

PATÓGENOS ASOCIADOS CON LA VIROSIS DEL CHILE EN EL ESTADO DE DURANGO

Dr. Rodolfo Velásquez Valle
MC. Maihualy Martínez Fernández
Dr. Luis Roberto Reveles Torres



Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de V.R., Zac.
Folleto técnico Núm. 107
Diciembre 2020
ISBN: 978-607-37-1268-2



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

inirap ^{ES}
35 Años Transformando el Campo

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
DR. VÍCTOR MANUEL VILLALOBOS ARÁMBULA
Secretario

ING. VÍCTOR SUÁREZ CARRERA
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

LIC. DAVID MONREAL ÁVILA

Coordinador General de Ganadería

DR. SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador General de Desarrollo Rural

LIC. IGNACIO OVALLE FERNANDEZ

Director General de Seguridad Alimentaria

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

DR. LUIS ÁNGEL RODRÍGUEZ DEL BOSQUE

Encargado del Despacho de los Asuntos de la Dirección
General del INIFAP

DR. JOSÉ ANTONIO CUETO WONG

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

DR. LUIS ORTEGA REYES

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

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DR. LUIS ROBERTO REVELES TORRES

Director de Coordinación y Vinculación

**PATÓGENOS ASOCIADOS CON LA VIROSIS DEL
CHILE EN EL ESTADO DE DURANGO**

Dr. Rodolfo Velásquez Valle
Investigador del Programa de Sanidad
Forestal y Agrícola
Campo Experimental Pabellón

MC. Maihualy Martínez Fernández
Investigador del Programa de Hortalizas
Campo Experimental Valle del Guadiana

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Investigador del Programa de Biología Molecular
Campo Experimental Zacatecas

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias
Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de Víctor Rosales, Zac., México
Diciembre 2020

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

Folleto Técnico 107

**PATÓGENOS ASOCIADOS CON LA VIROSIS DEL
CHILE EN EL ESTADO DE DURANGO**

ISBN: 978-607-37-1268-2

Primera Edición 2020

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, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de la institución.

Hecho en México

Contenido

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Metodología..... | 5 |
| 2.1 | Colecta de muestras..... | 5 |
| 2.2 | Extracción de DNA..... | 6 |
| 2.3 | Cuantificación de DNA..... | 8 |
| 2.7 | Electroforesis en geles de agarosa..... | 11 |
| 3. | Resultados..... | 12 |
| 3.1 | Incidencia de patógenos | 12 |
| 3.2 | Principales sintomatologías asociadas a la virosis del chile en Durango | 16 |
| 3.3 | Begomovirus | 24 |
| 3.4 | <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> | 25 |
| 3.5 | <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> | 26 |
| 4. | Conclusiones..... | 27 |
| 5. | Bibliografía | 28 |

1. Introducción

La producción de chile para consumo en fresco y en seco en el estado de Durango se enfrenta a diversas limitantes bióticas, sin embargo, a partir del ciclo de cultivo primavera verano de 2014 se registró la presencia de una nueva enfermedad (Velásquez-Valle *et al.*, 2014) a la que pronto se le confirió el nombre común de virosis del chile y cuya severidad obligó a un número de productores de esta hortaliza a destruir sus cultivos a pocos días de iniciado el ciclo.

En el norte centro de México el cultivo de chile es infectado por un elevado número de agentes virales; un miembro del género *Curtovirus* denominado *Beet mild curly top virus* (BMCTV) fue identificado en plantas de chile ancho y mirasol en Aguascalientes y Zacatecas en las que provocaba síntomas como clorosis, enanismo, deformación de hojas y escasa fructificación; una de las principales características de este género es que se disemina por medio de la chicharrita del betabel, *Circulifer tenellus* Baker (Velásquez-Valle *et al.*, 2008). En Chihuahua se encontraron plantas de chile jalapeño que mostraban clorosis intervenal, enanismo y deformación de hojas y

donde se identificó al *Beet severe curly top virus* (BSCTV), otro miembro del género *Curtovirus* (Robles-Hernández *et al.*, 2011). En el trabajo realizado por Swisher *et al.* (2018) se reportó la presencia de una cepa de *Curtovirus* denominada BCTV-SpCT (US-Sp3-96) previamente identificada como *Spinach curly top virus* en una muestra de chile colectada en Zacatecas; además, otras secuencias obtenidas de muestras de chile en Poanas, Dgo y Sombrerete, Zac., compartían 91% de identidad con la cepa BCTV-PeCT (US-Ca-BV3-Pep-09) antes conocida como *Pepper curly top virus*. Dentro de los virus de ARN en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas se identificó a los virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus: CMV*), del jaspeado del tabaco (*Tobacco etch virus: TEV*), del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus: TMV*), Y de la papa (*Potato virus Y: PVY*) y del moteado del chile (*Pepper mottle virus: PepMV*) asociados con síntomas como enanismo, clorosis y deformación de hojas (Velásquez-Valle *et al.*, 2012). Adicionalmente el virus de la marchitez manchada del jitomate (*Tomato spotted wilt virus: TSWV*) se encontró en Zacatecas en plantas de chile ancho (Velásquez-Valle *et al.*, 2009). Un estudio realizado en parcelas de chile en Chihuahua

(González-Franco *et al.*, 2014) reveló la presencia de nuevos patógenos virales de ARN para esa región, entre los cuales se encontraron CMV, TEV, TMV, TSWV, PVY, PepMV, virus del mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus: AMV*), virus de la mancha anillada del tabaco (*Tobacco ring spot virus: TRSV*), virus de la mancha anillada del tomate (*Tomato ring spot virus: ToRSV*), virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus: TBSV*), virus del moteado moderado del chile (*Pepper mild mottle virus: PMMoV*) y virus de la mancha necrótica del Impatien (*Impatien necrotic spot virus: INSV*).

