

CURTOVIRUS COMO AGENTES FITOPATÓGENOS EN EL NORTE CENTRO DE MÉXICO

LUIS ROBERTO REVELES-TORRES, SILVIA SALAS-MUÑOZ,
JAIME MENA-COVARRUBIAS, RODOLFO VELÁSQUEZ-VALLE, JORGE
ARMANDO MAURICIO CASTILLO.



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

M.A. JOSÉ EDUARDO CALZADA ROVIROSA
Secretario

LIC. JORGE ARMANDO NARVÁEZ NARVÁEZ
Subsecretario de Agricultura

M.C. MELY ROMERO CELIS
Subsecretario de Desarrollo Rural

M.C. RICARDO AGUILAR CASTILLO
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. RAFAEL AMBRIZ CERVANTES
Encargado del Despacho de los Asuntos de la Dirección General

DR. RAÚL G. OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. ARTURO DANIEL TIJERINA CHÁVEZ
Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

MC. RICARDO ALONSO SÁNCHEZ GUTIERREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

CURTOVIRUS COMOS AGENTES FITOPATÓGENOS EN EL NORTE CENTRO DE MÉXICO

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F.
Teléfono (55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-0797-8

Primera Edición: Noviembre 2017

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Reveles-Torres L.R., Salas-Muñoz S., Mena-Covarrubias J., Velásquez-Valle R. y Mauricio-Castillo J.A. 2017. Curtovirus como agentes fitopatógenos en el norte centro de México. Folleto Técnico Núm 84. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 31 páginas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
Los Geminivirus.....	2
Curtovirus en México.....	6
ANTECEDENTES DE LOS CURTOVIRUS.....	9
RANGO DE HOSPEDEROS.....	10
LOS CURTOVIRUS Y SU VECTOR.....	11
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL VECTOR.....	13
MECANISMO DE TRANSMISIÓN.....	15
ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS CURTOVIRUS.....	16
MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD.....	17
SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA POR LA INFECCIÓN DEL CURTOVIRUS BCTV- <i>PeYD</i>	19
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	20
Métodos Moleculares.....	21
Hibridación de ADN.....	21
PCR.....	22
BCTV- <i>PeYD</i> Y SUS AFECTACIONES EN CULTIVOS DE CHILE EN ZACATECAS.....	23
LITERATURA CITADA.....	26

CURTOVIRUS COMO AGENTES FITOPATÓGENOS EN EL NORTE CENTRO DE MÉXICO.

Luis Roberto Reveles-Torres ¹
Silvia Salas-Muñoz ²
Jaime Mena-Covarrubias ³
Rodolfo Velásquez-Valle ³
Jorge Armando Mauricio Castillo ⁴

INTRODUCCIÓN

Dentro de la agricultura, los virus son de gran relevancia por las enfermedades que estos agentes patogénicos producen, ya que pueden ocasionar pérdidas importantes. Por ello, su diagnóstico es de suma importancia, ya que conociendo el tipo específico de virus se puede incidir en las medidas para su control. Los métodos de identificación con base a la sintomatología pueden dar resultados ambiguos, ya que se enmascaran con infecciones mixtas causadas por distintos patógenos, a la diversidad de síntomas en diferentes variedades, el efecto del medio ambiente, o inclusive a factores nutricionales.

Esta publicación tiene como objetivo dar a conocer uno de los grupos importantes de virus que han afectado en los últimos años. Se recopila información acerca de estas infecciones virales sobre cultivos de importancia económica, como chile,

¹Investigador del programa de Biología Molecular del Campo Experimental Zacatecas.

²Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas,

³Investigadores del programa de Sanidad Vegetal del Campo Experimental Zacatecas.

⁴Investigador Unidad Académica de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

frijol, tomate, entre otros. Está dirigida tanto a técnicos de campo como a técnicos de laboratorio, lo posibilitará ampliar su conocimiento y conocer las técnicas empleadas para su diagnóstico.

Los Geminivirus

Los geminivirus son una familia diversa de virus que infectan plantas, y cuyas partículas virales semejan dos poliedros idénticos fusionados por una de sus caras (Bird y Maramorosch 1978) (Figura 1). El genoma de todos los geminivirus está constituido por una o dos moléculas de ADN circular, de cadena sencilla (ssDNA), con un tamaño de 2.5 a 3.0 Kb (Lazarowitz *et al.*, 1992). Los insectos vectores pertenecen al orden Hemiptera (mosquitas blancas y chicharritas), estos virus infectan un amplio rango de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, en las cuales producen síntomas como: mosaicos, moteados, estriados amarillos, deformaciones foliares, enanismo, amarillamientos y clorosis. Los geminivirus ocasionan grandes pérdidas económicas, que incrementan las condiciones de pobreza particularmente en países en desarrollo (Ndunguru *et al.*, 2005).

Las primeras investigaciones sobre los agentes causales de ciertas patologías provocadas por virus, fueron realizadas a principios de 1900, casi 70 años antes de que la taxonomía

viral definiera la familia Geminiviridae. Esta familia está dividida en siete géneros (Cuadro 1) (Varsani *et al.*, 2014a) con base en su organización genómica (monopartita o bipartita), la planta hospedera (monocotiledónea o dicotiledónea), y el insecto vector. De esta manera, los géneros Becurtovirus, Curtovirus, Eragrovirus, Mastrevirus y Turncurtovirus son transmitidos por las chicharritas (Cicadellidae); los Begomovirus se transmiten por las mosquitas blancas (Aleyrodidae), mientras que los Topocovirus por insectos periquitos (Membracidae).

