

DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.), UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Detection of begomovirus in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)
using magnetic nanoparticles

✉ Yamila Martínez-Zubiaur*, ✉ Madelaine Quiñones Pantoja, Teresa Zayas Moreno,
Maria de la Angeles Varela Vázquez, Yenne Marrero Álvarez, ✉ Heidi González Álvarez

Laboratorio de Virología Vegetal y Molecular. Departamento de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).
Apartado 10. San José de las Lajas. Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del presente estudio fue el uso del juego de nanopartículas magnéticas CEA-NANO⁺ RNA 3.0, para la extracción de ácidos nucleicos a partir de material vegetal foliar de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con síntomas de amarillamiento, encrepamiento y enanismo de las plantas, similares a los descritos para begomovirus. Se realizaron extracciones de ácidos nucleicos utilizando el método previamente establecido en el laboratorio y el método de nanopartículas magnéticas. Posterior a la purificación de los ácidos nucleicos se realizó la detección por PCR del ADN viral, utilizando cebadores genéricos para begomovirus. Los resultados por ambos métodos se compararon, obteniéndose una adecuada sensibilidad y especificidad analítica para la amplificación de ADN purificados con partículas magnéticas. Se demuestra la factibilidad del uso del juego CEA-NANO⁺ RNA 3.0 para su uso en la detección de begomovirus.

Palabras claves: nanopartículas magnéticas, ácidos nucleicos, begomovirus, CEA-NANO⁺ RNA 3.0.

ABSTRACT: The objective of this study was to use the CEA-NANO⁺ RNA 3.0 magnetic nanoparticle kit for to extract nucleic acids from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf material with yellowing, curling, and dwarfing, symptoms similar to begomovirus infections. Nucleic acid extractions were carried out using a previously established laboratory method and a magnetic nanoparticles-based method. After nucleic acid purification, viral DNA was detected by PCR with generic begomovirus primers. The results of both methods were compared, and it was achieved an adequate sensitivity and analytical specificity for the amplification of DNA purified with magnetic particles. The feasibility of using the CEA-NANO⁺ RNA 3.0 kit for detection of begomoviruses was demonstrated.

Keys word: magnetic nanoparticles, nucleic acid, begomovirus, CEA-NANO⁺ RNA 3.0.

Los patógenos de las plantas continúan siendo factor limitante para los rendimientos agrícolas y reducen significativamente la productividad a nivel mundial, causando serios problemas para la seguridad y sostenibilidad alimentaria. En particular, las especies virales del género Begomovirus de la familia *Geminiviridae*, provocan severos y devastadores daños en cultivos de importancia económica como hortalizas, fibras y tubérculos, con una amplia diversidad molecular y distribución en zonas tropicales y subtropicales de todo el planeta (1).

A medida que aumenta la demanda mundial de producción de alimentos en un contexto de clima cambiante, la aplicación de la nanotecnología podría mitigar, de manera sostenible, muchos desafíos en el manejo de enfermedades en humanos, animales y plantas, mejorando las vías de administración de fármacos y productos químicos y biológicos, promoviendo

la detección rápida de patógenos y contribuyendo a las transformaciones genéticas (2, 3). En los últimos años se explora su potencial en la detección de patógenos en plantas, como herramientas de diagnóstico rápido, para la detección de bacterias, hongos y nematodos y, en menor medida, para enfermedades virales; emergiendo esta tecnología como una herramienta potencial para mejorar la sensibilidad, precisión y rapidez de la identificación de patógenos, con métodos más rápidos, económicos y precisos (4, 5).

La extracción de ácidos nucleicos es uno de los pasos fundamentales en las aplicaciones de biología molecular, es un requisito previo para muchos experimentos y constituye un punto crítico para el desempeño de los métodos de diagnóstico e identificación de patógenos en humanos, animales y plantas dado que su calidad afecta, directamente, los resultados de la detección posterior (6, 7, 8).

*Autor para correspondencia, email: ymtnez1965@gmail.com

Recibido: 25/06/2025

Aceptado: 20/07/2025

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Martínez-Zubiaur Y: Conceptualización, desarrollo metodológico, curación de datos, adquisición de fondos, administración del proyecto, análisis formal, validación, visualización y escritura de la publicación, revisión y edición. Quiñones Pantoja M: investigación y revisión del artículo. Zayas Moreno T, Varela Vázquez MA y Marrero Álvarez Y: análisis formal e investigación y validación. González Álvarez H.: conceptualización, análisis formal e investigación.



Los métodos tradicionales de extracción de ácidos nucleicos requieren mucho tiempo, son laboriosos, y los operarios deben poseer capacitación, lo cual hace que el uso de las tecnologías emergentes, como la separación magnética, ofrezcan una serie de ventajas entre las que destacan el reducido tiempo de procesamiento, la ausencia de reactivos químicos tóxicos, la facilidad en la separación y automatización, además de la separación de ADN de contaminantes y desechos celulares. Las perlas magnéticas (MB) se consideran una herramienta poderosa para la extracción de ácidos nucleicos y utilizan los principios del magnetismo para el aislamiento eficiente de suspensiones biológicas. El acoplamiento de propiedades magnéticas con ligandos específicos en MB, permite la separación y purificación de ácidos nucleicos de una forma altamente eficiente y específica. Esta técnica ha impulsado una revolución tecnológica en la investigación biológica (8, 9).