Otro género viral importante es el de los *Begomovirus* que son transmitidos por un grupo de biotipos de la mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Genn. (Inoue-Nagata *et al.*, 2016); Reveles-Torres *et al.* (2012) mencionaron la infección mixta de los virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus: PepGMV*) y del huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper Huasteco yellow vein virus: PHYVV*), ambos pertenecientes al género *Begomovirus*, con el BMCTV en plantas de chile mirasol que mostraban síntomas de amarillamiento.

Además de los virus, otros patógenos como las bacterias también infectan las plantas de chile en esta región. Un estudio reveló que para el otoño de 2014 entre el 5 y 75% de las parcelas de chile en los estados de Durango, Michoacán y Zacatecas presentaban síntomas como hojas pequeñas, cloróticas, con mosaico, rizadas, entrenudos cortos, enanismo, filodia y roseteado de brotes (Swisher *et al.*, 2018); en 2015 se dio a conocer la presencia en plantas de chile mirasol provenientes de Zacatecas de una bacteria llamada *Candidatus* Phytoplasma trifolii 16SrVI, la cual ocasiona un sobrecrecimiento de los sépalos conocido como yema grande (Mauricio-Castillo *et al.*, 2015).

El objetivo del folleto consiste en dar a conocer los avances de investigación obtenidos en los Campos Experimentales Valle de Guadiana y Zacatecas del INIFAP en relación con la identificación molecular de los patógenos asociados con la enfermedad denominada virosis del chile en Durango.

2. Metodología

2.1 Colecta de muestras

Se realizaron recorridos por el área productora de chile en el municipio de Poanas y en el área de Rodeo, Dgo. durante el año 2018. Se localizaron parcelas comerciales pertenecientes a tipos de chile (consumo en fresco y en seco) Ancho, Puya, Mirasol, Anaheim, Jalapeño y Tornachile. Se colectaron plantas con síntomas asociados a la infección por fitoplasmas (clorosis, deformación foliar, yema grande, sobrecrecimiento, enanismo, etc) (Figura 1). De cada planta colectada se tomó una submuestra de follaje joven que se entregó al laboratorio de Diagnóstico Molecular en Sanidad Vegetal del CEZAC para la detección e identificación de posibles bacterias como Fitoplasmas y Liberibacter, y de virus específicamente Begomovirus y Curtovirus. Se registraron los síntomas presentes en cada muestra.



Figura 1. Parcela comercial de chile en Poanas, Dgo., mostrando plantas con la sintomatología utilizada para la identificación de patógenos en el presente trabajo.

2.2 Extracción de DNA

La preparación de los extractos a partir de las plantas colectadas se realizó por el método de Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones de Weising *et al.* (1995) y adecuaciones propias, quedando de la siguiente manera: Primeramente, se maceró un gramo de tejido vegetal con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana frío, posteriormente, el tejido pulverizado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, previamente etiquetado, al cual se le adicionaron 800 μ l de buffer de extracción (200 mM, Tris-base, pH. 8.5; 250 mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5%SDS) y 40 μ l de SDS 20%, la muestra se agitó hasta homogenizarla. En

seguida, los tubos se incuban a 65°C, durante 10 minutos, realizando agitaciones cada 2 minutos. Después de la incubación, se añadió 200 µl de acetato de potasio 5 M y la muestra se mezcló hasta homogenizar.

Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm, por 20 minutos. Después, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y se agregó la cantidad equivalente de PCI (250 µl de fenol, 250 µl de la mezcla de Cloroformo-Isoamilalcohol), la muestra se mezcló hasta homogenizar, y enseguida, se centrifugó a 14,000 rpm, por 10 minutos. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se adicionó, por las paredes del tubo, 500 µl de isopropanol frío, seguido de agitaciones, suaves, hasta observar el precipitado blanco, en forma de un conglomerado (DNA). Para una precipitación óptima, se colocaron los tubos a -20 °C durante 10 minutos. Después de esto, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. La pastilla obtenida se lavó, dos veces, con 600 µl de etanol frío al 70%. El sobrenadante se descartó, y los tubos se invirtieron para secar la pastilla de DNA. Posteriormente, la pastilla se disolvió en 40 µl de buffer TE (tris- EDTA 0.01 Mm ph 8.0). Finalmente se adicionó, a las muestras con

el DNA disuelto, 0.2 μ l de enzima RNAsa, continuando con una incubación a 37°C por 30 minutos.

