

DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN EL CULTIVO DE CHILE EN LOS ESTADOS DE ZACATECAS Y DURANGO

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Dr. Jaime Mena Covarrubias
Dra. Silvia Salas Muñoz
MC Maihualy Martínez Fernández
Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo



Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de V.R., Zacatecas
Folleto Técnico No. 101
Diciembre 2019
ISBN: 978-607-37-1168-5

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

VÍCTOR MANUEL VILLALOBOS ARÁMBULA

Secretario de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de México

MIGUEL GARCÍA WINDER

Subsecretario de Agricultura

VÍCTOR SUÁREZ CARRERA

Subsecretario de Autosuficiencia Alimentaria

DAVID MONREAL ÁVILA

Coordinador General de Ganadería

SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador General de Desarrollo Rural

IGNACIO OVALLE FERNÁNDEZ

Titular del Organismo Seguridad Alimentaria Mexicana

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ

Director General

DR. JOSÉ ANTONIO CUETO WONG

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. JORGE FAJARDO GUEL

Coordinador de Planeación y Desarrollo

LIC. JOSÉ HUMBERTO CORONA MERCADO

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 A. SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN EL CULTIVO DE CHILE EN LOS ESTADOS DE ZACATECAS Y DURANGO

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: 978-607-37-1168-5

Primera Edición: DICIEMBRE 2019

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., Mena-Covarrubias, J., Salas-Muñoz, S., Martínez-Fernández M. y Mauricio-Castillo J.A. 2019. Diagnóstico e identificación de begomovirus en el cultivo de chile en los estados de Zacatecas y Durango. Folleto Técnico Núm 101. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 32 páginas

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
Sintomatología ocasionada por los Geminivirus	4
Rango de hospederos de los Geminivirus	5
Transmisión de los Geminivirus por los insectos vectores	6
Insecto vector, <i>Bemisia tabaci</i>	7
Begomovirus infectando cultivos en México	9
Método de diagnóstico molecular	12
MATERIALES Y METODOS.....	13
Colecta en campo y manejo de las muestras	13
Diagnóstico molecular.....	14
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	26
LITERATURA CITADA	27

DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN EL CULTIVO DE CHILE EN LOS ESTADOS DE ZACATECAS Y DURANGO

Luis Roberto Reveles Torres¹
Jaime Mena Covarrubias¹
Silvia Salas Muñoz²
Maihualy Martínez Fernández³
Jorge Armando Mauricio Castillo⁴

INTRODUCCION

En México las enfermedades en los cultivos de hortalizas constituyen uno de los factores de mayor riesgo para su producción, por consiguiente, es importante realizar actividades para protegerlos del ataque de diversos patógenos. En los últimos años, las enfermedades virales han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos (Rico, 2002; SIAP, 2017). Las pérdidas varían considerablemente año con año, las cuales están en función de las condiciones climáticas, el manejo del cultivo, los controles químico y cultural de los insectos vectores y de la presencia y control de las plantas arvenses que rodean a los cultivos. Los virus fitopatógenos están constituidos por una estructura proteica conocida como cápside y su genoma puede ser de ARN o ADN.

¹ Investigadores del Programa de Biología Molecular, y del Programa de Sanidad vegetal del Campo Experimental Zacatecas. ² Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas. ³ Investigador del Campo Experimental Valle de Guadina ⁴ Docente-Investigador de la Unidad Académica de Agronomía UAZ.

El género Begomovirus con aproximadamente 200 especies se incluye en la familia Geminiviridae, sus partículas poseen una simetría icosaedral, consistiendo en dos icosaedros (partículas gemelas) incompletos, sin un vértice, unidos entre sí.

EL genoma es único, fijo, cerrado, circular, compuesto de DNA. La mayoría de los Begomovirus posee un genoma bipartito; esto significa que el genoma se encuentra en dos segmentos referidos como ADN A y ADN B que son parte de dos partículas diferentes. Ambos segmentos son requeridos para que la enfermedad sea sintomática en el huésped, pero el ADN B depende del ADN A para su replicación, el cual es aparentemente capaz de infectar por cuenta propia.

Los Begomovirus son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Geen). Entre los Begomovirus bipartitas presentes en el continente americano se distinguen dos grandes linajes: los Begomovirus denominados Típicos, cuyo principal representante en México es el *Pepper huastec yellow vein* PHYVV, y por otra parte los virus pertenecientes al clado del Squash leaf curl virus (*SLCV*). Ambos clados de Begomovirus se han identificado formando parte de infecciones mixtas tanto en

cultivos de interés económico y en plantas arvenses. La aparición de síntomas asociados con virosis presentes en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) han comenzado a generar afectaciones en la producción de dicho cultivo en los estados de Zacatecas y Durango, de tal forma que es importante identificar el o los posibles agentes causales y así diseñar estrategias que nos permitan controlar al máximo la dispersión de los síntomas antes mencionados.

México es el primer exportador de chile verde a nivel mundial y el sexto de chile seco; los principales importadores son Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SIAP, 2017). Durante el año agrícola 2017 la superficie sembrada fue de 136,053.46 ha, con una producción de 2,294,399.97 t. y un valor de la producción de \$14,620,448.58 de pesos. Los estados que destacaron por su producción fueron Sinaloa con 3,264,911.99 t., Zacatecas 2,168,065.17, Chihuahua con 2,140,624.23 t., San Luís Potosí 1,380,567.72, Jalisco 768,655.76 y Tamaulipas 625,491.28 t. (SIAP, 2017).