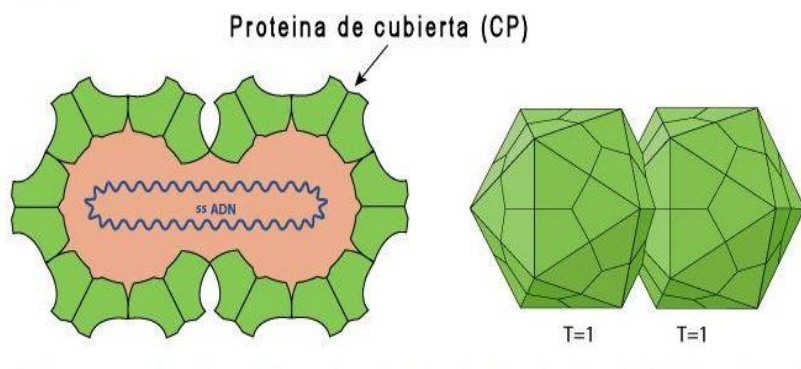
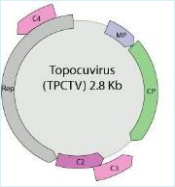
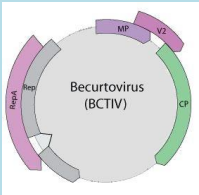
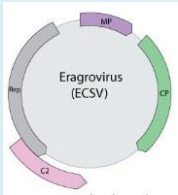
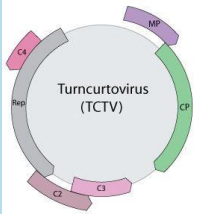


Figura 1. Partícula de un geminivirus. Parte no cubierta de cerca de 38 nm de longitud y 22 nm de diámetro. T=1 cápside de simetría icosaédrica que contiene 22 capsómeros pentaméricos hechos de 110 capsides proteicas (CP). Cada partícula gemela contiene solo una hebra sencilla de ADN (ssADN).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica establecida por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) para geminivirus basada en hospederos naturales, insecto vector y organización genómica.

Género	Virus tipo	Hospeder o	Vector	Genoma
Mastrevirus	<i>Maize streak virus (MSV)</i>	Monocotiledoneas y Dicotiledoneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	<p>Monopartita</p> <p>Mastrevirus (MSV) 2.7 Kb</p>
Curtovirus	<i>Beet curly top virus (BCTV)</i>	Dicotiledoneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	<p>Monopartita</p> <p>Curtovirus (BCTV) 3 Kb</p>
Begomovirus	<i>Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV)</i>	Dicotiledoneas	Mosca blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	<p>Monopartita o Bipartita</p> <p>DNA-A 2.6 Kb</p> <p>DNA-B 2.6 Kb</p>

Topocuvirus	<i>Maize streak virus (MSV)</i>	Dicotyledoneas	Chicharritas saltadoras (Membracidae)	<p>Monopartita</p> 
Becurtovirus	<i>Beet curly top Iran virus (BCTIV)</i>	Dicotyledoneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	<p>Monopartita</p> 
Eragrovirus	<i>Eragrostis curvula streak virus (ECSV)</i>	Dicotyledoneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	<p>Monopartita</p> 
Turncurtovirus	<i>Turnip curly top virus (TCTV)</i>	Dicotyledoneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	<p>Monopartita</p> 

Los curtovirus pertenecen a uno de los siete géneros de la familia Geminiviridae. También son conocidos como el Subgrupo II de los geminivirus, o como los virus del grupo del rizado de la remolacha azucarera. Hasta hace poco tiempo, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) reconocía siete especies incluidas en este género <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>, (ICTV. 2016), todas ellas aisladas en el sur de los Estados Unidos, donde infectan a un amplio rango de cultivos de interés económico incluyendo chile.

Actualmente, se han hecho cambios en los criterios de clasificación de los Geminivirus pertenecientes al género Curtovirus, lo que ha dado como resultado el reconocimiento de solo tres especies: Beet curly top virus, Horseradish curly top virus y Spinach severe curly top virus (Varsani *et al.*, 2014b).

Curtovirus en México.

El desierto Chihuahuense es el desierto biológicamente más diverso del Hemisferio Occidental. Comprende 70 millones de hectáreas que ocupan gran parte de los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Durango y San Luis Potosí, así como parte de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos. El desierto Chihuahuense presenta una altitud que varía entre los 600 y los 1675 metros de altura sobre el nivel medio del mar,

y como consecuencia su clima es más templado con respecto al encontrado en el desierto de Sonora, ubicado al Oeste, aunque las temperaturas máximas pueden variar en un período de 24 horas de 30 a 40°C en ciertas épocas del año. La vegetación consiste en matorrales y pastizales, los cuales se ven favorecidos por las precipitaciones pluviales que tienen lugar durante el verano principalmente.

