

## SÍNTOMAS ASOCIADOS CON LA INFECCIÓN POR CURTOVIRUS Y FITOPLASMAS EN CHILE PARA SECADO

Velásquez-Valle, R.<sup>1</sup> Reveles-Torres, L. R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Zacatecas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Apdo. Postal # 18, Calera de V. R., Zacatecas, México, CP 98500, [velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx](mailto:velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx),

<sup>2</sup>Campo Experimental Zacatecas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Apdo. Postal # 18, Calera de V. R., Zacatecas, México, CP 98500 y Mauricio-Castillo, J. A. Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la presencia del *Beet mild curly top virus* (BMCTV) y fitoplasmas en plantas de chile que exhibían sintomatologías diferentes. Muestras de follaje de plantas de chile que mostraban síntomas como amarillamiento, hoja pequeña o yema grande fueron colectadas durante la temporada de cultivo 2010 en los estados de Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México y se sometieron a PCR para determinar la presencia de los patógenos mencionados. Se colectaron 407 muestras de diferentes tipos de chile para secado, de las cuales 50.6, 23.6 y 25.8% expresaban síntomas de amarillamiento, hoja pequeña y yema grande respectivamente. La presencia de BMCTV y fitoplasmas fue detectada en 27.8 y 9.3% de las muestras independientemente de la sintomatología expresada. En algunos casos ambos agentes patogénicos se detectaron en la misma muestra.

**Palabras clave:** amarillamiento, hoja pequeña, yema grande, norte-centro de México

### ABSTRACT

The goal of this study was to determine the presence of the *Beet mild curly top virus* (BMCTV) and phytoplasmas in pepper plants that exhibited different symptomatologies. Samples of pepper plants that showed symptoms like yellowing, little leaf or big bud were collected during the 2010 crop season in the states of Aguascalientes, San Luis potosí and Zacatecas, Mexico, and the presence of BMCTV or phytoplasmas was determined by PCR. 407 samples from different dry pepper types; 50.6, 23.6, and 25.8% of those samples expressed yellowing, little leaf, and big bud symptoms respectively. Presence of BMCTV and phytoplasmas was detected in 27.8 and 9.3% of the samples,

regardless the symptoms expressed. In some samples both pathogenic agents were simultaneously detected.

**Keywords:** yellowing, little leaf, big bud, North-Central Mexico

## INTRODUCCIÓN

En la región norte-centro de México el chile para secado (*Capsicum annuum* L.) es trasplantado en alrededor de 39, 000 hectáreas (Velásquez-Valle *et al.*, 2012a). El rendimiento y calidad del cultivo son reducidos por la presencia de enfermedades como la pudrición de la raíz provocada por *Phytophthora capsici* Leo., sin embargo a partir del ciclo de cultivo 2003 se reportó en esta región la presencia de una sintomatología que fue descrita afectando líneas experimentales de chile ancho y mirasol (Velásquez-Valle *et al.*, 2003); el nombre propuesto para ese grupo de síntomas fue el de “amarillamiento del chile”; posteriormente se identificó al *Beet mild curly top virus* (Virus de la punta rizada del betabel: BMCTV) en plantas de chile que mostraban los síntomas de amarillamiento (Velásquez-Valle *et al.*, 2008). En ciclos de cultivo recientes la presencia de otros grupos de síntomas ha sido registrada bajo el término de amarillamientos aunque se pueden distinguir al menos otros dos grupos de síntomas bien definidos: hoja pequeña y yema grande. Un grupo de síntomas denominado hoja pequeña ha sido citado afectando al cultivo de chile en el centro y oeste de México (Santos-Cervantes *et al.*, 2008). Por otro lado, el síntoma de yema grande ha sido mencionado a nivel mundial dañando plantas de jitomate en Italia y Grecia (Del Serrone *et al.*, 2001; Vellios y Lioliopoulou, 2007); en Brasil se le ha llamado cáliz gigante (Flores, 1972). Se considera que ambos síntomas, hoja pequeña y yema grande, están asociados con la infección por fitoplasmas. Aunque la presencia de dos o más virus en una sola planta de chile en esta región de México ya ha sido mencionada (Velasquez-Valle *et al.*, 2012a; Fraire *et al.*, 2011), la información acerca de la ocurrencia de BMCTV y fitoplasmas en una misma planta de chile para secado o su relación con una sintomatología específica es escasa en el norte centro de México, en consecuencia, el propósito de este trabajo consistió en determinar la presencia aislada o simultánea de BMCTV y fitoplasmas en plantas de chile para secado que expresaban una sintomatología específica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el ciclo de cultivo 2010 se realizaron recorridos en parcelas comerciales de Chile para secado para obtener plantas de Chile que manifestaban las diferentes sintomatologías asociadas con el “amarillamiento del Chile”. El número de plantas colectadas en cada parcela fue variable. La sintomatología de cada planta colectada se registró y se clasificó en uno de los siguientes grupos de síntomas: Grupo I: Amarillamiento; Grupo II: Hoja pequeña y Grupo III: Yema grande.