En el Campo Experimental Zacatecas, se analizaron muestras de plantas de chile afectadas por posibles virosis causadas por

begomovirus, por lo que el objetivo de este trabajo es dar a conocer los resultados de los hallazgos encontrados en esta hortaliza muestreadas en los estados de Zacatecas y Durango.

Sintomatología ocasionada por los Geminivirus

Los síntomas inducidos por los virus de las plantas conducen a la reducción de la calidad del cultivo y el rendimiento. El resultado final de la infección por el virus, es una reducción en el crecimiento de las plantas, bajo rendimiento, calidad del producto, y la pérdida económica a los productores. También, la mayoría de los síntomas inducidos por virus puede ocurrir debido a condiciones ambientales adversas o enfermedades causadas por otros patógenos de plantas (viroides, fitoplasmas). Debido a esto, el diagnóstico correcto de las enfermedades virales normalmente requiere pruebas de laboratorio (Hull, 2002).

La sintomatología ocasionada por los Geminivirus puede ser similar a la causada por deficiencias nutrimentales y a los inducidos por otras familias de virus, principalmente los Potyvirus y los Tobamovirus, lo cual ha dificultado el diagnóstico de los Geminivirus mediante las técnicas convencionales. Estos síntomas varían enormemente dependiendo de cada hospedero, la

etapa en que es infectado, el Geminivirus del que se trate e incluso la latitud en que se encuentre (condiciones ambientales). De forma general se pueden incluir los siguientes síntomas, ya sean aislados o en combinación: mosaico amarillo brillante, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, epinastias, otras deformaciones foliares como abultamientos o ampollamientos, reducción del área foliar, enanismos, abscisión floral, amoratamiento foliar, reducción del tamaño de los frutos, entre otros (Polston y Anderson, 1997).

Rango de hospederos de los Geminivirus

Para algunos Geminivirus, el rango de hospederos es muy amplio. Por ejemplo, el *Beet curly top virus (BCTV)* infecta más de 300 especies pertenecientes a 44 familias. En otros casos, sólo se encuentran reportes de las familias botánicas a las que atacan estos virus, tal es el caso de los Geminivirus que inducen los síntomas de enchinamiento, como el enchinamiento de tabaco, tomate y calabaza, que atacan principalmente a miembros de las familias Solanaceae, Compositae, Caprifolaceae y Cucurbitaceae, mientras que los síntomas de amarillamiento intenso, como los inducidos por el grupo del virus del mosaico

dorado están restringidos a ciertas especies de la familia Leguminoseae y a algunas de la familia Solanaceae, aunque causados por otros virus (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000). De lo anterior, se puede señalar que los principales cultivos agrícolas atacados por Geminivirus son: el maíz, caña de azúcar, tabaco, remolacha, tomate, frijol, yuca, algodón, melón, chile, papa, calabaza, sandía, papaya, camote y soya (Dhar y Singh, 1995).

Transmisión de los Geminivirus por los insectos vectores

Uno de los criterios para clasificar a los Geminivirus ha sido la transmisión por insectos vectores. Los Mastrevirus son transmitidos por diferentes especies de chicharritas (Homóptera, familia *Cicadellidae*). Los Begomovirus son transmitidos por un complejo de la especie *Bemisia tabaci* (mosquita blanca), mientras que los Curtovirus son transmitidos por chicharritas de diferentes especies o, en un solo caso, por un saltamontes. La transmisión de los Geminivirus por sus insectos vectores es del tipo circulativo, no propagativo, lo cual es similar a lo que ocurre con la transmisión de luteovirus por áfidos (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000). Este tipo de transmisión involucra el paso del virus a través del cuerpo del insecto y consiste de dos fases: primero es la adquisición del virus, en la cual pasa hasta la hemolinfa vía la

pared del tracto digestivo y segundo la inoculación del virus en la planta, la cual requiere el paso del virus desde la hemolinfa hasta las glándulas salivares (Liu *et al.*, 1997; Palmer y Rybicki, 1998). Existen evidencias convincentes de la transmisión transovárica del *Tomato yellow curl leaf virus (TYLCV)* (Begomovirus monopartita), hasta dos generaciones (Ghanim *et al.*, 1998). Estos son transmitidos a una gran variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, produciendo síntomas como mosaicos, moteados, deformaciones foliares, enanismo, amarillamientos y clorosis en las plantas infectadas, provocando grandes pérdidas económicas, y contribuyendo a incrementar las condiciones de pobreza, principalmente en los países subdesarrollados (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000).

Insecto vector, *Bemisia tabaci*

Hasta mediados de los años 80, muchos biotipos de *Bemisia tabaci* se alimentaron y reprodujeron en jitomate y chile en forma muy limitada, minimizando la transmisión de Begomovirus hacia y desde plantas de estas hortalizas. No obstante, a mediados de los años 80, un nuevo biotipo o especie de mosquita blanca conocido como biotipo B se introdujo en el Hemisferio Occidental, proveniente del Mediterráneo, posiblemente por el traslado de plantas ornamentales infestadas. Aunque, esta

mosquita no muestra diferencias morfológicas con respecto a los biotipos de *B. tabaci* ya existentes, hay diferencias biológicas significativas. Una de ellas es que la nueva mosquita blanca (*Bemisia tabaci* biotipo B) se alimenta muy bien y se reproduce abundantemente en el cultivo de chile (Schuster *et al.*, 1990), y es menos selectiva en sus hospederos.