En este contexto, al tomar en consideración que las condiciones climáticas de algunas zonas de México pertenecientes al desierto Chihuahuense son muy similares a las presentes en las principales zonas afectadas por curtovirus en los estados de Texas y Nuevo México, y puesto que el vector de los curtovirus se distribuye en la zona geográfica antes mencionada, es de llamar la atención que el primer reporte sobre la presencia de un curtovirus afectando al cultivo de chile en México se registró hasta el 2008, en Zacatecas y fue identificado como *BCTV-mld*, el cual afectó cultivos de chile tipo Ancho y Mirasol (Velásquez-Valle *et al.*, 2008) (Figura 2). También en Zacatecas, tres años después se reporta la variante MX-P24 de BMCTV en el cultivar Golden California Wonder del cultivo de chile (Chen *et al.*, 2011). Posteriormente, se presentó *BCTV-SvrPep*, una variante de la especie *BCTV* afectando chile tipo jalapeño en la zona Centro-Sur del estado de Chihuahua (Robles-Hernández *et al.*, 2011). Finalmente, en el 2012 se registró que *BCTV-mld* se dispersó a

cultivos de frijol en Zacatecas (Velásquez-Valle *et al.*, 2012). Con base en la información anterior, se establece que hasta la fecha existen solo cuatro reportes sobre la presencia de cepas de curtovirus, entre las que sobresalen *BCTV-mld* infectando cultivos de chile y frijol, y *BCTV-svrPep* afectando solo plantas de chile. No obstante, puede anticiparse que existen otras especies, cepas o variantes de curtovirus por ser descubiertas en el territorio del norte centro de México, ya que han sido reportados 10 géneros de chicharritas presentes en esta parte del país (Velásquez-Valle *et al.*, 2016) aunque se desconoce su potencial como vectores de virus.



Figura 2. Enanismo y amarillamiento de las hojas en plantas de chile tipo Mirasol (planta del lado derecho) causada por *BCTV-mld* en Zacatecas, México.

ANTECEDENTES DE LOS CURTOVIRUS.

Los primeros reportes de enfermedades causadas por curtovirus datan del año 1888 en cultivos de remolacha azucarera del estado de Nebraska, en los Estados Unidos, que produjeron grandes pérdidas. La enfermedad, caracterizada por enrollamiento de la punta de las hojas e hinchazón y distorsión de venas, se fue extendiendo a lo largo de todas las regiones productoras de remolacha presentes en el Oeste de los Estados Unidos, y aunque en ese tiempo no era posible identificar el agente causal de esta enfermedad, durante la primera década del siglo XX se estableció una clara correlación entre la presencia de un insecto vector, la chicharrita del betabel (*Circulifer tenellus* Baker) y la aparición de la enfermedad (Bennett, 1971).

En el año de 1955 se observaron densas poblaciones de *C. tenellus* en el 35% de los cultivos de remolacha azucarera en Turquía, con síntomas muy similares a los observados en los Estados Unidos; a los pocos años, estos síntomas se expandieron a cultivos del mismo tipo presentes en Irán, en donde se reportó una afectación hasta del 90% en los cultivos de remolacha presentes en la zona. La principal diferencia observada en Medio Oriente, con respecto a lo observado en los cultivos de remolacha afectados en América, es que se identificaron dos vectores: el primero corresponde a la misma

especie reportada en Estados Unidos (*C. tenellus* Baker), mientras que el segundo vector fue *C. opacipennis*, una especie endémica del Medio Oriente (Bennett, 1971).

RANGO DE HOSPEDEROS

En las últimas dos décadas, con el uso de técnicas moleculares, se ha logrado identificar los virus causantes de la enfermedad de la remolacha azucarera, y se ha establecido que esos virus, ahora conocidos como Curtovirus, infectan plantas pertenecientes a 44 familias y 300 especies. de dicotiledóneas, lo cual indica que pese a la pobre diversidad aparente de los miembros del género Curtovirus, éstos presentan un rango de huéspedes superior a los virus de otros subgrupos de la familia Geminiviridae (Bennett, 1971).

Entre los cultivos afectados por los curtovirus se encuentran el tomate, chile, betabel, calabaza, tabaco, etc., en los que provoca síntomas como enanismo, amarillamiento, deformación foliar, amarillamiento, enchinamiento de las hojas, puntas rizadas y secreción de savia (Stanley *et al.*, 2005, Creamer *et al.*, 2003 y Bennett, 1971). La diseminación de los curtovirus a través de los campos agrícolas de Norte América se debe a diversos factores, entre ellos la comercialización de explantes infectados, el aumento de áreas con monocultivos, aumento en el rango de hospederos susceptibles a la infección por curtovirus, el uso

inadecuado de insecticidas y la falta de técnicas de diagnóstico apropiadas, (Lam *et al.*, 2009). La emergencia de nuevas enfermedades o diseminación de las presentes, puede deberse a la interacción entre curtovirus diferentes que co-infectan a la misma planta, lo cual además podría favorecer el surgimiento de virus recombinantes.

Cuando un cultivo determinado está presente durante todo el año, las plantas son potencialmente la fuente de curtovirus. Además, la maleza susceptible a la infección viral puede actuar como reservorio de estos virus, constituyendo un “puente” de infección entre la maleza y los cultivos (Hernández-Ayala, 2015).

El creciente número de curtovirus y enfermedades agrícolas asociadas con su presencia, crea la necesidad de diseñar mejores técnicas de diagnóstico para curtovirus, que hagan factible el aislamiento y caracterización genómica de los mismos, aún y cuando se encuentren formando parte de una infección mixta.