2.3 Cuantificación de DNA

El DNA resultante se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de UV-Visible, marca Jenway modelo 3365, usando celdas de cuarzo. La absorbancia se midió a longitudes de onda de 260 y 280 nm; la relación entre ambos valores es un indicador de la pureza del material extraído, ya que las proteínas absorben luz UV a 280 nm. Posteriormente, se procedió a calcular la cantidad de DNA por gramo de tejido mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ng. } \mu\text{l}^{-1} \text{ de DNA} = \text{Factor de dilución} \times \text{Absorbancia} \\ 260 \text{ nm} \times K$$

Donde K es 50 ng. μ l⁻¹, la concentración de DNA con absorbancia a 260 nm igual a 1. Luego, se calculó el DNA total, al considerar el volumen total resultante de cada extracción, y éste se relacionó con la cantidad de masa original.

2.4 Detección de Liberibacter

Para el diagnóstico de *Candidatus* Liberibacter solanacearum se utilizaron los iniciadores específicos: OA2 / Oi2c (Liefting *et al.*, 2008; Liefting *et al.*, 2009).

El ensayo de PCR se realizó conteniendo 1 μ L de ADN, 1 μ L de buffer 10X, 0.4 de $MgCl_2$ 50mM, 0.2 μ l de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.2 μ L de Taq DNA polimerasa, 0.2 μ l de cada oligonucleótido y 6.8 μ L de agua. Enseguida se realizaron las reacciones de amplificación por PCR, donde las condiciones consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C/min, temperatura de hibridación de 60°C/min y temperatura de elongación de 72°C/1.30 minutos. Posteriormente se efectuó un calentamiento de 72°C/min para después mantenerse a temperatura de 15°C. Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1.2% y se cargaron 7 μ L del producto de PCR junto con 2 μ l de buffer de carga LB 1X, de marcador se utilizaron 6 μ l de 1Kb.

2.5 Detección de Fitoplasmas

El fitoplasma se detectó por PCR anidada utilizando los iniciadores específicos P1 (5´ -AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3´ y Tint (5´ -TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C- 3´) (Smart *et al.*, 1996), y después una re amplificación anidada a partir de un fragmento de 1,250 pb aproximadamente con los oligonucleótidos

R16F2n (5´ -GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3´ y 5´ -
TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3´)
(Gundersen y Lee, 1996).

Los programas del termociclador fueron 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 56°C/1minuto,72°C/2 minutos), y de extensión final a 72°C /5 minutos. El programa para la reamplificación fue a 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 55°C/1minuto, 72°C/2 minutos), y extensión final a 72°C /5 minutos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

2.6 Detección de virus

El diagnóstico de BCTV fue realizado por medio de PCR usando los primers universales BCTV CP4f (5'-CAG TAT CGA CCA GTT GTT T-3') y BCTV CP6r (5'-CTC TTC GAA TAC GAT AAG TAG-3'). Para la reacción se utilizaron 5-10 ng de ADN y 20 µl de una reacción compuesta por 0,250 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), 250 µM de dNTPs, 2 µl de tampón para Taq 10X (15 mM Cl₂Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 3 mM Cl₂Mg. El programa utilizado de la PCR fue: 35 ciclos consistentes de 94°C por 30

segundos, 59°C por 60 segundos y 72°C por 90 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. La amplificación de los productos fue separada por electroforesis. El diagnóstico de BCTV fue determinado por la presencia de un fragmento de 576 pb en geles de agarosa al 2%.

2.7 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR resultantes de los análisis de los tres patógenos, se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Smart *et al.*, 1996).

El gel de corrimiento para cámara de electroforesis, con capacidad de 50 ml, se preparó de la siguiente manera: se mezcló 50 ml de buffer TBE 1x (TRIS-HCl, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM) y 0.5 g de agarosa. La mezcla se calentó, en el microondas, para lograr la disolución de la agarosa en el TBE 1x y se dejó enfriar un poco, en seguida, se añadió 1.5 µl de bromuro de etidio. Antes de que la muestra gelifique, se vació a la cámara de electroforesis, en la cual, se dejó solidificar, con los peines inmersos, con la finalidad de formar los pozos a cargar en el gel. La cámara de electroforesis se llenó, con buffer TBE 1x, hasta cubrir el gel.

Posteriormente, se mezclan 6 µl de muestra, con 3 µl de buffer de carga y se depositaron dentro de cada pozo en el gel y se continuó con el corrimiento a 90 volts durante una hora. Finalmente, se visualizó el gel en una cámara de luz ultravioleta y se prosiguió con la fotodocumentación para la interpretación de resultados, analizados con el Software Kodak 1D 3.6.

3. Resultados

3.1 Incidencia de patógenos

Un muestreo preliminar realizado en el área productora de chile en Poanas, Dgo., reveló que en el 89.4% de las muestras colectadas se detectó al menos un patógeno viral o bacteriano: la presencia de begomovirus, *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) y fitoplasmas se encontró en el 66.7, 54.2 y 25.0% respectivamente de las muestras colectadas; no se detectó la infección por *Spiroplasma* o virus del género *Curtovirus* (Figura 2).