El ciclo infectivo de los Begomovirus es del tipo circulativo no persistente y tiene como etapas principales las siguientes: la adquisición del virus por parte del vector al alimentarse (al menos por 15 minutos) de una planta infectada y la posterior inoculación del virus a plantas sanas al seguir alimentándose (Hunter *et al.*, 1998). Aparte de transmitir Begomovirus y algunos otros fitopatógenos, las infestaciones por mosquita blanca provocan alteraciones en la estructura de la planta, pues al alimentarse ingieren su savia y producen efectos fitotóxicos; también, los residuos de savia presentes en la lámina foliar favorecen la aparición de fumagina, la cual es la acumulación de hongos que bloquean el proceso de la fotosíntesis. Siempre que se identifican infecciones severas causadas por Begomovirus, el primer paso, y más importante, es identificar y controlar al insecto vector mediante insecticidas o por métodos de control biológico o

genético, como el uso de depredadores naturales, colocación de barreras biológicas, erradicación de malezas y obtención de variedades resistentes (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000).

Begomovirus infectando cultivos en México

Los primeros reportes sobre la presencia de Begomovirus en México datan desde 1970 (Ley-Flores, 1975) en plantas de jitomate con síntomas causados por un virus transmitido por la mosquita blanca (Figura 1) en el estado de Sinaloa, al Noreste de México (Brown y Nelson, 1988), posteriormente, el agente causal se identificó como virus del chino del tomate (*CdTV*), produciendo epidemias asociadas con la presencia de altas poblaciones de *Bemisia tabaci* (Brown y Nelson, 1988).



Figura 1. Mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) alimentándose en cultivos de chile.

Este virus también se encontró en otras áreas productoras del país, por ejemplo, en los Estados de Chiapas, Morelos y Tamaulipas. En donde existen reportes de infecciones mixtas en las que el virus del chino del tomate (CdTV), coexiste con *PHYVV* y el *Pepper golden mosaic virus (PepGMV)*(Torres-Pacheco *et al.*, 1996). A pesar de que el rango de hospederos del *CdTV* estaba limitado a Solanáceas, se ha reportado su presencia en cultivos de soya (Mauricio-Castillo *et al.*, 2014a).

A finales de los 80s y principios de los 90s, se reportó el primer y único caso hasta la fecha de un Geminivirus originario del viejo mundo introducido en el continente americano. El *TYLCV* es un begomovirus monopartita aislado en Israel (Navot *et al.*, 1991) e introducido en la República Dominicana al importar transplantes de tomate infectadas de Israel. Recientemente, se ha reportado la presencia de *TYLCV* en la Península de Yucatán (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999). Los principales begomovirus reportados en México se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales Begomovirus reportados en México.

Virus	Ubicación geográfica	Cultivo	Referencia
<i>Bean calico mosaic virus (BcaMV)</i>	Sonora	Fríjol	Brown y Poulos, 1990
<i>Bean golden yellow mosaic virus (BGYMV)</i>	Chiapas, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán	Calabaza, chile, jitomate, melón	López-Salinas <i>et al.</i> , 1994
<i>Chino del tomate virus (CdTV)</i>	Chiapas, Morelos, Tamaulipas	Chile, jitomate	Brown y Nelson, 1988
<i>Pepper golden mosaic virus (PepGMV)</i>	Sinaloa, Tamaulipas, Guanajuato, Quintana Roo	Chile	Stenger <i>et al.</i> , 1990
<i>Pepper huastec yellow vein virus (PHYVV)</i>	Sinaloa, Tamaulipas, Guanajuato, Quintana Roo	Chile, fríjol, jitomate	Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 2002
<i>Serrano golden mosaic virus (SGMV)</i>	Norte de México	Chile	Brown y Poulos, 1990
<i>Squash leaf curl virus (SLCV)</i>	Mexicali, Sonora	Calabaza	Delgadillo <i>et al.</i> , 1989
<i>Tomato chino baja california sur virus (ToChBCSV)</i>	Baja California Sur	Jitomate	Holguin-Peña <i>et al.</i> , 2004
<i>Tomato chino la paz virus (ToChLPV)</i>	Baja California Sur	Jitomate	Holguin-Peña <i>et al.</i> , 2004
<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus (ToLCSinV)</i>	Sinaloa	Chile, jitomate	Brown <i>et al.</i> , 1993
<i>Tomato mottle virus (ToMoV)</i>	Sureste México	Chile	Díaz-Plaza <i>et al.</i> , 2002

<i>Tomato severe leaf curl virus (ToSLCV)</i>	San Luis Potosí	Jitomate	Bañuelos-Hernández <i>et al.</i> , 2012
<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	Baja California Sur	Chile, jitomate	Lebsky y Poghosyan, 2007

Método de diagnóstico molecular

La metodología actual para el diagnóstico de Begomovirus más confiable, es diagnóstico por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dentro de esta, el uso específico de ciertos “iniciadores” es vital para para el diagnóstico de begomovirus monopartitas y bipartitas (una o dos cadenas de ADN), así como para el conocimiento del clado al cual pertenece o pertenecen los begomovirus diagnosticados (clado “SLCV” ó clado “Típicos”) (Mauricio-Castillo *et al.*, 2014b).

