J.; McLean, M.A.; Mukerji, S.; Green, M. 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.
49. Mielke, N. y Muhlbach, H.P. 2012. Emaravirus: A novel genus of multipartite, negative strand RNA Plant Viruses. *Viruses* 4: 1515-1536.
50. Minafra, A., Chiumenti, M.; Martelli, G. 2012. Fig Tree Viruses in New Zealand. *Journal of Plant Pathology*: 2.
51. Montealegre, J.; Oyarzún, J.; Herrera, R.; Berger, H.; Galletti, L. 2000. Nota científica: Identificación de hongos causantes de pudriciones en Postcosecha de Brevas e Higos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 26: 439-443.
52. Palmateer, A.; Tarnowski, T.L.B.; Roberts, P.D. 2010. *Florida Plant Disease Management Guide: Fig (Ficus carica)*. University of Florida: 4.
53. Pandey, K.B. y Rizvi, S.I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5): 270-278.
54. Peralta, L. 1993. Nuevos registros de especies de eriófitos (Acarina, Eriophyoidea) en higuera (*Ficus carica* L.) y palto (*Persea americana* Mill.) en Chile. *Agricultura técnica (Chile)* 53(1): 101-103.
55. Romero, J.I. 2005. Análisis técnico productivo y evaluación económica de un proyecto de producción de higos (*Ficus carica*) para exportación ubicado en la

comuna de Lampa (Región Metropolitana). Universidad de las Américas. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. 177 p.

56. Salomon, R.; Mawassi, M.; Flasihman, M.A. 2008. Isolation and Characterization of a Virus from Fig Leaves Exhibiting Mosaic Symptoms and Development of a Sensitive Detection Procedure for this Virus. *Acta Horticulturae* 798: 259 - 262.
57. Segarra, J.; Juárez, M.; Castellvell, D.; Achon, M.A.; Medina, V. 2005. Incidencia del mosaico de la higuera en dos zonas del este de España. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 31: 407-415.
58. Serrano, L.; Ramón, J.; Segarra, J.; Medina, V.; Achon, M.A.; López, M.M.; Juárez, M.; 2004. New Approach in the Identification of the Causal Agent of Fig Mosaic Disease. *Acta Horticulturae* 657: 559- 566.
59. Serrano, L.; Benito, A.; Medina, V.; Achon, M.A. 2008. Fig Mosaic Disease: Associated Protein and cDNA. *Acta Horticulturae* 798: 227-232.
60. Shahmirzaie, M. Rakhshandehroo, F.; Zamanizadeh, H.R.; Elbeaino, T.; Martelli, G. 2010. First Report of Fig Mosaic Virus from Fig Trees in Iran. *Journal of Plant Pathology* 92(S4 (Supplement 4)): S4.107 - S4.120.
61. Shahmirzaie, M.; Rakhshandehroo, F.; Zamanizadeh, H.R. 2012. Current Status of Fig Mosaic Disease in Iran. *Journal of Plant Pathology* 160: 324-330.
62. Sirisha, N.; Sreenivasulu, M.; Sangeeta, K.; Madhusudhana, C.C. 2010. Antioxidant properties of Ficus Species - A Review. *International Journal of PharmTech Research* 2(4): 2174-2182.
63. Spiegel, S. y Martin, R.R. 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and micro-tubers by polymerase chain reaction and ELISA. *Annals of Applied Biology* 122:493-500.
64. Starr, F.; Starr, K.; Loope, L. 2003. *Ficus carica*: Edible Fig: 6 p. United States Geological Survey-Biological Resources Division. Hawaii – United States.
65. Stover, E. y Aradhya, M. 2007. The Fig: Overview of an Ancient Fruit. *Hort Science* 42(5): 1084-1087.
66. Syller, J. 2011. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol.* 13: 204-216.