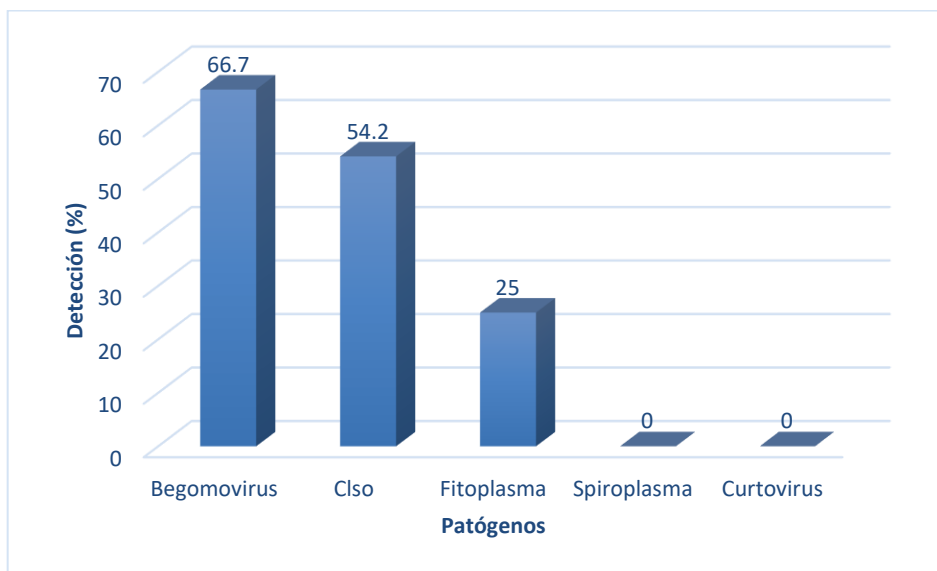


Figura 2. Incidencia de patógenos en plantas de chile mirasol con síntomas de virosis colectadas en la región de Poanas, Durango.

En el 53.4% de las muestras positivas se identificó solamente un patógeno; en el 34.9 y 11.6% restante se identificaron dos y tres patógenos en la misma muestra respectivamente; el fenómeno de infecciones mixtas en chile es común, por lo menos para virus de ARN según mencionan Abdalla *et al.* (1991) y Murphy y Zitter (2003).

De acuerdo con la frecuencia de detección (%) en forma individual o en asociación con otros patógenos, se confirmó la importancia de los begomovirus ya que en forma individual se encontró en el 27.9% de las muestras y en forma mixta se encontró en el 25.6% de

las muestras que también fueron positivas a CLso. La asociación CPT + CLso, CPT en forma individual y la asociación Begomovirus + CPT, alcanzaron los menores porcentajes de detección (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia de detección de begomovirus, *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Candidatus Phytoplasma trifolii* en plantas de chile colectadas en Poanas, Durango.

| Patógeno (s) | Frecuencia de detección (%) |
|--|-----------------------------|
| <i>Begomovirus</i> | 27.9 |
| <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> | 16.3 |
| <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> | 6.9 |
| Begomovirus + <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> | 25.6 |
| Begomovirus + <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> | 6.9 |
| <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> + <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> | 2.3 |
| Begomovirus + <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> + <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> | 11.6 |

Durante junio y julio de 2018 se colectaron 141 muestras de plantas de chile de los tipos Anaheim, Ancho, Jalapeño, Mirasol, Puya y Tornachile en las áreas productoras de chile en Poanas y Rodeo, Dgo. La

mayoría de esos tipos, probablemente con excepción de los Anaheim y Jalapeños, corresponden a tipos criollos, lo cual posiblemente conduzca a una respuesta más heterogénea a la virosis. El tipo de chile con mayor frecuencia de muestreo fue el Mirasol (53.2%) seguido por el Ancho (31.9%), por el contrario, los tipos Anaheim y Puya resultaron con las menores frecuencias de muestreo, 2.1 y 2.8% respectivamente (Figura 3).

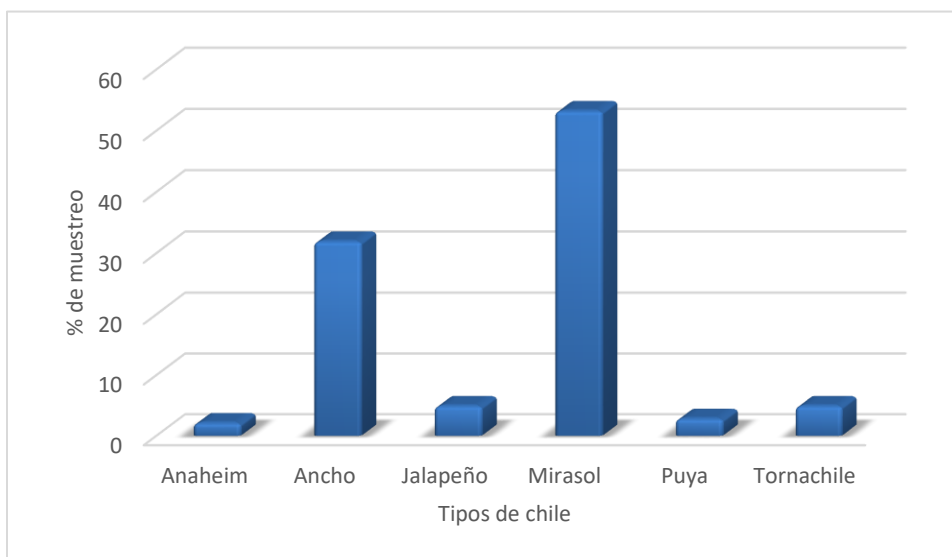


Figura 3. Proporción de tipos de chile muestreados en Poanas y Rodeo, Dgo. para detección de patógenos asociados con la virosis del chile.

