

ISBN: 970-27-0770-6

## DIAGNOSTICO E INCIDENCIA DE GEMINIVIRUS EN ATOYAC Y SAYULA, JALISCO

**Alejandra Cacho<sup>1\*</sup>**, Gil Virgen-Calleros<sup>1</sup>, Ángel Gabriel Alpuche-Solís<sup>2</sup>, Artemiza Bernal-Alcocer<sup>1\*</sup> y Dalia Margarita López-Zendejas<sup>1\*</sup> Universidad de Guadalajara. CUCBA. km 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco, CP. 45110. <sup>2</sup>Instituto Potosino de Investigación, Ciencia y Tecnología. Departamento de Biología Molecular. Camino a la Presa San José #2055 Col. Lomas 4ta. Secc. San Luis Potosí. C. P. 78216: Correspondencia: gvirgen@cucba.udg.mx

### Introducción

El impacto económico y social que tiene la producción de hortalizas en el ámbito nacional e internacional hace de esta actividad una fuente importante en la generación de empleo y divisas. En la zona sur del Estado de Jalisco comprendida por los municipios de Atoyac, Sayula, Teocuitlán y Zacoalco de Torres, ha tenido un importante crecimiento en la superficie de siembra destacando entre estos cultivos, jitomate, chile, ya que en el 2001 se sembraron 2,489 hectáreas de Jitomate y 2,976 de Chile en el Estado de esta, el 50 % de la superficie se sembró en el municipio de Sayula. Sin embargo, en el 2003 la superficie de siembra, se redujo a 834 has para Jitomate y 461 has para Chile en todo el Estado (SAGARPA, 2002, 2004); desapareciendo prácticamente esta región productora debido a que la producción tanto de jitomate como chile se han visto afectadas de forma severa por enfermedades causadas por virus, estos se han convertido en el principal factor de reducción en la producción de los cultivos antes señalados, ya que son difíciles de controlar provocando con ello grandes pérdidas económicas; además su incidencia y severidad varían entre estaciones debido a la interacción compleja que existe entre el patógeno, la planta, el vector, la fuente del virus, y el ambiente; lo que resulta en pérdidas sustanciales del cultivo (Jones, 2001). Con lo anteriormente señalado los objetivos del presente proyecto incluyen:

1. Identificación de geminivirus que inciden en chile y jitomate en los municipios de Atoyac y Sayula.
2. Determinación de la incidencia de los principales geminivirus en jitomate y chile en los municipios de Atoyac y Sayula.

### Materiales y métodos

**Colecta de muestras:** Se realizó una colecta de plantas enfermas, esta recolección se llevó a cabo mediante la representación de diferentes síntomas, los cuales podían ser representantes de geminivirus. Los síntomas de la infección por geminivirus varían de acuerdo al virus y a la cepa, el cultivar, la edad de la planta al momento de la infección y las condiciones ambientales. Los síntomas pueden ser combinaciones de: mosaico amarillo brillante, moteados cloróticos, márgenes foliares cloróticos, rizado de las hojas,

deformación de las hojas, arrugas o pliegues en las hojas, reducción en el tamaño de las hojas, crecimiento menor de las plantas infectadas, y abscisión de la flor.

**Diagnostico e identificación por PCR:** Para la separación del virus, se tomaron porciones de hojas, con síntomas del moteado amarillo, mosaico amarillo brillante, moteados cloróticos, márgenes foliares cloróticos, rizado de las hojas, deformación de las hojas, arrugas o pliegues en las hojas, reducción en el tamaño de las hojas, crecimiento menor de las plantas infectadas y dado que los síntomas de origen viral pueden ser causados por geminivirus, virus cuyo genoma está constituido de ADN, se prosiguió a realizar la extracción de ADN. La prueba de la PCR se realizó únicamente con el ADN de las muestras que mostraron síntomas mencionados. La amplificación del ADN viral por la PCR se hizo con los oligonucleótidos CP/GUS amplifican un segmento de 650pb del componente A de geminivirus y que incluye la región común (RC) y parte del gen de la proteína de la cápside (CP). La mezcla final de reacción de la PCR (50 l volumen total) contenía:

- Buffer Taq pol 10x
- MgCl<sub>2</sub>
- dNTP 's
- Oligo A (Cp-Mot-Ban)
- Oligo B (Ali-Mot-Gus)
- Taq pol purificada
- Agua mili Q
- Muestra de ADN

La secuencia de los oligos utilizados son los siguientes:

- Oligo A (Cp-Mot-Ban):  
5' CACGGATCCGATTGRACCTTACANGGNCCTTCACAACC 3'
- Oligo B (Ali-Mot-Gus):  
5' GAGTCTAGATGGATANGTRAGGAAATARTTCTTGGC 3'