Para detectar la presencia del BMCTV se tomaron 0.5 g de tejido foliar de cada una de las muestras analizadas; el tejido fue macerado en nitrógeno líquido para extraer el ADN total con CTAB al 4% (Dellaporta *et al.*, 1983). El BMCTV fue detectado por PCR usando los oligonucleótidos BMCTV CP4f (5'-CAG TAT CGA CCA GTT GTT T-3') y BMCTV CP6r (5'-CTC TTC GAA TAC GAT AAG TAG-3') (Creamer *et al.*, 2005), los cuales amplifican una porción del gen que codifica la proteína que forma la cubierta proteica. 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 Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 3 mM Cl<sub>2</sub>Mg. La reacción de PCR consistió en: 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 de PCR fue separada por electroforesis en geles de agarosa al 2%. El diagnóstico positivo de BMCTV es determinado por la presencia de un fragmento de 576 pares de bases. El ADN fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta en un equipo SIGMA T1201.

Para la detección de fitoplasmas se tomaron muestras de tejido sintomático, a las cuales se les extrajo el ADN total de acuerdo con la metodología propuesta por Weising *et al.* 1995. La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro JENWAY 6305, mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm. Además se realizó una electroforesis para determinar la integridad y calidad del ADN obtenido de todas las muestras. Para llevar a cabo el PCR anidado se utilizaron cebadores específicos para la detección de fitoplasmas con el fin de aumentar la especificidad y sensibilidad del ensayo. Se utilizaron pares de cebadores universales para amplificar secuencias del gen 16S rRNA de fitoplasmas propuestas por Smart *et al.*, (1996) y Gundersen y Lee (1996). Estos fueron R16F2n/R16R2 (5'- GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' / 5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') para la primera amplificación y P1/Tint (5'-

AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' / 5'-TCAGGC GTGTGCTCTAACCAGC-3' ) para la segunda amplificación de la PCR anidada.

Reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0,5 ml, el volumen de reacción total fue de 25 µl, y se formaron como sigue: 2,5 µl de ADN plantilla, 0,5 µl de cada cebador, 2,5 µl de cada dNTP, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,25µ l de Taq ADN Invitrogen polimerasa. Las PCR se realizaron en un termociclador de Applied Biosystems con el programa: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 min y 30 ciclos adicionales con el siguiente programa: 1 min de desnaturalización a 94°C: 1 min de hibridación a 55°C, 2 min de polimerización a 72°C, y una extensión final de 72°C durante 5 min. Productos de la PCR se fraccionaron en geles de agarosa 1% en 91 voltios durante 45 minutos, se tiñeron con bromuro de etidio (0,7 mg/ml) y se visualizó bajo luz ultravioleta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de Chile colectadas en parcelas comerciales se dividieron en tres grupos de acuerdo con los síntomas que presentaban; los síntomas característicos de cada grupo se presentan a continuación:

### Grupo I: Amarillamientos

Plantas que mostraban diversos grados de clorosis, enanismo, pérdida de estructuras reproductivas en la mayoría de los casos; algunas plantas podían mostrar frutos sin valor comercial (pequeños y deformes), hojas maduras rígidas y elongadas; las hojas jóvenes con venación púrpura. Ocasionalmente solo las partes más jóvenes de la planta mostraban síntomas de la enfermedad mientras que la primera parte de la planta permanecía asintomática y aún llegaba a producir frutos con valor comercial.