67. Tzanetakis, I.E.; Laney, A.G.; Keller, K.E.; Martin, R.R. 2010. New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.
68. United States Department of Agriculture (USDA). 2001. Importation of Fresh Common Fig (*Ficus carica* L.) Fruit from Mexico into the Continental United States, USDA: 23.
69. Walia, J.J.; Salem, N.M.; Falk, B.W. 2009. Partial Sequence and Survey Analysis Identify a Multipartite, Negative-Sense RNA Virus Associated with Fig Mosaic. *Plant Disease* 93(1): 4-10.
70. Walia, J.J. y Bryce, W.F. 2012. Fig mosaic virus mRNAs show generation by cap-snatching. *Virology* 426: 162-166.
71. Yakoubi, S.; Elleuch, A.; Besaies, N.; Marrakchi, M.; Fakhfakh, H. 2007. First Report of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid on Fig with Symptoms of Fig Mosaic Disease. *Journal of Phytopathology* 155(2): 125-128.

APÉNDICES

Apéndice I - Variedades de higueras analizadas en cada localidad

Variedad	Localidad	Número de plantas analizadas
3 Fan Carga	Las Cardas	1
Adriático	Las Cardas	1
Albar	Las Cardas	1
Avignon	Las Cardas	1
Beyacicek	Las Cardas	1
Black Mission	Montepatria	6
Black Mission	Las Cardas	4
Black Mission	Lolol	9
Black Mission	Lampa	15
Black Mission	San Felipe	3
Boyuna	Las Cardas	1
Breva Blanca	Las Cardas	1
Brown Ischia	Las Cardas	1
Brown Turkey	Las Cardas	1
Calabacita	Las Cardas	1
Castagnolo	Las Cardas	1
Cervantes	Las Cardas	1
Cometa	Las Cardas	2
Cuello de Dama (N)	Las Cardas	1
Cuello de Dama (V)	Las Cardas	1
Del Líbano	Las Cardas	1
Del Rey	Las Cardas	1
Diadams	Las Cardas	1
Doña María	Las Cardas	1
Elegible	Las Cardas	1
Fraga	Las Cardas	1
Gota de Miel	Las Cardas	1
Granito	Las Cardas	1
Italia	Las Cardas	1
Kadota	Las Cardas	2
Karabakunya	Las Cardas	1
Kennedy	Las Cardas	1
Kitrini	Las Cardas	1
La Casta	Las Cardas	1
Larga Burdeo	Las Cardas	1
Magdalena	Las Cardas	1

N: Negra**V: Verde**

Apéndice I - Variedades de higueras analizadas en cada localidad (Continuación)

Variedad	Localidad	Número de plantas analizadas
Marroqui	Las Cardas	1
Mission	Las Cardas	1
Nápoles	Las Cardas	1
Napolitana	Las Cardas	1
Nazareth	Las Cardas	1
Negra Chata	Las Cardas	1
Negra Común	Las Cardas	1
Negra de España	Las Cardas	4
Panaché	Las Cardas	1
Parisienne	Las Cardas	1
Prasini	Las Cardas	1
Royal Vinger	Las Cardas	1
Sauco Morado	Las Cardas	2
Siyah Cicek	Las Cardas	1
Susak	Las Cardas	1
Tangers	Las Cardas	1
Telva	Las Cardas	1
Tiberio	Las Cardas	1
Toulouse	Las Cardas	1
Turco	Las Cardas	1
Uñigal	Las Cardas	1
Verdi Portugal	Las Cardas	1
Yediveren	Las Cardas	1
n.i.	Santiago	11
n.i.	Cajón del Maipo	4
n.i.	San Felipe	8

n.i.: no identificada

Apéndice II - Detalles sobre las muestras que fueron analizadas con microscopía electrónica.

Código muestra	Virus										Síntomas						
	FLMaV-1	FLMaV-2	FMV	FMMaV	FCV	FFkAV	FLV-1	AFCV-1	AFCV-2	FBV-1	Mosaico irregular	Anillos cloróticos irregulares	Bandeamiento de nervaduras	Clorosis	Hojas palmeadas	Hojas alobuladas	Deformación de lámina
OF46	+		+	+							X		X	X		X	X
OF49			+	+					+	X	X	X	X	X			X
OF75	+		+			+			+	X	X	X	X	X			X
OF86	+		+						+	X	X	X	X	X			X
OF87			+						+	X	X	X	X				X
OF142	+	+	+						+	X		X	X				X
OF146	+		+						+	X		X	X			X	X

Apéndice III - Soluciones y tampones

1. H₂O-BD estéril-DPC (Agua bi-destilada estéril tratada con Dimetil pricarbonato (DPC))

- 1 L de agua bi-destilada
- 1 ml DPC (Sigma D5520)

Trabajar bajo campana de extracción de gases porque el DPC es tóxico y volátil. Agitar lentamente en un envase cerrado sobre una placa de agitación magnética durante toda la noche. Autoclavar, alicuotar y almacenar a -20°C.