3.2 Principales sintomatologías asociadas a la virosis del chile en Durango

En forma general se observaron cuatro grupos de síntomas definidos con cierta claridad en las plantas de chile afectadas por la virosis en Durango. Enseguida se describe cada una de esas sintomatologías, aunque es necesario aclarar que una planta con cualquiera de estos grupos de síntomas puede mostrar una sintomatología perteneciente a otro grupo.

Grupo de síntomas I: generalmente la parte más joven de las ramas es la que presenta los síntomas que incluyen clorosis intervenal una deformación de las hojas que adquieren la forma de una cuchara; la planta continúa produciendo flores, pero los frutos no alcanzan el tamaño normal y son deformes, sin valor comercial. En la mayoría de los casos, las plantas afectadas son de menor tamaño que las aparentemente sanas (Figura 4).



Figura 4. Planta de chile con clorosis intervenal, enanismo y deformación foliar en forma de cuchara.

Grupo de síntomas II: Las plantas muestran hojas, usualmente las más viejas, con zonas amarillas o cloróticas en la base o ápice; otros síntomas como bordes ondulados y abultamiento de la superficie foliar afectada también pueden ser observados; frecuentemente los frutos de estas plantas se deforman (Figura 5).



Figura 5. Planta de chile mostrando zonas amarillas en la base de las hojas. Las hojas afectadas también presentan bordes ondulados y abultamientos.

Grupo de síntomas III: La característica distintiva de este grupo de síntomas es el conocido como yema grande y que consiste en el sobrecrecimiento de los sépalos y el nulo o escaso desarrollo del fruto. Las plantas afectadas son del mismo tamaño que las aparentemente sanas. Las hojas tienen una apariencia clorótica, erecta, con los bordes rizados y alanceolada; regularmente estas plantas carecen de frutos, pero si llegan a tenerlos son de menor peso y sin el color rojo intenso de los frutos secos (Figura 6).



Figura 6. Planta de chile mostrando el síntoma de yema grande y follaje clorótico y deforme.

Grupo de síntomas IV: Las plantas en este grupo presentan clorosis o color amarillo intenso, enanismo, hojas elongadas y gruesas, venación púrpura y frutos escasos, deformes y de menor tamaño (Figura 7).



Figura 7. Planta de chile mostrando enanismo, clorosis severa, hojas elongadas y ausencia de frutos.

El porcentaje de detección de patógenos en el segundo grupo de muestras colectadas en 2018 fue de 30.9%, sin tomar en cuenta la variedad, patógeno o sitio de muestreo; sin embargo, el porcentaje de detección de patógenos resultó diferente para cada tipo de chile: destaca el caso de las muestras de chile Anaheim cuyos síntomas incluían follaje rizado, clorosis y enanismo y que fueron negativas a los cinco patógenos probados. En las muestras pertenecientes a los tipos Ancho y Tornachile se obtuvo un porcentaje de detección similar, 17.4 y 14.3% aunque el número de muestras examinadas fue diferente, 46 y 7 para Ancho y Tornachile respectivamente. Los porcentajes de

detección en las muestras de Jalapeño (57.1%) y Puya (50%) fue superior al de Mirasol (38.7%) aunque los (50%) fue superior al de Mirasol (38.7%) aunque los

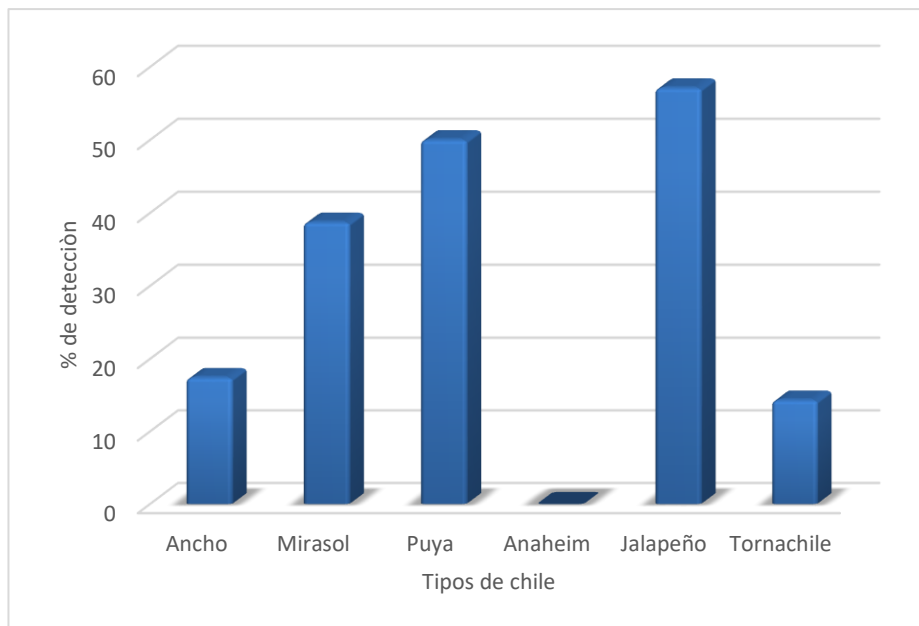


Figura 8. Porcentaje de detección de patógenos asociados con la virosis en muestras de diferentes tipos de chile colectadas en Durango, México.