Para el diagnóstico de los begomovirus del clado “Típicos” son utilizados el par de oligonucleótidos universales WARfor / YMACrev, que amplifican una banda de ADN de 1.7 Kb. (Mauricio-Castillo *et al.*, 2007). Así mismo, para el diagnosticar el clado SLCV se utilizan el par de oligonucleótidos SL2060for / YMACrev que amplifican una banda de ADN de 1.4 Kb. (Mauricio-Castillo *et al.*, 2006).

MATERIALES Y METODOS

Colecta en campo y manejo de las muestras

Los muestreos se realizaron en el año 2017 en cultivos de chile tipo pasilla y mirasol muestreados en los municipios de Calera de Víctor Rosales y Jalpa, en el estado de Zacatecas, y en el municipio de Poanas, Durango. En todas las regiones de muestreo, se observaron y colectaron plantas con sintomatología típica causada por geminivirus (Blancard, 1996; Gabor y Wiebe, 1997; Jones *et al.*, 2014), las cuales incluyeron:

- mosaico amarillo brillante
- moteado clorótico
- clorosis foliar marginal
- enrollamiento foliar
- epinastias,
- deformaciones foliares como abultamientos o ampollamientos
- reducción del área foliar
- enanismos
- abscisión floral
- amarotamiento foliar
- reducción del tamaño de los frutos (Figuras 1 y 2)



Figura 1. Plantas de chile con la sintomatología típica de infección por begomovirus.

Diagnóstico molecular

Se adoptó un protocolo de extracción de ADN genómico, único para todas las muestras de tejido vegetal analizadas. Éste se basó en una modificación del método de Dellaporta (1983), que utiliza nitrógeno líquido y el buffer de extracción “A” (compuesto por Tris 100 mM pH 8.0, NaCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH8.0 y agua destilada). A cada pastilla de ADN de cada una de las muestras se les realizó una amplificación isotérmica de ADN de

cadena sencilla presente en los extractos con la técnica de TempliPhi (GE Healthcare), produciendo largas copias de ADN continuas conocidas como concameros (Haible *et al.*, 2006). Los ADNs obtenidos mediante la técnica de TempliPhi se sometieron a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron el par de oligonucleótidos Cp70For y el YMAC REV para la amplificación de una banda de 600 pb correspondiente al gen de una proteína de la cápside del virus. La composición de la mezcla de reacción para PCR (50 μ L volumen total) consistió en lo siguiente: Buffer Taq ADN polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 1 μ M, Taq polimerasa 2.5 UT, DNA 1 μ g. Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por una temperatura inicial de 94°C/1min, una temperatura de alineamiento de 55°C/1min y una extensión a 72°C/1min con una extensión final de 72°C/5min. Los productos amplificados, fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1.5 %.

Los productos de PCR y clonas, obtenidas a partir de extractos de ADN de plantas con probables síntomas de virosis, fueron sometidos a análisis de RFLP (Restriction Fragment Large Polimorphism) utilizando la enzima MspI en combinación con la

enzima EcoRI (New England BioLabs™) establecidas previamente por Monreal-Vargas (2005). Los productos digeridos se analizaron por movilidad electroforética en geles de agarosa al 2.0 %.

Los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de campo se clonaron directamente en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI), según las indicaciones del proveedor. La transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 se realizó por los métodos de electroporación y/o choque térmico, facilitando la selección de transformantes en base al color de las colonias crecidas (blancas / azules) en medio LB conteniendo ampicilina (marcador selectivo), IPTG y X-gal. Los protocolos de transformación se describen a continuación.

La extracción del ADN plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento modificado de Birnboim (Sambrook *et al.*, 2011). Los productos clonados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del LANBAMA (IPICYT A.C.), y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con secuencias disponibles en la base de datos del Gen Bank, utilizando los

algoritmos BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Clustal V (MegAlign, DNASTAR software, London).

RESULTADOS

Los extractos provenientes de plantas de chile tipo pasilla que mostraron una sintomatología relacionada con la posible presencia de Begomovirus, fueron analizadas mediante la técnica de PCR con el uso de los oligonucleótidos universales específicos para los clados *SLCV* (SL2060for / YMACrev) y Típicos (WARfor / YMACrev) en combinación con la técnica de RFLPs. Se confirmó la presencia de una infección mixta causada por dos Begomovirus, el primero perteneciente al clado de los Begomovirus Típicos, mientras que el segundo se encuentra en el grupo de los Begomovirus del *SLCV* (Figura 3).