2. 'Grinding buffer' o tampón de macerado

- 23,6 ml de tiocianato de guanidina (Calbiochem 368975)
- 3,32 ml de acetato de sodio 3M pH 5,2 (Winkler BM1570)
- 16,66 ml de acetato de potasio 3M pH 5,0 (Winkler BM1355)
- 2,5 ml de EDTA pH 8,0 (Calbiochem 324503)
- 1,250 gr PVP 40kDa (Calbiochem 529504)
- Llevar a volumen final de 50 ml H₂O-BD estéril-DPC

Alicuotar (5-10 ml) y guardar a -20°C. El 'Grinding' buffer requiere de 2-mercaptoetanol, que se agrega desde una solución stock 0,3M antes del uso, después derretir la cantidad necesario de buffer. A una alícuota de 'Grinding' buffer de 10 ml se agregan 100 µl de solución de 2-mercaptoetanol stock 0,3M.

3. 2-mercaptoetanol 0,3M Solución Stock

- 21 µl de 2-mercaptoetanol (Winkler BM1200)
- 979 µl H₂O-BD estéril-DPC (Volumen final = 1 ml)

4. NaI 6M (ioduro de sodio)

- 0,75 gr de Na₂SO₃ (Sigma S4672)
- 36 gr de NaI (PM 149,9 gr/mol) (Merck 106523) (agregar al final lentamente)
- 40 ml de H₂O-BD estéril-DPC

Almacenar a 4°C en botella oscura (cubierta con papel aluminio)

5. SLS (sodio lauril sarcosil)

- 10 gr de Sodio Lauril Sarcosil (Sigma L9150)
- 100 ml de H₂O-BD estéril-DPC

Almacenar a 4°C en botella oscura (cubierta con papel aluminio)

6. Solución de sílica

En una probeta de 1000 ml agregar:

- 60 gr de sílica (Sigma S5631)
- 500 ml de H₂O-BD estéril-DPC

Cubrir la abertura de la probeta con parafilm y hacer presión. Agitar vigorosamente durante 10 minutos. Dejar decantar por 24 horas a 4°C en oscuridad. Eliminar 470 ml de sobrenadante (con una pipeta estéril de 25 ml). Con H₂O-BD estéril-DPC llevar a volumen final (500 ml). Agitar y luego dejar decantar por 5 horas a 4°C en oscuridad. Eliminar 440 ml del sobrenadante. Ajustar el pH a 2,0 con HCl diluido en H₂O-BD estéril-DPC. Transferir los 60 ml restantes a un envase de vidrio con tapa con un

agitador magnético adentro. Almacenar a 4°C en botella oscura (cubierta con papel aluminio)

7. 'Washing buffer' o tampón de lavado

- 500 µl de Tris-HCl pH 7,5 stock 1M
- 50 de µl EDTA pH 8,0 stock 0,5M
- 25 ml de etanol al 100% (Winkler AL0205)
- H₂O-BD estéril-DPC hasta llegar a volumen final (50 ml)

Almacenar a 4°C.

8. Tris-HCl 1M pH 7,5

- 12,114 gr de Tris (PM=121.14 gr/mol) (Calbiochem 648309)
- 80 ml de H₂O-BD estéril-DPC
- Ajustar el pH a 7,5 con HCl 5M diluido en H₂O-BD estéril-DPC
- Con H₂O-BD estéril-DPC llevar a volumen final (100 ml)

No autoclavar.