En este segundo grupo de muestras se encontraron solamente dos de los cinco patógenos probados; se confirmó la presencia de Begomovirus y de CLso mientras que no fueron encontrados CPT, Curtovirus y Spiroplasma en ninguna de las muestras analizadas. En general, sin tomar en cuenta el tipo de chile o sitio de muestreo, el porcentaje de detección de Begomovirus y CLso fue de 15 y 27.5% respectivamente.

En todas las muestras colectadas, independientemente del tipo de chile, se encontró que por lo menos fueron positivas a Begomovirus o CLso; la única excepción fueron las muestras obtenidas en chile Anaheim, donde no se detectó a ninguno de estos patógenos. El porcentaje de detección de CLso fue superior al de Begomovirus en los tipos de chile Ancho, Mirasol y Jalapeño. En las muestras del tipo Tornachile el porcentaje de detección para ambos patógenos fue similar; en el caso de las muestras de chile Puya solamente se detectó la presencia de Begomovirus (Figura 9).

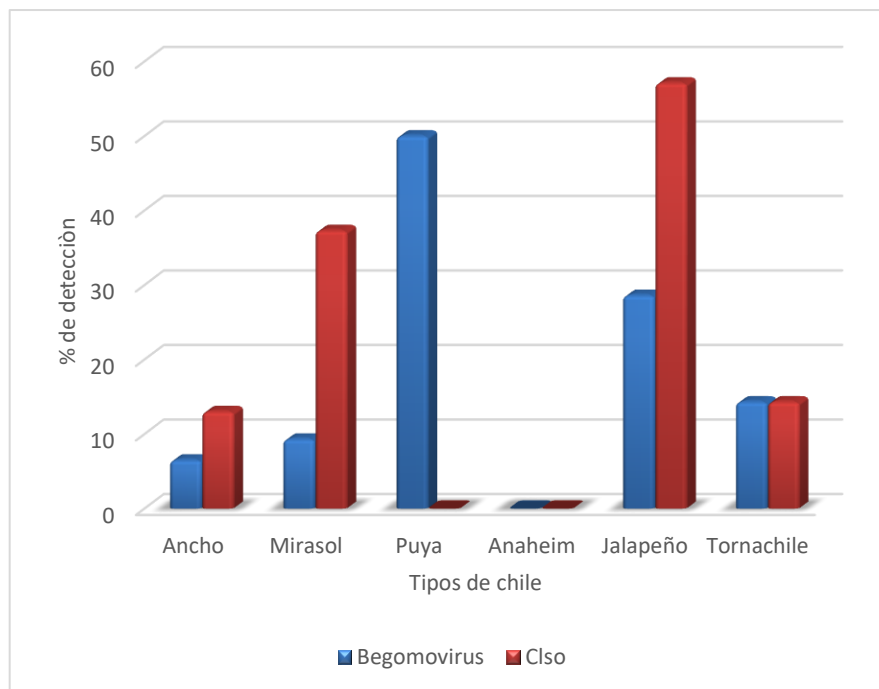


Figura 9. Porcentaje de detección de Begomovirus y *Candidatus Liberibacter solanacearum* en muestras de diferentes tipos de chile en Durango, México.

El porcentaje de detección de patógenos en general en este trabajo fue de 89.4 y 30.9% para el primer y segundo muestreo respectivamente, aunque en el primero se identificaron tres agentes patogénicos (Begomovirus, CLso y CPT) mientras que en el segundo solamente se encontraron Begomovirus y CLso. El trabajo realizado en Durango, Zacatecas y Michoacán por Swisher *et al.* (2018) reportó que el 76% de las muestras de chile analizadas se encontraban

infectadas con CLso, el fitoplasma *Beet leafhopper-transmitted virescence agent* (BLTVA) y una cepa de Curtovirus.

El porcentaje de detección de infecciones mixtas con dos patógenos fue superior al 30% en el muestreo preliminar en contraste, en el segundo muestreo solamente el 18.2% de las muestras positivas totales resultaron positivas a dos patógenos simultáneamente. La interacción Begomovirus - Clso se identificó en muestras de los tipos Mirasol (62.5%), Jalapeño (25.0%) y Ancho (12.5%). No se detectaron interacciones entre tres patógenos en ninguna de las muestras colectadas.

En las muestras de diferentes tipos de chile que mostraban síntomas de virosis se identificaron tres patógenos o grupos de patógenos: un género viral: *Begomovirus* y dos bacterias: *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Candidatus Phytoplasma trifolii*. Las principales características de cada uno de ellos se anotan enseguida.