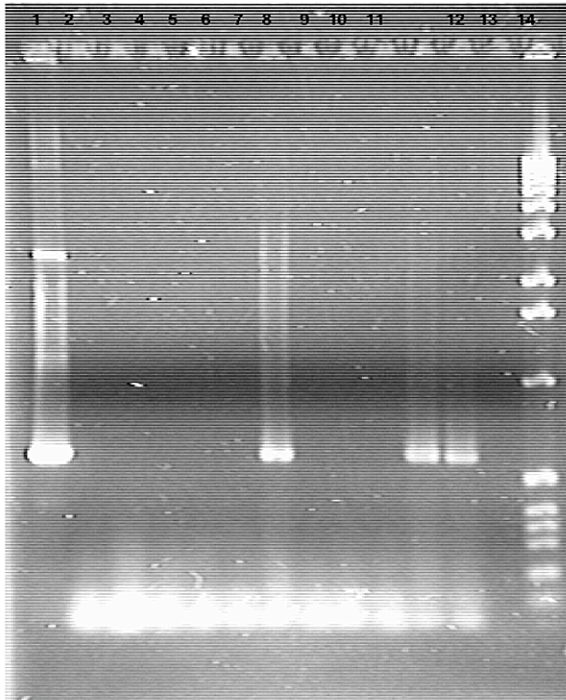
Después de transcurridos el tiempo de amplificación, se realizaba una electroforesis, por medio de geles de agarosa al 1.5%, estos geles se dejaban correr a un voltaje de 70v por un tiempo aproximado de dos horas, al paso de estas dos horas se tiñen con Bromuro de Etidio por 30 minutos, al concluir el tiempo se observaban a través de luz ultravioleta.

## Resultados

En los recorridos realizados se recolectaron un total de 46 plantas enfermas, de las cuales 21 plantas fueron de jitomate y las 25 restantes fueron plantas de chile (jalapeño, serrano, pimiento). Algunas de las plantas enfermas presentaban la combinación de varios síntomas causados por virosis. Los resultados del análisis de geminivirus mostraron que no todas las muestras dieron positivo para este grupo de virus (figura 1)

**Figura 1.** Resultado de las pruebas de identificación de geminivirus en un gel de poliacrilamida

## DETECCION DE GEMINIVIRUS



- 1 CONTROL POSITIVO
- 2 MUESTRA No. 1 Chile jalapeño
- 3 MUESTRA No.2 Chile jalapeño
- 4 MUESTRA No. 3 Chile jalapeño
- 5 MUESTRA No. 4 Chile jalapeño
- 6 MUESTRA No. 5 Chile jalapeño
- 7 **MUESTRA No. 6 Chile jalapeño**
- 8 MUESTRA No. 7 Chile jalapeño
- 9 MUESTRA No. 8 Chile jalapeño
- 10 MUESTRA No. 9 Chile jalapeño
- 11 **MUESTRA No. 10 Chile serrano**
- 12 **MUESTRA No. 11 Jitomate**
- 13 MUESTRA No. 12 Jitomate
- 14 MARCADOR

Mezcla maestra para la PCR -vol 50µl

Buffer taq pol 10x 5 µl

MgCl<sub>2</sub> (25mM) 3 µl

dNTPs (10mM) 1 µl

Oligo "A" (CP-Mot-Bam 1 µg/µl) 1.5 µl

Oligo "B" (Ali-Mot-Gus 1 µg/µl) 1.5 µl

Taq pol purificada 2.5 µl

Agua "Q" 34.5µl

Muestra de AND 1 µl

Por otra parte en el cuadro 1 podemos observar que para las plantas de chile y jitomate los síntomas con mayor porcentaje fueron clorosis y manchas tanto en Atoyac, como Sayula.

Sin embargo cuando analizamos las muestras que fueron clasificadas por síntomas, al asociar los síntomas al virus aun en el mismo cultivo este no corresponde (Cuadro 2) al virus identificado Pepper huasteco virus (PHV) para jitomate y chile, cabe mencionar que los síntomas encontrados en menor porcentaje o con menor incidencia como acucharamiento, marchites, el geminivirus no fue identificado. Ascencio *et al*, (1999) menciona el estudio de un modelo de interacción entre geminivirus, virus huasteco del chile (PHV) y del virus texano del chile (TPV), conocida como Rizado amarillo del chile en Tamaulipas (México).