Durante la pandemia de COVID-19, se dedicaron esfuerzos a lograr métodos que permitieran realizar purificaciones de ARN, masivas, eficaces y con disminución del tiempo dedicado a este paso y, ante esta necesidad, el Centro de Estudios Avanzados de Cuba, desarrolló el sistema de extracción magnética CEA-NANO⁺ RNA 3.0 (10), con resultados satisfactorios para la purificación de ARN en el diagnóstico de SARS-CoV-2, que fuera registrado, posteriormente, por los órganos reguladores del país (11).

El objetivo del presente estudio fue el uso del juego de nanopartículas magnéticas CEA-NANO⁺ RNA 3.0, para la extracción de ácidos nucleicos a partir de material vegetal foliar.

Para este estudio se utilizaron tres plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con síntomas de begomovirus a las cuales se le realizó extracción de ADN según el protocolo de CTAB (12) y con el sistema de nanopartículas magnéticas, acorde al instructivo de uso del juego de reactivos CEA-NANO⁺ RNA 3.0 (10), con modificaciones en el proceso inicial de homogenización del material vegetal, realizándose a partir de 1 g de material foliar de tomate infectado macerado en 0,3 ml de PBS pH 7 estéril. Seguidamente se colectaron 0,2 ml de la suspensión y se mezclaron con la solución de lisis-uniión (SLU-RNA3.0) del juego de reactivo CEA-NANO⁺ RNA 3.0 y 0,1 ml de NESP-A380. El resto

del procedimiento se realizó según el instructivo de uso de fabricante (10).

La amplificación de los ADN obtenidos, de ambos métodos, se realizó con los cebadores genéricos AV494/AC1048 (13) acorde al protocolo estándar para diagnóstico genérico de begomovirus (14). Como control positivo, se utilizó ADN de planta de tomate infectada, con el aislado cubano del virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV), especie *Begomovirus coheni* (15), del banco de ADN controles del laboratorio de Virología Vegetal y Molecular del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Como control negativo, se utilizó ADN extraído por el método de nanopartículas magnéticas, a partir de grelos de papa infectadas con *Pectobacterium carotova* y un control del proceso de PCR (mezcla de PCR sin ADN molde).

En la figura 1 se observa el fragmento de ADN amplificado en las tres muestras de campo, con el tamaño esperado de aproximadamente 580 pb, coincidente con el fragmento obtenido de la extracción con CTAB. Se observó que, en la extracción con CTAB, la amplificación fue obtenida solo en la dilución 1/10 a partir del ADN obtenido; mientras que, con el juego CEA-NANO⁺ RNA 3.0, se obtuvo amplificación en diluciones 1/10 y 1/20. La especificidad diagnóstica fue adecuada, dado que no se observó amplificación en los controles negativos utilizados.

La cuantificación de ADN se dificulta, con la extracción mediante nanopartículas, debido a que se obtiene en una misma extracción ARN y ADN totales, y para lograr esta cuantificación sería necesario insertar un paso de tratamiento con RNase o DNase de acuerdo al propósito (16).

El análisis de la sensibilidad analítica o límite de detección, a partir de las diluciones del ADN de la muestra 1 (Tabla 1) evidenció que, con la extracción de CEA-NANO⁺ RNA 3.0, es posible detectar begomovirus en plantas sintomáticas hasta diluciones de 1/100, con una adecuada sensibilidad.

Tabla 1. Comparación de la sensibilidad analítica de ambos métodos de extracción de ácidos nucleicos utilizados / Comparison of the analytical sensitivity between both nucleic acid extraction methods.

Método extracción	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200
CTAB	++	+/-	nr	nr	nr
CEA-NANO ⁺ RNA 3.0	+++	+++	++	++	+/-

nr: no realizado.