LOS CURTOVIRUS Y SU VECTOR

Las chicharritas del betabel (*C. tenellus* Baker), presentes en el continente americano son insectos pequeños que miden de 3.1 a 3.5 mm de largo y menos de 1 mm de ancho (Figura 3), son muy activos en climas áridos y semiáridos. Se alimentan de la

savia contenida en las plantas, localizándola debido a su capacidad de detectar los gradientes de pH, diferenciando al parénquima ácido del floema alcalino. Cuando una chicharrita se alimenta de una planta, el daño que provoca es mínimo; sin embargo, por su alta capacidad para transmitir agentes fitopatógenos, como los curtovirus, las ha convertido en una limitante para los cultivos de papa, chile, betabel y tomate.



Figura 3. La chicharrita del betabel, *Circulifer tenellus* Baker.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL VECTOR

La distribución geográfica de este vector se ha establecido en casi toda la zona Occidental de los Estados Unidos (Creamer *et al.*, 2003), algunas regiones del desierto Chihuahuense en México (Velásquez *et al.*, 2008, Velásquez *et al.*, 2012), parte del Mediterráneo y Medio Oriente (Bennett, 1971). Además, reportes provenientes de Turquía e Irán indican que una especie de chicharrita denominada *C. haematoceps* también es capaz de transmitir curtovirus (Yazdi *et al.*, 2008).

Velásquez-Valle *et al.*, (2017), reportan en los estados de Zacatecas, Coahuila y Aguascalientes la distribución invernal de cicadélidos, donde se determinan que las poblaciones de chicharritas son capaces de sobrevivir en manchones de maleza, en las parcelas de ajo o en alfalfa; se recolectaron chicharritas en 60 de los 72 sitios de muestreo. Se encontraron 10 géneros de la familia Cicadellidae, de los cuales, *C. tenellus* fue la especie colectada en la mayor cantidad de sitios, y la segunda en cuanto a número de insectos capturados. Los adultos de *C. tenellus* que fueron identificados, el 77% correspondía a sitios con maleza y el resto a sitios con pasto (4%) y especies cultivadas como brócoli y alfalfa (19%). En estos sitios de colecta se capturaron 43 adultos, de los cuales 29 eran hembras y 14 machos. La distribución de ésta especie se

concentra en la zona de riego del estado de Zacatecas (Figura 4), en donde se pueden establecer esquemas de monitoreo de chicharritas que ayuden a prevenir infestaciones de estos vectores en cultivos de importancia regional como chile, papa y jitomate.

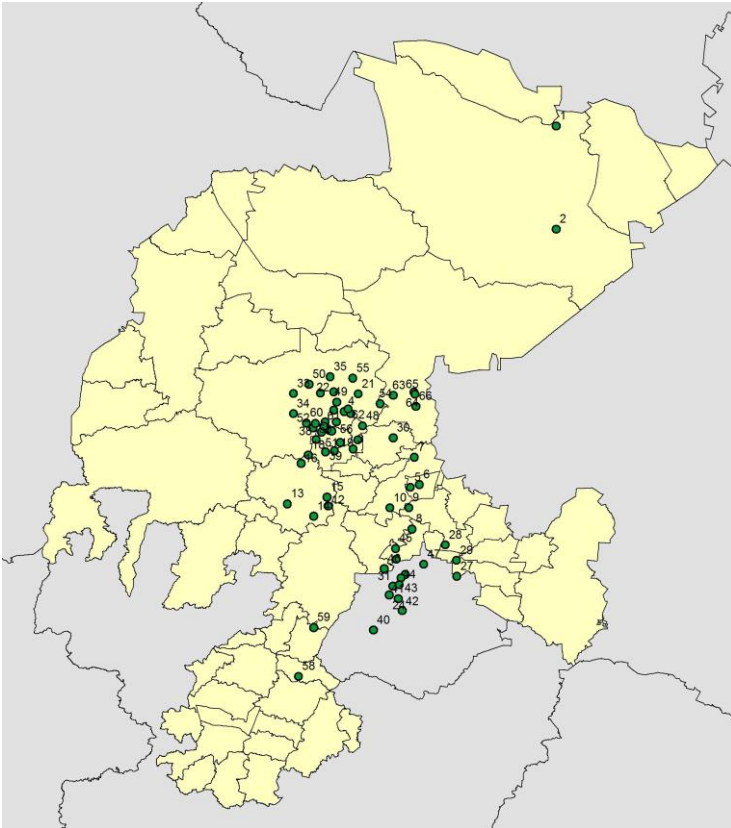


Figura 4. Mapa de distribución geográfica de *Circulifer tenellus* Baker dentro del estado de Zacatecas.

MECANISMO DE TRANSMISIÓN

La interacción entre el vector y los curtovirus inicia al momento en que la chicharrita se alimenta de una planta infectada y el patógeno es ingerido, sus viriones pasan a través del canal alimenticio y llegan al tracto digestivo en donde son absorbidos probablemente mediante un mecanismo de endocitosis mediado por un receptor (Nault *et al.*, 1997); una vez que los viriones llegan a la hemolinfa son transportados a las glándulas salivales para después ser transmitidos a otra planta al momento de alimentarse.