9. EDTA 0,5M pH 8,0

- 18,612 gr de EDTA
- 60 ml de H₂O-BD estéril-DPC
- Ajustar el pH con NaOH a 8,0 estable (sal sólo se disuelve a este pH)
- Con H₂O-BD estéril-DPC llevar a volumen final (100 ml)

Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente

10. dNTP's 10 mM solución Stock (Kappa KK1007) Proveedor: Merck

- Derretir sobre el hielo el set de tubos de cada nucleótido (100 mM)
- Diluir cada nucleótido a 10 mM
- Mezclar soluciones en partes iguales
- Homogenizar agitando en el vórtex
- Alicuotar a 50 µl

11. Solución stock para 'Random primers'

Los primers se comercializan liofilizados en la cantidad de 2 mg (Invitrogen 48190011). Centrifugar el tubo original por pocos segundos. Resuspender en 1 ml de H₂O-BD estéril-DPC. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente agitando en vórtex cada 3 minutos. El resultado es una solución stock de 2 mg/ml (2 µg/µl). Almacenar a -20°C en tubo de aluminio. La solución stock de 'Random' primer debe ser diluía previo a su uso. Para diluir esta solución stock agregar:

- 25 µl de solución stock
- 75 µl de H₂O-BD estéril-DPC

El resultado es una solución de 0,5 µg/µl. Alicuotar a 50 µl y almacenar a -20°C. Antes del uso, derretir lentamente sobre el hielo

12. Tampón de carga

- 8 ml de glicerol
- 0,02 gr e Bromphenol blue

- 0,02 gr de Xylenecyanol
- Con TE pH 8,0 llevar a volumen final (20 ml)

Homogenizar agitando en el vórtex. Alicuotar (1,5 ml) en tubos Eppendorf y sellar con Parafilm. Guardar a 4°C

13. Tampón TE

- 15 ml de H₂O-BD estéril-DPC
- 0,0242 gr de Tris
- 7,44 mg de EDTA
- 16,6 µl de HCl (diluido 1:1 en H₂O-BD estéril-DPC)
- Ajustar el pH a 8,0
- Con H₂O-BD estéril-DPC llevar a volumen final (20 ml)

14. Solución de agarosa para geles

Importante: los geles de agarosa se preparan con bromuro de etidio. Este reactivo es tóxico por lo que se debe manejar sólo con guantes, sólo en la zona predeterminada y con todo el equipamiento de laboratorio que corresponde. Se debe evitar respirar los vapores del gel caliente después de agregar el bromuro de etidio.

Para 100 ml de gel de agarosa al 1,2% se agrega a un matraz de uso exclusivo para la preparación de geles:

- 1,2 gr de agarosa
- 100 ml de búfer TAE 1x

Calentar en microondas hasta la disolución total de partículas de agarosa en el búfer. Enfriar la solución a 50°C. Agregar 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml)

15. Tampón TAE 50x (Tris-Acético-EDTA) Solución stock

- 242 gr de Tris
- 57,1 ml de ácido acético glacial (Merck 100063)
- 100 ml de EDTA 0,5M pH 8,0
- Con H₂O-BD estéril-DPC llevar a volumen final (1 L)

No autoclavar y almacenar a 4°C

16. Marcador molecular 100 bp (Invitrogen 15628-019)

- Diluir la solución comercial de 50x a 1x en H₂O-BD estéril-DPC
- Alicuotar a 100 µl
- Almacenar a -20°C

17. Medio de cultivo LB líquido

Para 100 ml:

- 0,5 gr de extracto de levadura (Concentración: 5 gr/lit)
- 0,5 gr de NaCl (cloruro de sodio) (Concentración: 5 gr/lit)
- 1 gr de triptona (peptona) (Concentración: 10 gr/lit)

Se aforó a 100 ml con H₂O-BD estéril-DPC y se autoclavó.

18. Medio de cultivo LB-Agar selectivo (*Cb*, *Str*, *IPTG* y *X gal*)

Para 100 ml:

- 0,5 gr de extracto de levadura (Concentración: 5 gr/lit)

- 0,5 gr de NaCl (cloruro de sodio) (Concentración: 5 gr/lit)
- 1 gr de triptona (peptona) (Concentración: 10 gr/lit)
- 1,5 gr de agar-agar

Se aforó a 100 ml con agar líquido

Apéndice IV.- Números de accesoión en el GenBank de los aislados usados en la caracterización molecular.