### Grupo II: Hoja pequeña

En la mayoría de los casos las plantas de Chile en este grupo presentaban una altura normal con clorosis ligera en los puntos de crecimiento, sin embargo, el síntoma distintivo era la proliferación de hojas y estructuras reproductivas en esos puntos de crecimiento; estas hojas eran de tamaño reducido y cloróticas; las flores y frutos pequeños abortan en pocos días. Usualmente las plantas

con esta sintomatología poseían una cantidad aceptable de frutos provenientes de las primeras floraciones.

#### Grupo III: Yema grande

La principal característica de esta sintomatología es la presencia de sépalos elongados y generalmente unidos entre sí que conservan su color verde y de donde toma el nombre esta sintomatología. En la mayoría de los casos el resto de la estructura floral desaparece, aunque en algunos casos se llega a formar entre los sépalos un pequeño fruto que conserva los pétalos adheridos. Este tipo de estructuras podía aparecer en cada bifurcación pero no siempre afectaba todas las ramas de la planta. Las hojas más jóvenes de este tipo de plantas mostraban una morfología alargada con una clorosis intervenal; los síntomas de yema grande se observaron en plantas con diferente altura que podían tener yemas grandes en la parte joven y frutos con valor comercial procedentes de las primeras floraciones. Algunas plantas con yemas grandes mostraban desarrollo de filodios, es decir los sépalos adquirían un aspecto foliar y de estas yemas emergía una pequeña continuación del pedúnculo que enseguida daba origen a otra yema grande que a su vez degeneraba en otro filodio.

#### Presencia de BMCTV y fitoplasmas

Se colectaron 407 muestras de Chile; el 63.4, 31.2 y 5.4% pertenecía a los tipos Ancho, Mirasol y Pasilla respectivamente. El 50.6, 23.6 y 25.8% de las muestras correspondían a los síntomas amarillamientos, hoja pequeña y yema grande respectivamente.

#### Grupo I: Amarillamientos

La presencia de BMCTV y fitoplasmas así como infecciones mezcladas de ambos patógenos fue detectada en 100, 20 y 20% respectivamente de las parcelas muestreadas. El porcentaje de infección de acuerdo con el número de plantas colectadas en cada parcela varió de 5.3 a 80% para BMCTV; en el caso de las dos parcelas con plantas infectadas solamente por fitoplasmas, el porcentaje de infección mostró una amplia variación; de 3.7 a 40.9%. Se detectaron infecciones mixtas (BMCTV y fitoplasmas) en solamente dos parcelas donde el porcentaje de detección osciló de 3.7 a 31.8% (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Frecuencia de detección del *Beet mild curly top virus*, fitoplasmas e infecciones mixtas en plantas de Chile con síntomas de amarillamiento.

Parcela	Tipo de Chile	Frecuencia de detección (%)		
		<i>Beet mild curly top virus</i>	Fitoplasmas	Infecciones mixtas
1	Mirasol	29.6	3.7	3.7
2	Mirasol	5.3	0.0	0.0
3	Mirasol	80.0	0.0	0.0
4	Pasilla	72.7	40.9	31.8
5	Ancho	40.9	0.0	0.0
6	Ancho	35.0	0.0	0.0
7	Ancho	27.3	0.0	0.0
8	Ancho	15.0	0,0	0.0
9	Ancho	20.0	0.0	0.0
10	Ancho	5.0	0.0	0.0

## Grupo II: Hoja pequeña

Las plantas analizadas en este grupo fueron obtenidas en seis parcelas comerciales: BMCTV fue detectado en al menos una planta de cada una de esas parcelas mientras que plantas infectadas con fitoplasmas se detectaron en solamente tres parcelas; las plantas infectadas con ambos patógenos se detectaron en solamente dos de las parcelas muestreadas. En este grupo de plantas el porcentaje de detección de BMCTV varió de 4.8 a 66.7% mientras que para fitoplasmas varió desde 4.8 hasta 20.0%. En las dos parcelas donde se detectaron plantas con infecciones mixtas el rango de detección varió de 5 a 11.1% (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Frecuencia de detección del *Beet mild curly top virus*, fitoplasmas e infecciones mixtas en plantas de Chile para secado que mostraban la sintomatología de hoja pequeña.