Experimentos realizados con Beet mild curly top virus (BMCTV) muestran que una chicharrita tarda en promedio de 1 a 2 minutos en adquirir el virus al alimentarse, y que después de una hora alimentándose, la cantidad de virus adquirido por el vector es suficiente para una transmisión efectiva a nuevas plantas (Soto y Gilbertson, 2002). La alta eficiencia mostrada para adquirir los viriones se explica por la facilidad para ubicar al floema y las cantidades altas de savia ingeridas. Aunque inicialmente se reportó que la detección del virus en cada uno de los órganos involucrados en la transmisión, indica que se trata de una transmisión circulatoria persistente, y que el patógeno se reproduce dentro del vector (Bennett, 1971). Se ha confirmado que el virus no se replica dentro del vector, solo es persistente

aproximadamente por un mes y no hay transmisión trans-ovárica (Soto y Gilbertson, 2003; Hogenhout *et al.*, 2008; Froissart *et al.*, 2010).

ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS CURTOVIRUS.

Aunque la diversidad conocida de los curtovirus es muy limitada en comparación a la de otros subgrupos de Geminiviridae, como los begomovirus (más de 200 especies reconocidas), su capacidad para infectar una amplia variedad de plantas agrupadas en 44 familias de dicotiledóneas, es un claro ejemplo de su alto nivel de adaptación (Bennett, 1971; Lam *et al.*, 2009; Briddon *et al.*, 2010; Hernández y Brown, 2010).

La organización genómica de la mayoría de los curtovirus (Figura 5) incluye cuatro genes presentes en el sentido de la cadena complementaria que están claramente relacionados a los genes en la región genómica equivalente de los begomovirus Rep, C2, Ren y C4 (Baliji, 2004); en contraste, los tres genes que codifican a la proteína de la cápside (V1 o CP), así como las proteínas aparentemente relacionadas con el movimiento de los curtovirus (V2 y V3 o MP) parecen ser homólogos a los genes V1 y V2 de los mastrevirus (Heydarnejad *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se ha considerado que los curtovirus se originaron a partir de un evento de recombinación entre un begomovirus y un mastrevirus ancestral (Rybicki, 1994; Varsani *et al.*, 2009).

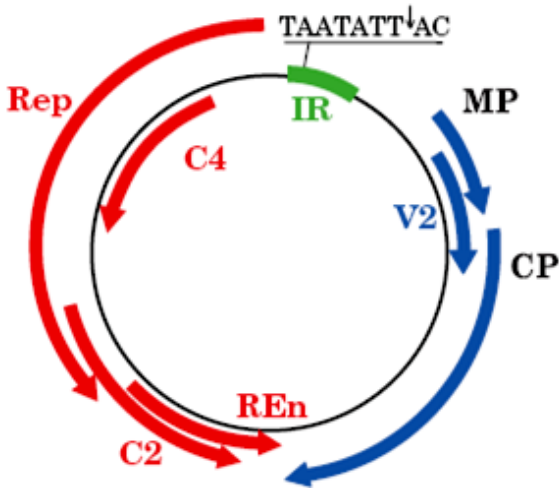


Figura 5.- Organización genómica de los Curtovirus.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

Con respecto a las proteínas producidas por los curtovirus y sus funciones se puede señalar a la proteína Rep (codificada por el gen C1 o Rep) como la encargada de iniciar la replicación viral y alterar el ciclo celular del huésped (Jeske, 2009). Un factor importante para aumentar el nivel de replicación viral es la proteína REn (codificada por el gen C3 o REn) y lo hace mediante su interacción con las proteínas Rep y la proteína Retinoblastoma de la planta (Settlage *et al.*, 2005).

Por otra parte, el gen C2 codifica para la proteína TrAP que, a diferencia de la proteína homóloga de begomovirus, no parece

ser capaz de transactivar los genes del huésped que se expresan más tarde, como mecanismo de defensa. Sin embargo, actúa inhibiendo la respuesta del huésped que se activa frente a las infecciones virales, ya que se ha confirmado su interacción con quinasas celulares implicadas en los mecanismos de defensa de las plantas (Surendranath *et al.*, 2006). El cuarto gen presente en el sentido de la cadena complementaria es C4, y a partir de él se produce la proteína del mismo nombre, que funciona como un determinante de la patogenicidad, ya que se ha observado en plantas transgénicas que expresan el gen C4 más de lo normal, aunque estas presentan fenotipos similares a plantas infectadas. Estudios basados en mutaciones y análisis de complementación también han sugerido la participación de la proteína C4 en la regulación transcripcional, la inhibición del silenciamiento y el transporte intercelular (Piroux *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2010).

Las proteínas CP y del movimiento son codificadas por los genes CP (V1) y MP (V3) respectivamente, y ambas están implicadas en el movimiento del virus. La proteína del movimiento se encarga del transporte del virus del núcleo a la periferia de la célula, y la proteína de la cápside es la responsable del movimiento a larga distancia, o de diseminación. Por último, la proteína V2 (gen V2 o MP) parece funcionar regulando los niveles de ADN de cadena sencilla y de cadena doble, por lo que

al infectar plantas con virus mutados en este gen se presentan síntomas atenuados (Jeske, 2009).

Por otro lado, algunos virus muestran una alta especificidad por los huéspedes que infectan, como es el caso del virus del enrollamiento de la hoja de la calabaza (*Squash leaf curl virus*) con su hospedante natural, calabaza (*Cucurbita pepo L.*), aunque se han encontrado cepas que difieren en 13 nucleótidos de la región intergénica, y tres aminoácidos de la proteína del movimiento (BV1), colonizan un rango de hospederos diferente (Polston *et al.*, 1989).

SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA POR LA INFECCIÓN DEL CURTOVIRUS BCTV-*PeYD*

La planta de chile infectada con el curtovirus BCTV-*PeYD*, presenta síntomas de achaparramiento debido a que sus entrenudos son cortos; las hojas basales tienen un pedicelo más alargado de lo normal, y en algunas de esas hojas existen áreas de color amarillo. También en las hojas se observa un ampollado, y en los bordes de las mismas tienen una forma irregular. Asimismo, en varias de las uniones entre la hoja y el tallo, se desarrollan brotes vegetativos axilares, los cuales empiezan a mostrar una decoloración en su parte basal (Figura 6).



Figura 6. Planta de chile tipo Mirasol con los síntomas típicos de la infección por el curtovirus BCTV-*PeYDK*.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Las primeras técnicas utilizadas para la identificación de plantas infectadas por geminivirus se basaron en observar la sintomatología, esta técnica presentaba como principal obstáculo que los síntomas se pueden confundir con los causados por otros patógenos, deficiencias nutrimentales o condiciones propias del ambiente. Posteriormente, se aprovechó de la circunstancia de que los geminivirus forman

cuerpos de inclusión nucleares, los cuales pueden ser teñidos con el colorante Azur A, y ser observados al microscopio de luz; la debilidad de este método es que no es específica a determinado agente viral.

Hasta hace poco las técnicas de identificación tradicional de geminivirus han estado limitadas básicamente a las técnicas de inmunodetección (ELISA). Sin embargo, la producción de antígenos virales específicos ha enfrentado dos problemas técnicos: 1) las propiedades físicas y químicas de las partículas las hace difícil de purificar en una forma estable y, 2) los viriones parecen ser poco inmunogénicos (Roberts *et al.*, 1984). Es por ello, que esta técnica no es empleada como método confiable para el diagnóstico de Curtovirus.

Métodos Moleculares

Hibridación de ADN

Existen métodos basados en técnicas de hibridación del ADN viral, utilizando una sonda de ADN radioactiva que reconoce por complementariedad de bases al ADN problema, unido a una membrana de nylon; después de una serie de lavados se procede a realizar una autoradiografía de la membrana, y se establece si la sonda se unió al ADN problema, y comprobando de ese modo, si existe o no una infección causada por geminivirus. Sin embargo, es una técnica costosa, y los tiempos

de estandarización de la misma pueden ser prolongados y no existen sondas específicas para curtovirus.

PCR

A finales de los años 80s se desarrolló una técnica molecular conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), capaz de amplificar genomas de ADN a partir de pequeñas muestras de tejido fresco, desecado o liofilizado, debido a su alta sensibilidad. La PCR se basa en el diseño de oligonucleótidos que funcionan como iniciadores, o “primers”, para iniciar la replicación del ADN, y en la estandarización de variantes como la temperatura, concentración de iones Mg^{2+} , ADN polimerasa termoresistente, y desoxirribonucleótidos, etc.

Para establecer criterios de caracterización viral es importante amplificar la región correspondiente a los genes CP, Rep y la región íntergénica presentes en el componente A. La técnica de PCR es complementada por técnicas moleculares como la clonación y secuenciación, que han sido utilizadas exitosamente con fines de detección, e identificación, así como para poder inferir sobre la relación entre quasi-especies virales ([Padidam et al., 1995](#)). Estas técnicas, junto con el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), son muy útiles para la identificación preliminar

de geminivirus, y para el estudio de la diversidad genética de los mismos. Igualmente, las técnicas de clonación y secuenciación se han consolidado como herramientas necesarias para la detección, identificación y caracterización genómica de nuevas especies de curtovirus (Czosnek *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 2001).

BCTV-PeYD Y SUS AFECTACIONES EN CULTIVOS DE CHILE EN ZACATECAS.

Desde hace aproximadamente cinco años los productores zacatecanos de chile tipo Mirasol reportaron la presencia de una nueva sintomatología (enanismo, amarillamiento y ampollamiento de las hojas) afectando sus cultivos, sin embargo, no se le dio mucha importancia debido a que las afectaciones no representaban pérdidas considerables en la producción.

Fue hasta el año 2014 que los síntomas antes descritos comenzaron a afectar hasta el 14% de las plantas de chile tipo Mirasol cultivadas en el municipio de Villa de Cos, Zacatecas (23°29'30"N, 102°8'0"W) y se confirmó que los síntomas observados coincidían con los manifestados en chiles plantados en Nuevo México, así como espinaca y betabel cultivados en Arizona, Estados Unidos. El agente causal de la sintomatología en Estados Unidos resultó ser un curtovirus denominado BCTV-PeYD.

Actualmente, se han identificado infecciones por curtovirus en frijol, y chile para secado y consumo en fresco. La identificación se logró mediante técnicas de biología molecular cuyas características se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Identificación de los Curtovirus mediante técnicas moleculares.