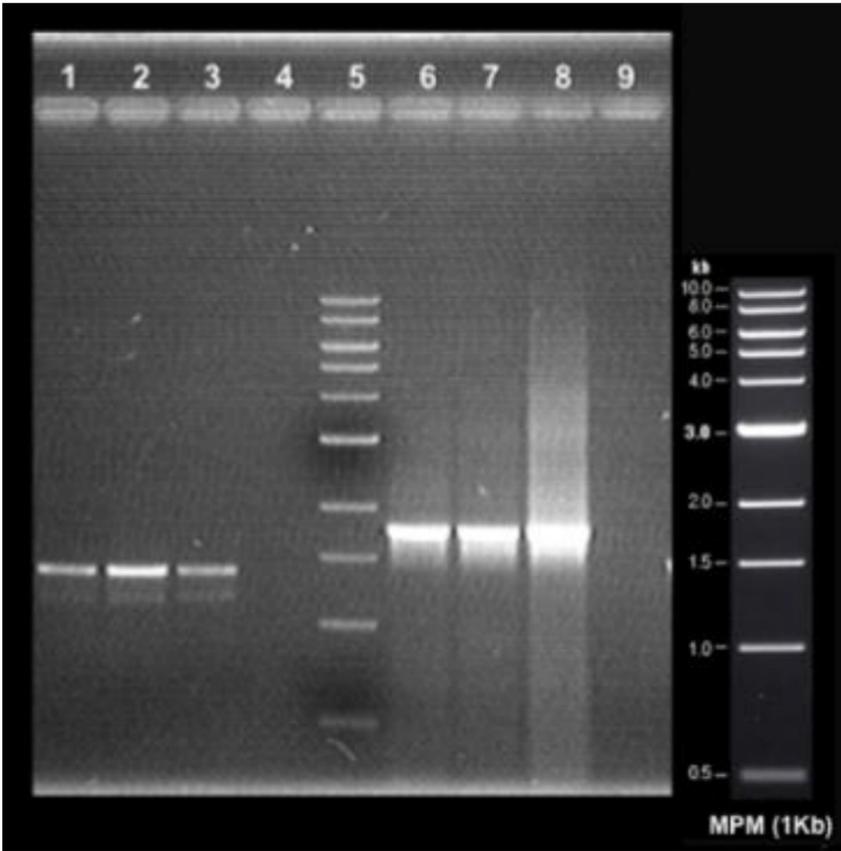


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con las combinaciones de oligonucleótidos utilizados. Extractos de Chile (carril 1 y 2), control positivo (carril 3) y control negativo (carril 4) analizados con la combinación SL2060for / YMACrev (1.4 Kb). Carril 5 (Marcador de peso molecular, MPM). Extractos de Chile (carril 6 y 7), control positivo (carril 8) y control negativo (carril 4) analizados con la combinación WARfor / YMACrev (1.7 Kb).

Las clonas obtenidas se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del LANBAMA (IPICYT), y las secuencias

nucleotídicas obtenidas fueron editadas y en cada caso, se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank utilizando los algoritmos BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y Clustal V (MegAlign, DNASTAR software, London).

El análisis de la primera secuencia aislada, mostró un 99% de similitud con el *Pepper huastec yellow vein virus (PHYVV)*, un begomovirus perteneciente al grupo de los Típicos. Con estos resultados, se efectuó un análisis de la región intergénica del fragmento aislado y se realizó una comparación de iterones. Éstos, son secuencias de ADN repetidas las cuales juegan un papel importante en la regulación de la replicación del ADN viral. Los interones identificados (GGTGA) se compararon con los presentes de su pariente más cercano, encontrando que, con base en los criterios taxonómicos actuales, la primera secuencia aislada de Chile tipo pasilla corresponde a una nueva cepa de la especie *PHYVV*. Este es el primer reporte de una secuencia nucleotídica correspondiente a *PHYVV* en el estado de Zacatecas.

Asimismo, la segunda secuencia nucleotídica aislada de plantas de Chile tipo Pasilla, fue sometida a los mismos análisis de comparación de secuencias a los que se sometió la primera secuencia, encontrando una similitud del 98% con un Begomovirus perteneciente al grupo del *SLCV*, *Pepper golden mosaic virus* (*PepGMV*). Para confirmar dicha similitud, se analizó y se compararon los iterones presentes en la secuencia aislada de estas muestras (GGAGTC) con las presentes de su pariente más cercano, utilizando los criterios taxonómicos actuales, también se establece el reporte de una nueva cepa perteneciente a la especie *PePGMV*.

DISCUSIÓN

Dentro del diagnóstico molecular de enfermedades Geminivirales presentes en cultivos de interés económico, una de las principales limitaciones es la falta de métodos cada vez más eficientes que permitan identificar a los posibles agentes causales aún y cuando se trate de infecciones mixtas. Este trabajo presenta la tarea de evaluar la efectividad de dos combinaciones de oligonucleótidos universales, que permitan identificar la presencia de cualquier Begomovirus perteneciente a los clados del *SLCV* o los Típicos

presentes en extractos provenientes de plantas de Chile colectadas en los municipios de Calera de Víctor Rosales y Jalpa, Zacatecas, y de Poanas, Durango.

A pesar de que existen otros métodos de diagnóstico molecular de Begomovirus, los productos de PCR obtenidos al utilizar los iniciadores universales seleccionados y evaluados, incluyen porciones parciales de los genes *Rep*, *CP* y la totalidad de la región intergénica, los cuales permiten identificar la identidad del o los begomovirus presentes en los extractos analizados, determinando con ello la presencia de infecciones mixtas.

Lo anterior, contrasta con métodos como el diseñado por Rojas *et al.* (1993), ya que aunque se pueden amplificar regiones muy similares en tamaño y secuencia a las obtenidas, al momento de analizar muestras con infecciones mixtas o sencillas causadas por Begomovirus pertenecientes al clado del *SLCV*, son poco eficientes y amplifican preferentemente Begomovirus pertenecientes del clado de los Típicos, y es por eso, que la mayor parte de los Begomovirus reportados pertenecen al grupo antes citado. Lo anterior, se pone de manifiesto al ver el incremento de reportes sobre la presencia e identificación de begomovirus del

clado del *SLCV* desde que se ha utilizado la combinación de iniciadores universales SL2060for / YMACrev (Mauricio-Castillo *et al.*, 2006).