Parcela	Tipo de Chile	Frecuencia de detección (%)		
		<i>Beet mild curly top virus</i>	Fitoplasmas	Infecciones mixtas
1	Mirasol	50.0	20.0	5.0

2	Ancho	33.3	0.0	0.0
3	Ancho	66.7	11.1	11.1
4	Ancho	35.0	0.0	0.0
5	Ancho	9.5	4.8	0.0
6	Ancho	4.8	0.0	0.0

### Grupo III: Yema Grande

Se colectaron plantas con este tipo de daño en cinco parcelas comerciales de Chile; la presencia de BMCTV y fitoplasmas fueron detectados en tres y cuatro de esas parcelas respectivamente. La presencia de ambos patógenos en la misma muestra se detectó en solamente una de las parcelas muestreadas. El porcentaje de detección de BMCTV, fitoplasmas e infecciones mixtas en el total de muestras colectadas en estas cinco parcelas varió de 8.7 a 12.5, 13 a 37.5 y 8.3% respectivamente (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Frecuencia de detección del *Beet mild curly top virus*, fitoplasmas e infecciones mixtas en plantas de Chile para secado que mostraban sintomatología de yema grande.

Parcela	Tipo de Chile	Frecuencia de detección (%)		
		<i>Beet mild curly top virus</i>	Fitoplasmas	Infecciones mixtas
1	Mirasol	10.0	0.0	0.0
2	Mirasol	0.0	25.0	0.0
3	Ancho	0.0	18.2	0.0
4	Ancho	12.5	37.5	8.3
5	Ancho	8.7	13.0	0.0

Independientemente de la sintomatología, se detectó la presencia de BMCTV en 113 muestras (27.8%); de las cuales 6.7% pertenecían a plantas de Chile que mostraban el síntoma de amarillamientos; 30.1% correspondían a plantas de Chile que expresaban la sintomatología propia de Hoja pequeña y solamente 6.2% de las plantas colectadas mostraban las características de Yema grande. La detección de fitoplasmas, ocurrió en solamente 9.3% del total de plantas muestreadas,

sin embargo, 52.6% de las muestras positivas provenían de plantas que mostraban yemas grandes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Shaw *et al.*, (1993) y Randall *et al.*, (2009) respecto a la asociación entre este síntoma y la presencia de fitoplasmas en Chile y otros cultivos. En Guanajuato y Sinaloa, México, los síntomas asociados con la infección por fitoplasmas incluyen desarrollos jóvenes cloróticos, entrenudos cortos, escoba de bruja y hojas pequeñas (Santos-Cervantes *et al.*, 2008; Munyaneza *et al.*, 2009), sin embargo, la presencia de yemas grandes no ha sido mencionada.

Aunque la sintomatología y severidad de las enfermedades virales son afectadas por la cepa del virus, condiciones ambientales y edad del hospedero al momento de la infección, entre otros factores (Murphy y Warren, 2003), la descripción de síntomas provocados en plantas de Chile por la infección con BCTV según Creamer (2003) y Goldberg (1995) que incluye enanismo, follaje grueso y amarillo así como presencia reducida de frutos concuerda estrechamente con los síntomas descritos en el Grupo I. No obstante lo anterior, BMCTV no fue detectado en todas las muestras obtenidas de plantas que presentaban las características típicas de la enfermedad. Una posible explicación al reducido nivel de detección de BMCTV en plantas con síntomas típicos de la enfermedad es la ocurrencia potencial en el norte centro de otras variantes de este curtovirus que no fueron detectadas con los primers empleados en este trabajo.

Aunque el BMCTV y el agente causal de yema grande en otros países han sido reportados como transmitidos por la chicharrita (*Circulifer tenellus* Baker) (Shaw *et al.*, 1993; Creamer, 2003), no hay información sobre la transmisión simultánea de un curtovirus como el BMCTV y otro patógeno como los fitoplasmas por un espécimen de *C. tenellus*. La presencia de este insecto en el norte centro de México fue confirmada recientemente (Velásquez-Valle *et al.*, 2012); lo anterior resulta importante ya que el porcentaje de detección de infecciones mixtas alcanzó hasta 31.8% en plantas pertenecientes al Grupo I (amarillamientos) (Cuadro 1).