Virus	Aislado	Origen	No. Accesoión
<i>Beet yellows virus</i>	BYV HSP	Ucrania	X73476.1
<i>Cacao swollen shoot virus</i>	CSSV CI152-09	Costa de Marfil	JN606110.1
<i>Cacao swollen shoot virus</i>	CSSV	Togo	AJ781003.1
<i>Citrus tristeza virus</i>	CTV HA16-5	Estados Unidos	GQ454870
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	CYMV PM	India	EU489745.1
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	CYMV Rol	India	JN006806.1
<i>European mountain ash ringspot-associated virus</i>	EMARV Toi11	Finlandia	EU885293.1
<i>European mountain ash ringspot-associated virus</i>	EMARV Ruu45	Finlandia	EU885290.1
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 CA37	Estados Unidos	JN050882.1
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 AR4	Estados Unidos	JN112367.1
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 CA33	Estados Unidos	JN050878
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 CA39	Estados Unidos	JN050884
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 FL1	Estados Unidos	JQ282674
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 FS3	Estados Unidos	JQ282677.1
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 FS4	Estados Unidos	JQ282678
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 MI1	Estados Unidos	JQ282673
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 OH1	Estados Unidos	JQ282668
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 OR3	Estados Unidos	JQ282671
<i>Fig badnavirus 1</i>	FBV-1 SC1	Estados Unidos	JQ282672.1
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Alb1	Albania	FR821255
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Alg14	Algeria	FR821256
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Ita4	Italia	FR821254
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Leb5	Líbano	FR821257
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Syr11	Siria	FR821258
<i>Fig fleck-associated virus</i>	FFkaV Tun7	Túnez	FR821259
<i>Fig leaf mottle-associated virus 1</i>	FLMaV-1	Italia	AM113547
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Alb12	Albania	FN687736.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 BKE	Turkía	FN666270.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 L2I	Turkía	FN666271.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Lib80	Líbano	FN687743.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Syr8	Siria	FN687745.1

Apéndice IV.- Números de accesoión en el GenBank de los aislados usados en la caracterización molecular (Continuación).

Virus	Aislado	Origen	No. Accesoión
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Alg3	Algeria	FN687737.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Syr9	Siria	FN687746
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 Lib58	Líbano	FN687741.1
<i>Fig leaf mottle-associated virus 2</i>	FLMaV-2 M2	Irán	KC534878.1
<i>Fig mild mottle-associated virus</i>	FMMaV Cal1	Italia	FJ611959
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JTT-Li	Japón	AB697848.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JTT-At	Japón	AB697846.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JF1	Japón	AB697844.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV CAN01	Canadá	HQ703345.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JTT-Ki	Japón	AB697847.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JFT4	Japón	AB697845.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JS1	Japón	AB697843.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JTT-Vi	Japón	AB697850.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB2-6	Serbia	AB697856.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB2-4	Serbia	AB697854.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB2-2	Serbia	AB697852.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB2-3	Serbia	AB697853.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB2-5	Serbia	AB697855.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV SB1	Serbia	AB697851.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV Gr10	Italia	FM992851.1
<i>Fig mosaic virus</i>	FMV JTT-Pa	Japón	AB697849.1
<i>Grapevine fleck virus</i>	GFkV	Italia	NC_003347
<i>Grapevine leafroll associated virus 9</i>	GLRaV-9	Estados Unidos	AY297819.1
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	GLRaV-1 HSP	Australia	AF195822
<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>	GLRaV-1 HSP	Sudáfrica	EF103901
<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>	GLRaV-2 HSP	Sudáfrica	AY881628.1
<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	GLRaV-3 HSP	Estados Unidos	AF037268.2
<i>Papaya ringspot virus</i>	PRSV	México	AJ012650
<i>Pepino mosaic virus</i>	PepMV	Polonia	FJ612602
<i>Soybean mosaic virus</i>	SMV	China	KC896416
<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	SBCV BataviaD	Guadeloupe	FJ439817.1