La variabilidad de secuencia presente en las regiones de ADN amplificadas con los oligonucleótidos WARfor / YMACrev y DGRSfor / YMACrev permite establecer patrones de restricción característicos utilizando las enzimas *EcoRI* y *MspI* (Mauricio-Castillo *et al.*, 2014a), con estos oligonucleótidos, se puede evaluar rápidamente la diversidad de Begomovirus presentes al menos en parcelas de Chile y e identificar a los Begomovirus que participan en infecciones mixtas.

Así mismo, resalta el hecho de que solo se diagnosticaron infecciones mixtas de tal forma que a diferencia de lo que en un inicio se pensaba la presencia de este tipo de infecciones se está convirtiendo más en una regla que una excepción, y esto se debe a que los métodos de diagnóstico actuales van encaminados a complementar y mejorar los ya existentes con el firme objetivo de identificar todos los Begomovirus causantes de infecciones en cultivos de interés económico y/o malezas sin importar su origen geográfico o grupo filogenético.

A partir de extractos de plantas de chile tipo pasilla con síntomas de virosis se lograron aislar dos fragmentos del genoma A de Begomovirus, la primer secuencia aislada mostró un 99% de similitud con el *Pepper huastec yellow vein virus (PHYVV)*, un begomovirus perteneciente al grupo de los Típicos, mientras que la segunda secuencia nucleotídica aislada de plantas de chile variedad pasilla tuvo una similitud del 98% con un Begomovirus perteneciente al grupo del *SLCV*, *Pepper golden mosaic virus (PepGMV)*.

Ambos Begomovirus son conocidos por su amplia distribución en todo el territorio nacional, y aunque existen reportes sobre su presencia en territorio zacatecano hasta la fecha no existen registros en la base de datos del GenBank que confirmen su presencia a nivel de secuencia de ADN. Todas las plantas de chile analizadas durante el presente trabajo, padecían de infecciones mixtas causadas por *PHYVV* y *PepGMV*, los cuales son los Begomovirus mejor estudiados y más distribuidos en México afectando una gran variedad de cultivos entre los que destacan chile, jitomate, tomatillo y malezas. La presencia de estas dos especies de Begomovirus formando infecciones mixtas se ha

convertido en una regla casi general, la cual concuerda con lo demostrado en laboratorio en donde se ha demostrado que las infecciones mixtas favorecen la replicación de los virus que participan en ella y al mismo tiempo se observa una disminución en la actividad de los mecanismos de defensa en plantas de chile (Fraire *et al.*, 2011). La agresividad de las infecciones mixtas, depende principalmente del huésped; en el cultivo de chile se ha observado que las infecciones causadas por *PepGMV* son más agresivas con respecto a la presentación de síntomas y cuando co-infecta plantas de chile con *PHYVV*, se ve una disminución en la severidad de los síntomas, pero cuando ambos virus se encuentran presentes en tabaco, se observa un sinergismo que desencadena síntomas devastadores (Mendez-Lozano *et al.*, 2003), de tal forma, que estos estudios epidemiológicos no marcan la pauta para investigar y tratar de comprender de que depende este tipo de comportamiento.

La presencia de dos o más Begomovirus infectando la misma planta, representa un riesgo fitosanitario debido a que las similitudes que pueden existir entre ellos. A nivel de genoma puede favorecer procesos como la recombinación y pseudorecombinación produciendo la aparición de nuevas

especies, variantes o cepas cada vez más agresivas (Hou y Gilbertson, 1996), lo cual les facilita infectar nuevos hospederos naturales. De acuerdo a lo anterior, se establece la necesidad de seguir monitoreando la presencia y los alcances desde el punto de vista fitopatológico de las infecciones mixtas causadas por *PHYVV / PepGMV* y *ToSLCV / ToGMOV*, así como implementar estrategias de control que permitan no solo mejorar la resistencia de las plantas, si no controlar al insecto vector.

Actualmente, el riesgo de sufrir epidemias devastadoras en el continente Americano como las reportadas en algodón en Pakistán (Harrison *et al.*, 1997), tomate en Trinidad y Tobago (Umaharan *et al.*, 1998), España e Italia (Noris *et al.*, 1994), Cassava en Uganda (Deng *et al.*, 1997) y Tanzania (Ndunguru *et al.*, 2005), entre otras, producidas por virus recombinantes, se ha incrementado por la presencia del *TYLCV*, un Begomovirus monopartita, aislado en Israel (Navot *et al.*, 1991) de manera que su probable interacción con Begomovirus endémicos, puede dar lugar al surgimiento de variantes virales altamente virulentas.

El método de diagnóstico utilizado durante este trabajo fue eficiente al momento de identificar un tipo de infección mixta

causada por begomovirus, provocada por *PHYVV* / *PepGMV* afectando chile tipo pasilla en la región productora del estado de Zacatecas. Solamente se encontraron infecciones mixtas en este Estado. Éste método puede constituirse como una herramienta, sencilla, segura, rápida y económica para el diagnóstico y la caracterización del genoma A de Begomovirus pertenecientes a los grupos del *SLCV*, Típicos sin importar su origen geográfico.

CONCLUSIONES

La metodología molecular utilizada durante el presente trabajo, mostró ser una herramienta útil para descubrir nuevos Begomovirus y detectar infecciones mixtas que afectan cultivos de interés económico.

Así mismo, se aisló y caracterizó la secuencia genómica de dos nuevas variantes de Begomovirus, pertenecientes al clado de los Típicos (*PHYVV*).