Cultivo	Patógeno	Zona geográfica	Iniciadores	Acrónimo	Referencia
Frijol	<i>Beet curly top virus-SvrPep</i>	Zacatecas, México.	RepQEW-for/CP450-rev y V2Gen910-for/Rep2GQ-rev	<i>BCTV-mld</i>	Velázquez-Valle <i>et al.</i> (2008).
Chile jalapeño	<i>Beet curly top virus-SvrPep</i>	Chihuahua, México.	BGv981/BGc479	<i>BCTV-SvrPep</i>	Robles-Hernández <i>et al.</i> (2001)
Chile ancho y mirasol	<i>Beet curly top virus-mld</i>	Zacatecas, México.	RepQEW-for/CP450-rev y V2Gen910-for/Rep2GQ-rev	<i>BCTV-mld</i>	Velázquez-Valle <i>et al.</i> (2008).
Betabel, espinaca, rábano, tomate	<i>Beet curly top Iran virus</i>	Kerman, Iran.	CTV-F/CTV-R	<i>BCTIV</i>	Heydarnejad <i>et al.</i> (2007).

Con base en lo anterior, se extrajo ADN total de 20 plantas de chile sintomáticas, y de dos muestras compuestas, constituidas cada una por grupos de 25 insectos pertenecientes a la especie *Circulifer tenellus*, el vector de los curtovirus. Tales extractos se analizaron mediante la técnica de PCR con las combinaciones de primers universales específicos para curtovirus propuestos

por Velásquez-Valle *et al.*, (2012): RepQEW-for/CP450-rev y V2Gen910-for/Rep2GQ-rev con lo que se obtuvieron productos de PCR de 1.75 y 1.8 Kb, respectivamente. Los productos de PCR fueron clonados y secuenciados. De los fragmentos de ADN obtenidos se logró armar un genoma de 2,971pb cuyo análisis con el programa Blast del NCBI mostró una similitud del 96% con su pariente más cercano, *BCTV-PeYD*. Lo mismo se realizó con la secuencia obtenida a partir de los insectos colectados y el virus aislado fue un 99.9% idéntico al *BCTV-PeYD* aislado de las plantas de Chile tipo Mirasol.

El presente reporte incrementa a cuatro las cepas de *BCTV* presentes en México. De esta forma, se confirma la importancia del diagnóstico molecular a nivel de secuencia de ADN, y establece las bases para promover una alerta fitosanitaria que permita controlar la propagación de *BCTV-PeYD* no solo a más variedades de Chile, sino a otros cultivos de interés económico en la zona geográfica.

LITERATURA CITADA

- Baliji, S., Black, M. C., French, R., Stenger, D. C., Sunter, G. 2004. Spinach curly top virus: a newly described Curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenesis. *Phytopathology* 94: 772-79.
- Bennett, C. W. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants. Monogr. No. 7. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Bird, J., and Maramorosch, K. 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research*. 22: 55-110.
- Briddon, R. W., Heydarmejad Jahangir, Khosrowfar Fakhrosadat, Massumi Hossain, Martin Darren P., Varsani Arvind. 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res*.152: 169-175.
- Brown, J. K., Idris, A. M., Torres-Jeréz, I., Banks, G. K. and Wyatt, S. D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* 146:1581-1598.
- Chen, L.F., Vivoda, E. and Gilbertson, R.L. 2011. Genetic diversity in curtoviruses: a highly divergent strain of *Beet mild curly top virus* associated with an outbreak of curly top disease in pepper in Mexico. *Arch. Virol.* 156 (4): 547-555.
- Creamer, R., Carpenter, J. and Rascon, J. 2003. Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico. *Southwestern Entomologist* 28: 177-182.

- Czosnek, H., Navot, N. and Laterrot, H.1990. Geographical distribution of tomato yellow leaf curl virus. A first survey using specific ADN probes. *Phytopathologia Mediterranea* 29:1– 6.
- Froissart, R., Doumayrou, J., Vuillaume, F., Alizon, S., and Michalakakis, Y. 2010. The virulence–transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-) existing studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1548), 1907-1918.
- Lazarowitz, S.G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11(4): 327-349.
- Hernández-Ayala EG. 2015. Maleza de invierno como hospederas de virus, fitoplasmas y sus vectores relacionados al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). in *Unidad Académica de Ciencias Biológicas*, p. 105. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zac., México.
- Hernández, Z.C. and Brown J. K. 2010. First report of a new curtovirus species, *Spinach severe curly top virus*, in commercial spinach plants (*Spinacia soleracea*) from South central Arizona. *Plant Dis.* 94: 917
- Nault, L. R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 521-541.
- Heydarnejad J., Hosseini Abhari E., Bolok Yazdi H. R., Hassumi H. 2007. Curly top of cultivated plants and weeds and reports of a unique Curtovirus from Iran. *Journal of Phytopathology.*155: 321-325.

- Hogenhout, S. A., Ammar, E. D., Whitfield, A. E., and Redinbaugh, M. G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 327-359.
- Jeske H. 2009. Geminiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 331: 185-226. Review.
- Lam, N., Creamer, R., Rascon, J. and Belfon, R. 2009. Characterization of a new curtovirus, pepper yellow dwarf virus, from chile pepper and distribution in weed hosts in New Mexico. *Arch Virol*, 154, 429-436.
- Nault, L. R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:521-541.
- Ndunguru, J., Legg, J.P., Aveling, T.A.S., Thompson, C., Fauquet, C.M. 2005. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology journal* 2: 21 doi:10.1186/1743-422X-2-21.
- Padidam, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76:249 -263.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A. and Stanley, J. 2007. Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with *Arabidopsis thaliana* shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology.* 362:428-440.
- Polston, J. E., Dodds, J. A., and Perring, T. M. 1989. Nucleic acids probes for detection and strain discrimination of cucurbit geminiviruses. *Phytopathology* 79: 1123-1127.