**Cuadro 1.** Grupos de síntomas y porcentajes de plantas dentro de cada categoría de síntoma.

CULTIVO	SINTOMA	PORCENTAJE	MUNICIPIO
<b>Chile</b>	Clorosis	54.35%	Atoyac, Sayula
	Manchas	39.13%	Atoyac, Sayula
	Acucharamiento	4.35%	Atoyac, Sayula
	Marchitamiento	2.17%	Atoyac
<b>Jitomate</b>	Clorosis	42.86%	Atoyac, Sayula
	Acucharamiento	2.04%	Atoyac
	Manchas	38.78%	Atoyac, Sayula
	Quebradizas	2.04%	Atoyac
	Marchitamiento	6.12%	Atoyac, Sayula
	Enchinamiento	8.16%	Atoyac, Sayula

Donde encontraron que el PHV produce síntomas más leves que TPV, mientras que el TPV solo, es un virus muy devastador. Inocularon juntos los dos virus y la presencia del PVH redujo la severidad del TPV atenuando sus síntomas. También han observado en varios casos que las muestras analizadas presentan hibridación contra sondas específicas de al menos dos geminivirus diferentes (PVH y TPV), hibridando también algunos de ellos con una sonda general, sin mostrar señal específica de estos virus, lo cual indica la presencia de geminivirus no identificados.

Adicionalmente también se han reportado Curtovirus específicamente el virus punta rizada de la remolacha (*Beet curly top virus*) BCTV en Nuevo México, atacando al cultivo de chile, este grupo es transmitido por chicharritas del género *Circulifer tenellus* (Creamer, *et al*, 2005). Este insecto puede estar presente en la zona de estudio, por lo cual existe la posibilidad de que aquellas muestras no positivas para geminivirus pertenezcan a este grupo.

**Cuadro 2.** Grupos de síntomas y virus encontrados en el municipio de Atoyac

CULTIVO	SINTOMA	VIRUS	No. PLANTAS
<b>Chile</b>	Clorosis	PHV Tamaulipas	3
	Manchas	PHV Tamaulipas	2
	Acucharamiento	PHV Tamaulipas	1
	Marchitamiento	PHV Tamaulipas	1
<b>Chile</b>	Clorosis	Geminivirus no específico	2
	Manchas	Geminivirus no específico	2
<b>Jitomate</b>	Clorosis	PHV Tamaulipas	2
	Acucharamiento	PHV Tamaulipas	1
	Marchites	PHV Tamaulipas	1
	Manchas	PHV Tamaulipas	1
<b>Jitomate</b>	Clorosis	Geminivirus no específico	2
	Manchas	Geminivirus no específico	1
	Marchites	Geminivirus no específico	1

En el municipio de Sayula la mayoría de las plantas de jitomate y chile analizadas fueron positivas para geminivirus no identificado.

**Cuadro 3.** Grupo de síntomas y virus encontrados en el municipio de Sayula

CULTIVO	SINTOMA	VIRUS	No. PLANTAS
<b>Chile</b>	Clorosis	Geminivirus no identificado	3
	Manchas	Geminivirus no identificado	3
<b>Chile</b>	Clorosis	PHV Sinaloa	3
	Manchas	PHV Sinaloa	1
	Acucharamiento	PHV Sinaloa	1
<b>Chile</b>	Clorosis	PHV Tamaulipas	1
	Manchas	PHV Tamaulipas	1
<b>jitomate</b>	Clorosis	Geminivirus no identificado	7
	Manchas	Geminivirus no identificado	6
	Marchites	Geminivirus no identificado	3
	Enchinamiento	Geminivirus no identificado	1

La especificación de PHV Tamaulipas y PHV Sinaloa se logro a través de la enzima Hinc II con la cual podemos distinguir uno de otro, ya que PHV Sinaloa tiene un sitio de corte y PHV Tamaulipas no. Con las muestras restantes no se logro una especificación ya que no se contó con una buena concentración de ADN para llevar a cabo la digestión con dicha enzima por lo cual solo podemos concluir que dichas muestras son positivas para geminivirus.

### Literatura citada

- Ascencio-Ibáñez J. T., Monsalve-Fonnera Z. I., Pruna-Camacho M. B., Díaz-Plaza R., y Rivera-Bustamante R. F., 1999. Los Geminivirus. Revista Mexicana de Fitopatología 17(2): 113-127.
- Cordero M., Ramos L. P., Hernández L., Fernández I. A., Ecemendía L. A., Peral R., González G., García D. Valdés S. Estévez y Hernández K. 2003. Identification of *Tomato Mottle Taino* begomovirus strains in cuban potato fields. Phytoparasitica. 31(5):478-489.
- Creamer, R., Hubble, H y Lewis A. 2005. Cutovirus infection of chile pepper in New Mexico. Plant Disease 89: 480-486.
- Garzón-Tiznado, J. A., Acosta-García, G., Torres-Pacheco, I, Gonzáles-Chavira, M., Rivera-Bustamante, R. F., Maya-Hernández, V. y Guevara-González, G. R. 2002. Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (PHV), texano del chile variante tamaulipas (TPV-T), y chino del tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 45-52.
- Jones, Stall, Zitter. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Ed. Mundi Prensa.