LITERATURA CITADA

- Ascencio-Ibáñez, J., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z., Argüello-Astorga, G., Rivera-Bustamante, R.J.P.d., 1999. First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatan, Mexico. 83, 1178-1178.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Pruna-Camacho, M.B., Díaz-Plaza, R., Rivera-Bustamante, R.F., 2000. Los Geminivirus. Revista Mexicana de Fitopatología 17, 113-127.
- Bañuelos-Hernández, B., Mauricio-Castillo, J., Cardenas-Conejo, Y., Guevara-González, R., Arguello-Astorga, G.J.A.o.v., 2012. A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. 157, 1835-1841.
- Blancard, D., 1996. Enfermedades del tomate. Prensa, México.
- Brown, J., Nelson, M.J.P.d., 1988. Transmission, host range and virus-vector relationships in chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. 72, 866-869.
- Brown, J., Poulos, B.J.P.D., 1990. Serrano golden mosaic virus a newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. 74 p.
- Brown, J., Idris, A., Fletcher, D.J.P.d., 1993. Sinaloa tomato leaf curl virus, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. 77, 1262.

- Delgadillo, S., Garzón, T., Vega, P.J.R.m.d.f., 1989. Cucurbit viruses in Mexico: a survey. 7, 136-139.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J.J.P.M.B.R., 1983. A rapid method for DNA extraction from plant tissue. 1, 19-21.
- Deng, D., Otim-Nape, W., Sangare, A., Ogwal, S., Beachy, R., Fauquet, C.J.A.J.o.R., Crops, T., 1997. Presence of a new virus closely related to East African cassava mosaic geminivirus, associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. 2, 23-28.
- Díaz-Plaza, R., Avilés-Baeza, W., Peña-Ramírez, R., Rivera-Bustamante, R., 2002. Geminivirus detected in habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jac) in Yucatan Peninsula, Proceeding of the 16 th International pepper conference. Tampico, Tamaulipas, México. November, pp. 10-12.
- Fraire, S., Recendez-Alvarado, M., Carrillo-Tripp, J., Rivera-Bustamante, R., Alvarado-Rodríguez, M., 2011. Geminiviral (PHYVV and PepGMV) and cucumoviral (CMV) co-infection in chili pepper fields: The AC1 gene in PepGMV with a mutation with aminoacid change, Phytopathology. Amer Phytopathological Soc 3340 Pilot Knob Road, St Paul, MN 55121 USA, pp. S54-S55.
- Gabor, B., Wiebe, W., 1997. Tomato diseases: A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Petoseed Co. PS, Saticoy, USA.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., Czosnek, H.J.V., 1998. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. 240, 295-303.

- Haible, D., Kober, S., Jeske, H.J.J.o.v.m., 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. 135, 9-16.
- Harrison, B., Liu, Y., Khalid, S., Hameed, S., Otim-Nape, G., Robinson, D.J.A.o.A.B., 1997. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. 130, 61-75.
- Holguín-Peña, R., Juárez, R.V., Rivera-Bustamante, R.J.P.d., 2004. Pepper golden mosaic virus affecting tomato crops in the Baja California Peninsula, Mexico. 88, 221-221.
- Hou, Y.-M., Gilbertson, R.L.J.J.o.v., 1996. Increased pathogenicity in a pseudorecombinant bipartite geminivirus correlates with intermolecular recombination. 70, 5430-5436.
- Hull, R., 2002. Plant Virology, 4th ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Hunter, W., Hiebert, E., Webb, S., Tsai, J., Polston, J.J.P.D., 1998. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). 82, 1147-1151.
- Jones, J.B., Zitter, T.A., Momol, T.M., Miller, S.A., 2014. Compendium of tomato diseases and pests. Am Phytopath Society.
- Lebsky, V., Poghosyan, A.J.B.o.I., 2007. Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview. 60, 131.

- Liu, S., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G.J.J.o.G.V., 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. 78, 1791-1794.
- López Salinas, E., Becerra Leor, E.N., Cano Reyes, O., Fraire Vázquez, G.J.R.M.d.F., 1994. Reacción al virus del mosaico dorado, adaptación y rendimiento de la línea de frijol DOR-390, en el sureste de México. 2, 139-145.
- Mauricio-Castillo, J., Argüello-Astorga, G., Alpuche-Solís, A., Monreal-Vargas, C., Díaz-Gómez, O., De La Torre-Almaraz, R.J.P.d., 2006. First Report of Tomato severe leaf curl virus in México. 90, 1116-1116.
- Mauricio-Castillo, J., Argüello-Astorga, G., Ambríz-Granados, S., Alpuche-Solís, A., Monreal-Vargas, C.J.P.d., 2007. First Report of Tomato golden mottle virus on *Lycopersicon esculentum* and *Solanum rostratum* in Mexico. 91, 1513-1513.
- Mauricio-Castillo, J.A., Argüello-Astorga, G.R., Bañuelos-Hernández, B., Ambríz-Granados, S., Velásquez-Valle, R., Méndez-Lozano, J., 2014a. Una nueva cepa del Virus del Chino del Tomate aislado de plantas de soya (*Glycine max* L.) en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5, 1441-1449.
- Mauricio-Castillo, J.A., Reveles-Torres, L.R., Salas-Muñoz, S., 2014b. Begomovirus y curtovirus: Generalidades y métodos de diagnóstico, Virus y fitoplasmas de Chile: Una perspectiva regional. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Place Book Section Published, pp. 51-98.