Los síntomas de hoja pequeña (Grupo II) reportados en este trabajo coinciden parcialmente con los reportados en los estados de Guanajuato y Sinaloa, Méx., (Santos-Cervantes *et al.*, 2008) donde solamente se menciona la proliferación de brotes y hojas pequeñas pero no se proporciona información adicional sobre otras características de las plantas infectadas como su altura, coloración o aspecto del follaje o presencia/ausencia de estructuras reproductivas que permitiera determinar si por lo menos la sintomatología es común a estos cultivos en algunas regiones de México.

## LITERATURA CITADA

- Creamer, R. 2003. *Beet curly top virus*. p. 26-27. En: Compendium of pepper diseases. K. Pernezny, P.D. Roberts, J.F. Murphy, and N.P. Goldberg (eds). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 63 p.
- Creamer, R., Hubble, H. and Lewis, A. 2005. Curtovirus infection of chile pepper in New Mexico. *Plant Dis.* 89:480-486.
- Dellaporta, S.J., Wood, J. J. and Hicks. J. B. 1983. A plant DNA mini preparation: versión II. *Plant Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- Del Serrone, P., Marzachi, C., Bragaloni, M. and P. Galeffi. 2001. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathol. Med.* 40:137-142.
- Flores, E. 1972. Observaciones y pruebas sobre la enfermedad "cáliz gigante" del tomate en el estado de Sao Paulo, Brasil. *Agron. Trop.* 22:187-204.
- Fraire, S., Recendez-Alvarado, M., Carrillo-Tripp, J., Rivera-Bustamante, R., and 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. *Phytopathol.* 101:S54.
- Goldberg, N. P. 1995. Chile pepper diseases. Agricultural Experiment Station. Circular 549. New Mexico State University. Las Cruces, NM. 20 p.
- Gundersen, D. and Lee, I. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Med.* 35:144-151
- Munyanza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzón-Tiznado, J. A. and Cárdenas-Valenzuela, O. G. 2009. First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in pepper plants in Mexico. *Plant Dis.* 93:1076.
- Murphy, J. F. and Warren, C. E. 2003. Diseases caused by virus. p. 23-24. En: Compendium of pepper diseases. K. Pernezny, P.D. Roberts, J.F. Murphy, and N.P. Goldberg (eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 63 p.
- Randall, J. J., Bosland, P. W. and Hanson, S. F. 2009. Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of chile peppers. *Plant Dis.* 93:968.
- Santos-Cervantes, M. E., Chavez-Medina, J. A., Mendez-Lozano, J. and Leyva-López, N. E. 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Dis.* 92:1007-1011.

- Smart, C., Schneider, D. B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U. Lorenz, K. H., Seemuller, E. and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers base don sequences of the 16S-23s rRNA spacer región. Appl. and Environm. Microbiol. 62:2988-2993.
- Shaw, M. E., Kirkpatrick, B. C. and Golino, D. A. 1993. The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. Plant Dis. 77:290-295.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. y Macías-Valdez, L. M. 2003. Reacción de líneas avanzadas de chile (*Capsicum annuum* L.) provenientes de Zacatecas a enfermedades comunes en Aguascalientes. Rev. Mex. Fitopatol. 21:71-74.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. and Creamer, R. 2008. First report of *Beet mild curly top virus* infection of chili pepper in north central Mexico. Plant Dis. 96:650.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R. y Mena-Covarrubias, J. 2012a. Incidencia y sintomatología de cinco virus en parcelas comerciales de chile seco en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México. Rev. Mex. Cien. Agríc. 3:381-390.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., Amador-Ramírez, M. D., Medina-Aguilar, M. M. y Medina-García, G. 2012b. Presencia de *Circulifer tenellus* Baker y *Beet mild curly top virus* en maleza durante el invierno en el centro norte de México. Rev. Mex. de Cienc. Agríc. 3:813-819.
- Vellios, E. and Lioliopoulou, F. 2009. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. Bull. Insectol. 60:167-158.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K, and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting plant and fungi. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 134 p.