3.3 Begomovirus

Los virus dentro del género *Begomovirus* (Familia *Geminiviridae*) presentan un genoma de ADN sencilla

circular. La mayoría de los Begomovirus poseen un genoma bipartito, es decir, el genoma se encuentra repartido en dos segmentos conocidos como ADN A y ADN B; la producción de síntomas en el hospedero requiere de ambos segmentos (Reveles-Torres *et al.*, 2019). En México se ha reportado al virus huasteco de la vena amarilla (*Pepper huasteco yellow vein virus: PHYVV*) y al virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus: PepGMV*) (Reveles-Torres *et al.*, 2012; Vaca-Vaca *et al.*, 2019). Los begomovirus son transmitidos por la mosquita blanca *B. tabaci* de una manera circulatoria persistente; el insecto ingiere el virus a través de sus estiletes, los viriones pasan a lo largo del canal alimentario hasta alcanzar el esófago y el intestino medio, posteriormente llegan hasta la hemolinfa y se traslocan hacia las glándulas salivales primarias de donde son expulsados en la saliva hacia el floema de las plantas (Czosnek *et al.*, 2017).

3.4 *Candidatus Liberibacter solanacearum*

Clso es una bacteria Gram negativa filamentosa que puede tomar formas redondas al terminar su ciclo celular, cuenta con una delgada capa de peptidoglicano, no existe evidencia de flagelos, no

cultivable en medios artificiales, parásito obligado de los tubos cribosos del floema de las plantas, aunque también se encuentra en el sistema digestivo y hemolinfa del insecto vector; Clso puede ser transmitido por medio de injerto, semilla e insectos vectores. El vector de esta bacteria es el psílido de la papa y del tomate, *Bactericera cockerelli*, cuyos hábitos de alimentación provocan daños considerables en sus hospederos, pero adquieren mayor severidad debido a la transmisión de patógenos como CLso. Una vez inoculada en una planta, la bacteria se multiplica y extiende sistémicamente (Ontiveros, 2012; Camacho-Tapia *et al.*, 2016; Delgado-Ortiz *et al.*, 2019).

3.5 Candidatus Phytoplasma trifolii

Los fitoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, en consecuencia, son pleomórficos, poseen un genoma pequeño, de 530 a 1350 Kb, muestran un bajo contenido de guanina y citosina en su ADN; son resistentes a antibióticos como la penicilina, pero susceptibles a la tetraciclina; su distribución en las plantas infectadas se limita a las células cribosas del floema y su transmisión se realiza por insectos

conocidos como chicharritas de la familia Cicadellidae, entre otras. En las parcelas de chile en Zacatecas se ha encontrado que CPT puede ser transmitido por la chicharrita del betabel *Circulifer tenellus* Baker y las chicharritas *Empoasca abrupta* DeLong y *Ceratagallia nitidula* Oman (Mauricio-Castillo *et al.*, 2015; Reveles-Torres *et al.*, 2017; Reveles-Torres *et al.*, 2018; Salas-Muñoz *et al.*, 2018).

4. Conclusiones

En las plantas de chile con síntomas de la enfermedad conocida como “virosis del chile”, colectadas en el estado de Durango se identificaron un género viral denominado *Begomovirus* así como dos bacterias habitantes del floema: *Candidatus Liberibacter solanacearum* y *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

5. Bibliografía

- Abdalla OA, Desjardins PR, and Dodds JA. 1991. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting pepper in California. *Plant Disease* 75:1019-1023.
- Camacho-Tapia M, Rojas-Martínez RI, Rebollar-Alviter A, Aranda-Ocampo S y Suárez-Espinosa J. 2016. Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 22:5-16 doi: 10.5154/r.rchsh.2015.09.021
- Czosnek H, Hariton-Shalev A, Sobol I, Gorovits R, and Ghanim M. 2017. The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses* 7, 9, 273; doi:10.3390/v9100273
- Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Delgado-Ortiz JC, Beltrán-Beache M, Cerna-Chávez E, Aguirre-Urbe LA, Landero-Flores J, Rodríguez-Pagaza Y y Ochoa-Fuentes YM. 2019. *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 22:1-12. DOI:10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177
- González-Franco AC, Gill-Langarica EM, Robles-Hernández L, Núñez-Barrios A, Pérez-Leal R, Hernández-Rodríguez OA y Pérez-Moreno L. 2014. Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua,

México. Revista Mexicana de Fitopatología 32:38-51.

Gundersen D and Lee I.1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea 35:144-151.

Inoue-Nagata AK, Lima MF, and Gilbertson RL. 2016. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. Horticultura Brasileira 34:008-018. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>

Jagoueix S, Bove J-M, and Garnier 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivisión of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44:379-386.

Liefting LW, Perez-Egusquiza Z, Clover G, and Anderson J. 2008. A new *Candidatus* Liberibacter species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. Plant Disease 92:1474.

Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS, and Clover GR. 2009. A new *Candidatus* Liberibacter species associated with diseases of solanaceous crops. Plant Disease 93:208-214.

Mauricio-Castillo JA, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R, Ambriz-Granados S y Reveles-Torres LR. 2015. "*Candidatus* phytoplasma trifolii (16SrVI) en chile mirasol (*Capsicum annuum* L.) cultivado en Zacatecas, México. Revista Fitotecnia Mexicana 38:389-396.