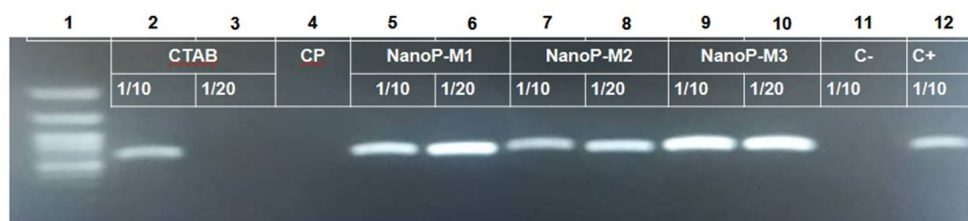


Figura 1. Fragmentos amplificados (580 pb) a partir de los ADN purificados, protocolo de CTAB (líneas 2 y 3). Líneas 5 a 10, protocolo con juego de reactivos CEA-NANO⁺ RNA 3.0 (NanoP-M1, NanoP-M2, NanoP-M3). Los ADN de cada muestra, con síntomas de begomovirus, fueron diluidos a 1/10 y 1/20. Marcador de peso molecular de 100 pb (Línea 1, Nippon Genetic Europe GmbH), Control del proceso PCR (CP, Línea 4), Control negativo (C-, Línea 11), Control positivo (C+, Línea 12) / Amplified fragments (580 pb) from purified DNA, CTAB protocol (Lanes 2 and 3), Lanes 5 to 10, CEA-NANO⁺ RNA3.0 kit protocol (NanoP-M1, NanoP-M2, NanoP-M3). The DNA from each sample with begomovirus symptoms were diluted to 1/10 and 1/20. Molecular weight marker (Lane 1, Nippon Genetic Europe GmbH), Process PCR control (CP, Lane 4), Negative control (C-, Lane 11), Positive control (C+, Lane 12).

Los resultados muestran la factibilidad del uso de este juego de reactivos, para la extracción de ADN viral, a partir de material foliar de plantas de tomate con adecuada sensibilidad y especificidad analítica y confirma las potencialidades de las nanopartículas funcionales para el desarrollo de metodologías rápidas y sensibles para la detección de patógenos de plantas, permitiendo la caracterización de begomovirus en Chile y tomate (17). Se demuestra que el juego de diagnóstico CEA-NANO⁺ RNA 3.0 puede ser utilizado para la extracción de ADN a partir de tejido vegetal, con resultados satisfactorios y constituye una alternativa rápida y sensible para implementar protocolos de detección, recomendándose su evaluación para la detección de otros patógenos de plantas.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue ejecutado con los fondos del proyecto PS223MY003-128 "Vigilancia fitosanitaria para sistemas sostenibles y resilientes, un reto en la soberanía alimentaria", financiado por el programa ramal de Salud Animal y Vegetal del Ministerio de la Agricultura de Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barboza N, Martínez Zubiaur Y. Begomoviruses in crops with economic interest for North and Central America. En: RK Gaur, Pradeep Sharma, Henery Czosnek (Eds). *Geminivirus: Detection, Diagnosis and Management*. Academic Press, ISBN 9780323905879; 2022. p.125-137.
2. Elmer W, White JC. The future of Nanotechnology in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology*. 2018; 56:1, 111-133.
3. Marwal A, Gaur RK. Nanophytovirology: An Emerging Field for Disease Management. En: Snježana Topolovec-Pintarić (Ed). *Plant Diseases-Current Threats and Management Trends*. 2019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86653> p 220.
4. Verma N, Shukla M, Kulkarni R, Pandya A. Emerging Extraction and Diagnostic Tools for Detection of Plant Pathogens: Recent Trends, Challenges, and Future Scope. *ACS Agricultural Science & Technology*. 2022; 2(3). DOI: <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00150>
5. Shivashakarappa K, Reddy V, Tupakula VK, Farnian A, Vuppula A, Gunnaiah R. Nanotechnology for the detection of plant pathogens, *Plant Nano Biology*. 2022; 2: 100018, ISSN 2773-1111.
6. Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020; 169: 112592. ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112592>
7. OMNI International Blog. Accelerating Nucleic acid extraction in agriculture. 2024. Disponible en: www.blog.omni-inc.com/tag/nucleic-acid-extraction
8. Chen Y, Liu Y, Shi Y, Ping J, Chen H. Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting. *Trends in Analytical Chemistry* 127. 2020; 115912.
9. Singh R, Kuddus M, Kumar PS, Choden D. Nanotechnology for Nanophytopathogens: From Detection to the Management of Plant Viruses. *BioMed Research International*. 2022, Article ID 8688584, 12 Pages. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2022/8688584>
10. CEA-NANO⁺ RNA 3.0. Sistema de extracción magnética de ARN a partir de muestras biológicas. Instrucciones para el uso. REV.04-01/2023. Disponible en: <https://www.cea.cu/wp-content/uploads/2024/07/Instructivo-Ed.04-01-2023-1.pdf>
11. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Ámbito Regulador. RESOLUCIÓN No. 43/2024. Disponible en: <https://www.cecmecmed.cu/vigilancia/equipos-medicos/alertas/comunicacion-fabricante-012022-instrucciones-uso-ipu> . Consultado Diciembre 2024.
12. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987. 19, 11-15.
13. Wyatt SD, Brown J. Detection of Subgroup III Geminivirus Isolate in leaf extract by Degenerate Primers and Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*. 1996; 86, p 1288-1293.
14. EPPO. PM 7/152 (1) Begomoviruses, Standard on Diagnostics. *EPPO Bulletin*. 2022; 52:643-664. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12887>
15. Roumagnac P, Ascencio-Ibanez, J, Lette JM *et al.* Rename 520 species (*Geplafuvirales: Geminiviridae*). International Committee on Taxonomy of Viruses. 2025. Disponible en : https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403484&taxon_name=Begomovirus%20coheni#release_35
16. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 73:495-504.
17. Lavanya R, Arun V. Detection of Begomovirus in Chilli and Tomato Plants Using Functionalized Gold Nanoparticles. *Sci Rep*. 2021; 9:11(1):14203. Disponible en: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-145079/v1>