- Mendez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C., Rivera-Bustamante, R.J.P., 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. 93, 270-277.
- Monreal-Vargas, C.T., 2005. Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas, *Biología Molecular de Plantas*. IPICYT, San Luis Potosí.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D., Czosnek, H.J.V., 1991. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. 185, 151-161.
- Ndunguru, J., Legg, J.P., Aveling, T., Thompson, G., Fauquet, C.M.J.V.j., 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. 2, 21.
- Noris, E., Hidalgo, E., Accotto, G., Moriones, E.J.A.o.v., 1994. High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the west Mediterranean basin: the nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. 135, 165-170.
- Palmer, K.E., Rybicki, E.P., 1998. The molecular biology of mastreviruses, *Advances in virus research*. Elsevier, Place Book Section Published, pp. 183-234.
- Rico, J., 2002. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el Estado de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas Universidad de Guanajuato.

- Rojas, M., 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of Plant Disease* 77, 340-347.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2011. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Schuster, D., Mueller, T., Kring, J., Price, J.J.H., 1990. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. 25, 1618-1620.
- SIAP. 2017, Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. from <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>. consultado Mayo 12.
- Stenger, D., Duffus, J., Villalon, B.J.p., 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. 14, 18.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A., Rivera-Bustamante, R.F.J.P., 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. 86, 1186-1192.
- Umaharan, P., Padidam, M., Phelps, R.H., Beachy, R.N., Fauquet, C.M.J.P., 1998. Distribution and diversity of geminiviruses in Trinidad and Tobago. 88, 1262-1268.

REVISIÓN TÉCNICA

Dr. Juan Manuel Pichardo González
Centro Nacional de Recursos Genéticos - INIFAP

M.C. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia
Campo Experimental La Laguna (CELALA)

DISEÑO DE PORTADA

Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-11-02-11-09-101

COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Presidente: Dra. Raquel K. Cruz Bravo
Secretario: MC. Ricardo A. Sánchez Gutiérrez
Vocal: Dr. Luis R. Reveles Torres
Vocal: Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en DICIEMBRE de 2019 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.
Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

Este documento se encuentra en formato digital, mediante página internet en descargas ilimitadas

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
Dra.	Nadiezhdha Y. Ramírez Cabral	Agrometeorología y Modelaje
Ing.	José Israel Casas Flores	Agrometeorología y Modelaje
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
Ing.	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

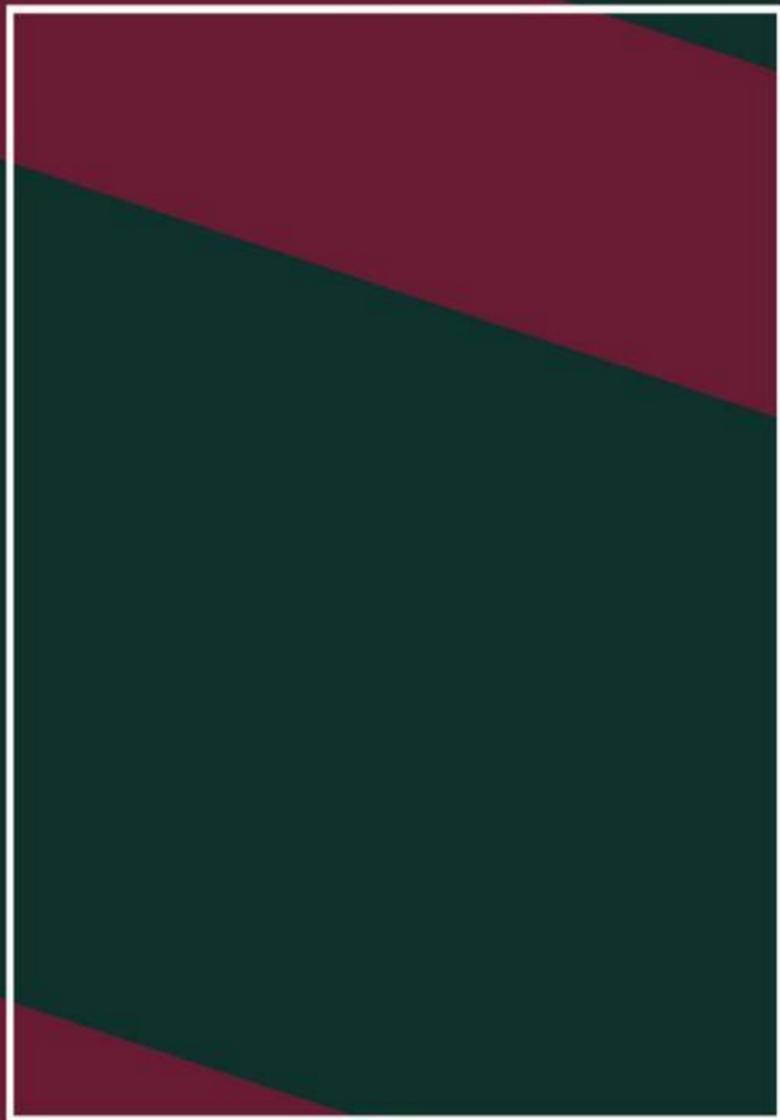
* Becarios



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

inifap
Instituto Nacional de Investigaciónes,
Fitopatología y Fitosanidad

www.gob.mx/inifap



 @inifapmx

 @inifap

 /INIFAP1

 @inifap