- Murphy JF and Zitter TA. 2003. Pepper mottle virus. *In*: Compendium of pepper diseases. Ed. by K. Pernezny, PD Roberts, JF Murphy, and NP Goldberg. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. 63 p.
- Ontiveros GG. 2012. Detección de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" en papa y tomate en los estados de Nuevo León y San Luis Potosí, México. Tesis Maestro en Ciencias. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. 80 p.
- Reveles TLR, Velásquez VR, Mauricio CJA y Salas MS. 2012. Detección de infecciones mixtas causadas por begomovirus y curtovirus en plantas de chile para secado en San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:155-160.
- Reveles-Torres LR, Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S y Velásquez-Valle R. 2017. Diseño de transmisión de fitoplasmas a *Catharanthus roseus* como reservorio natural. Folleto Técnico Núm. 87. Campo Experimental Zacatecas - INIFAP. 57 p.
- Reveles-Torres LR, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R y Mauricio-Castillo JA. 2018. Identificación molecular de fitoplasmas en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*) en Aguascalientes, México. Folleto Técnico Núm. 95. Campo Experimental Zacatecas - INIFAP. 37 p.
- Reveles-Torres LR, Mena-Covarrubias J, Salas-Muñoz S, Martínez-Fernández M y Mauricio-Castillo JA. 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 - INIFAP. 32 p.

- Robles-Hernández L, González-Franco AC, Gill-Langarica EM, Sago C, Nikolaeva OV, and Karasev AV. 2011. First report of *Beet severe curly top virus* in Jalapeño pepper in Chihuahua, Mexico. *Plant Disease* 95:778. doi: 10.1094/PDIS-02-11-0138.
- Salas-Muñoz S, Mauricio-Castillo JA, Dietrich CH, Creamer R, and Reveles-Torres LR. 2018. First report of the leafhoppers *Ceratagallia nitidula* and *Empoasca abrupta* (Hemiptera: Cicadellidae) as vectors of “*Candidatus* *Phytoplasma trifoli*”. *Plant Disease* 102:2636. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0975-PDN>
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CI, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemuller E, and Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Swisher KD, Munyaneza JE, Velásquez-Valle R, and Mena-Covarrubias J. 2018. Detection of pathogens associated with psyllids and leafhoppers in *Capsicum annum* L. in the Mexican states of Durango, Zacatecas, and Michoacán. *Plant Disease* 102:146-153.
- Vaca-Vaca JC, Morales-Euse J, Rivera-Toro DM y López-López K. 2019. Primer reporte de begomovirus infectando cultivos de ají (*Capsicum* spp) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 24:452-462. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79367>
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM, and Creamer R. 2008. First report of *Beet mild curly top virus* infection of chile pepper in north-central

Mexico. Plant Disease 92:650.
DOI: [10.1094/PDIS-92-4-0650A](https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0650A)

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RMD y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. Folleto Técnico No. 20. Campo Experimental Zacatecas - INIFAP. 52 p.

Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Mena-Covarrubias J. 2012. Incidencia y sintomatología de cinco virus en parcelas comerciales de chile seco en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3:381-390.
DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i2.1471>

Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Mena-Covarrubias J, Salas-Muñoz S. and Mauricio-Castillo JA. 2014. Outbreak of *Candidatus liberibacter solanacearum* in dried chile pepper in Durango, Mexico. Agrofaz 14(3):93-98.

Weising, K., R. G. Atkinson and R. C. Gardner. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. Genome Research 4(5): 249-255.

La cita correcta de este folleto es:

Velásquez-Valle, R., Fernández-Martínez M. y Reveles-Torres L.R. 2020. Patógenos asociados con la virosis del chile en el estado de Durango. Folleto Técnico Núm 107. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC - INIFAP, 33 páginas.

Comité Editorial del CIRNOC

**MC. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia
Dr. Arturo Tijerina Chávez
Dr. Julio César Ríos Saucedo
Dr. Esteban Osuna Ceja
Dr. Pedro Jurado Guerra**

Comité Editorial del CE Zacatecas

**Presidente: Dra. Blanca I. Sánchez Toledano
Secretario: Dr. Luis R. Reveles Torres
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera
Vocal: Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Ricardo Sánchez Gutiérrez**

Edición

**Rodolfo Velásquez Valle
Luis Roberto Reveles Torres**

Diseño y fotografía

**Luis Roberto Reveles Torres
Rodolfo Velásquez Valle**

Código INIFAP

MX-0-310809-11-02-11-09-107

**El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en DICIEMBRE de 2020 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

Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria, Centros de Investigación Regional y Campos Experimentales



CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
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 |
| MC. | José Ángel Cid Ríos | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Juan José Figueroa González* | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Mayra Denise Herrera | Frijol 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 | Biología Molecular |
| Dr. | Jaime Mena Covarrubias | Sanidad Forestal y Agrícola |
| Dr. | Rodolfo Velásquez Valle | Sanidad Forestal y Agrícola |
| Dra. | Blanca I. Sánchez Toledano | Socioeconomía |

* Becarios



www.gob.mx/inifap

La producción de chile para consumo en fresco y en seco en el estado de Durango se enfrenta a diversas limitantes bióticas, pero a partir del ciclo de cultivo primavera verano de 2014 se registró la presencia de una nueva enfermedad a la que pronto se le confirió el nombre común de virosis del chile y cuya severidad obligó a un número de productores de esta hortaliza a destruir sus cultivos a pocos días de iniciado el ciclo. El objetivo de ésta publicación consiste en dar a conocer los avances de investigación obtenidos en los Campos Experimentales Valle de Guadiana y Zacatecas del INIFAP en relación con la identificación molecular de los patógenos asociados con la enfermedad denominada virosis del chile en Durango.