- Roberts, I. M., Robinson, D. J. and Harrison, B. D. 1984. Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *Annals of Applied Biology* 105: 483-493.
- Robles-Hernández, L., Gonzalez-Franco, A. C., Gill-Langarica, E. M., Sago, C., Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., 2011. First report of Beet severe curly top virus in jalapeno pepper in Chihuahua, Mexico. *Plant Disease* 95, 778.
- Rybicki, E. P. 1994. A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of virology*, 139(1), 49-77.
- Settlage S.B., See R.G., Hanley-Bowdoin L. 2005. Geminivirus C3 protein: Replication Enhancement and protein interaction. *J. Virol.*79: 9885-9895.
- Soto, J. M. and Gilbertson, L. R. 2002. Distribution and rate of movement of the curtovirus Beet mild curly top virus (Family Geminiviridae) in the Beet leafhopper. *Phyto* 93: 478-484.
- Soto, M. J., and Gilbertson, R. L. 2003. Distribution and rate of movement of the curtovirus Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) in the beet leafhopper. *Phytopathology*, 93(4), 478-484.
- Stanley, J., Bisaro D.M. and Briddon, R.W. 2005. Family Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), *Virus Taxonomy: The eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. New York, NY, USA, Academic Press, 2005, pp. 301-326.
- Surendranath, B., Sunter, J. and Sunter, G. 2006 Transcriptional analysis of complementary sense genes in Spinach curly top virus and functional rol of C2 in pathogenesis. 20: 194-206

- Teng, K., Chen, H., Zhang, Z., Fang, Y., Xia, R., Zhou, X., Guo, H. and Xie, Q. 2010. Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (family Geminiviridae) in virus movement. *PLoS One*. 5(6): 11280
- Varsani, A., Shepherd, D.N., Dent, K., Monjane, A.L., Rybicki, E.P. and Martin, D.P. 2009. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Viol Journal*. 6:36.
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernandez-Zepeda, C. and Idris, A. 2014a. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch. Virol*. 159:2193–203.
- Varsani, A., Martin, D.P., Navas-Castillo, J., Moriones, E. Hernandez-Zepeda, C., Idris, A., Murilo, Z.F. and Brown, J.K. 2014b. Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity. *Arch Virol*. doi:10.1007/s00705-014-1982-x.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. and Creamer, R. 2008. First report of beet mild curly top virus infection of Chile pepper in North-Central Mexico. *Plant Disease* 92: 650.
- Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Reveles-Torres, L. R., Argüello-Astorga, G.R., Salas-Luevano, M. A. and Mauricio-Castillo, J. A. 2012. First report of Beet mild curly top virus in dry bean in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 96 (5):771-772.
- Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., y Reveles-Torres L.R. 2016. Presencia de chicharritas (Hemiptera:Cicadellidae) durante el invierno en Zacatecas y Aguascalientes. Folleto Técnico Núm 78. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 31 páginas.

- Velásquez-Valle R, Reveles Torres LR, Mena-Covarrubias J. 2017. Géneros de Chicharritas presentes durante el invierno en Regiones de Aguascalientes, Coahuila, y Zacatecas, México. *Southwestern Entomologist* 42: 249-259.
- Yazdi, H., Heydarnejad, J. and Massumi, H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*. 36: 539-545.

REVISIÓN TÉCNICA Y EDICIÓN

Dr. Guillermo Medina García
INIFAP Zacatecas

Dr. Miguel Ángel Salas Luévano
Unidad Académica de Agronomía
Universidad Autónoma de Zacatecas

DISEÑO DE PORTADA

Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-44-02-11-09-84

ENCARGADA DE LA COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Dra. Raquel K. Cruz Bravo

Grupo Colegiado del CEZAC

Presidente: Dr. Jaime Mena Covarrubias
Secretario: MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Vocal: Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Vocal: Dr. Guillermo Medina García
Vocal: Ing. Manuel Reveles Hernández
Vocal: Dr. Francisco Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

La presente publicación se terminó de imprimir en formato electrónico en noviembre de 2017 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 carr Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.

Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
MC.	Nadiezhdha Y. Ramírez Cabral*	Agrometeorología y Modelaje
Dr.	Manuel de Jesús Flores Nájera	Carne de Rumiantes
Dr.	Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Ing.	José Ángel Cid Ríos*	Fríjol y Garbanzo
MC.	Juan José Figueroa González	Fríjol y Garbanzo
MC.	Mayra Denise Herrera	Fríjol y Garbanzo
Dr.	Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC	Valentín Melero Meraz	Frutales
Ing.	Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
MC.	Miguel Servin Palestina	Ingeniería de Riego
Dra.	Raquel Cruz Bravo	Inocuidad de Alimentos
MC	Enrique Medina Martínez	Maíz
MC.	Francisco A. Rubio Aguirre	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Ramón Gutiérrez Luna	Pastizales y Cultivos Forrajeros
MC.	Ricardo A. Sánchez Gutiérrez	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Luis Roberto Reveles Torres	Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos
Dr.	Jaime Mena Covarrubias	Sanidad Forestal y Agrícola
Dr.	Rodolfo Velásquez Valle	Sanidad Forestal y Agrícola
Dra.	Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía

* Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX