



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

**“Movilidad de los geminivirus
PHYVV y *PepGMV* en su vector
Bemisia tabaci y en su hospedero
Capsicum annuum”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GABRIELA MEDINA RAMOS

TUTOR PRINCIPAL: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARÁZ
COMITÉ TUTOR: DR. IRINEO TORRES PACHECO
DR. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

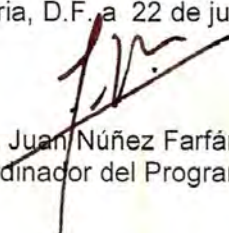
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de junio de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **MEDINA RAMOS GABRIELA** con número de cuenta **504008618** con la tesis titulada: "**Movilidad de los geminivirus PHYVV y PepGMV en su vector *Bemisia tabaci* y en su hospedero *Capsicum annuum*.**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ:**

Presidente:	DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Vocal:	DR. IRINEO TORRES PACHECO
Vocal:	DR. RAFEL BUJANOS MUÑIZ
Vocal:	DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO
Secretario:	DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
Suplente:	DR. GERARDO ARGÜELLO ASTORGA
Suplente	DR. RAMON GERARDO GUEVARA GONZALEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de junio de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por la oportunidad para realizar mi formación como investigador. A todo su personal, por su gran calidad profesional y humana.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (No. 181374) otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM), por la beca otorgada.

A la DGEP-UNAM, por el apoyo otorgado para la realización de Estancia de Investigación en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Bajío.

A los miembros de mi Comité Tutor:

Al Dr. Irineo Torres Pacheco, por el sinfín de oportunidades que me regaló al trabajar a su lado: la elección, proyección y realización de mi investigación. Con absoluta libertad y apoyo incondicional para mi formación profesional como investigador. Mil Gracias por su confianza en mí como profesionista.

Al Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz, por el apoyo incondicional durante mis estudios de doctorado. Por su confianza, guía y enlace con la UNAM. Mi agradecimiento permanente.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González, por su guía y apoyo sin restricciones a lo largo del trabajo de investigación. Gracias por su confianza.

El presente trabajo fue financiado por Fondos Mixtos Guanajuato (FOMIX-GTO. GTO-2003-CO2-1154) como parte del proyecto de investigación “Factores que influyen la transmisión por mosquita blanca de geminivirus en Chile y jitomate” bajo la dirección del Dr. Irineo Torres Pacheco.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme tener el orgullo ser parte de la máxima casa de estudios del país y una de las mejores universidades a nivel mundial.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Campo Experimental Bajío), por permitirme trabajar en sus espacios y ser parte de la labor de investigación, que tan acertadamente lleva a cabo.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por ser un lugar de aprendizaje durante mi formación como investigador.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Zacatenco del Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo y colaboración otorgado para la realización de parte de mi trabajo de investigación. Con un agradecimiento especial a los **Doctores Beatriz Xoconostle Cázares y Roberto Ruiz Medrano**, por sus enseñanzas y apoyo técnico.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado:

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa, Dr. Roberto Ruiz Medrano, Dr. Gerardo Argüello Astorga y Dr. Rafael Bujanos Muñoz, por su disposición para formar parte de este comité y sus acertadas sugerencias para mi trabajo.

A los investigadores, personal y estudiantes de la Unidad de Biotecnología de INIFAP-Campo Experimental Bajío, por su compañerismo.

A los investigadores, **Dr. Rafael Bujanos y Biol. Antonio Marín Jarillo** y a su **equipo de trabajo**, del **Laboratorio de Entomología del INIFAP-Campo Experimental Bajío**, por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

A mis estudiantes de licenciatura: **Nancy Tierranegra, Helen Hernández, Christian Mendoza, Eliécer González y Laura Flores**; espero que hayan aprendido tanto de mí como yo de ustedes. A la **Sra. Tere Martínez**, del INIFAP-CIRCE, por su apoyo invaluable durante mis estudios de doctorado.

A toda la gente de la **Unidad de Posgrado**, M.C. Lilia Jiménez, M.C. Lilia Espinoza, Lulú, M.C. Monserrat y al Dr. Ernesto Armando Rodríguez, por su apoyo durante mi estancia doctoral.

A todos mis **Maestros**, por regalarme su tiempo y esfuerzo para sembrar en mí sus valiosos conocimientos. Ustedes son parte fundamental de mi vida profesional.

A mis amigas, **Liz Pérez Mora y Helen Hernández**, por su cariño y apoyo invaluable, espero contar con ustedes siempre.

Las quiero.

A la **Universidad Politécnica de Guanajuato**, mi centro de trabajo, a sus autoridades y a mis compañeros por su apoyo para la culminación de mis trámites de titulación. En especial a los **M.C. Salvador Lecona, M.C. Daniel Jiménez, M.C. Elizabeth Pérez Mora, M.C. Carmela Domínguez Campos y M.C. Guillermo Arzate Martínez**.

Espero verlos muy pronto en este trance en el que estoy ahora.

A las **familias Medina Jaramillo, Stanford Medina, Medina Serrano y Reyes Medina, a todos los “primos y tíos”** por hacer mi estancia en la Ciudad de México más cálida. Por abrirme las puertas de sus hogares, por su aprecio y sobre todo por alimentar mi cuerpo, mi alma y mi espíritu.

Con todo mi cariño y respeto.

DEDICATORIAS

A ti, **Dios**, a quien nunca he visto, pero que percibo en cada paso que doy. Por la hermosa familia a la que me enviaste y en la que crecí tan feliz; por la hermosa familia que me has permitido formar y con la cual soy inmensamente feliz; por las oportunidades de desarrollo profesional que he tenido, en especial por esta. *Siempre si voy a ser Doctora.*

Creo que no puedo pedirte más.

A mis padres, **Salvador y Josefina**, por su trabajo incansable para hacer de nosotros personas de bien. A **Papá**, porque ante todas las adversidades ha demostrado fortaleza y no ha disminuido su nobleza. Por enseñarme con sus acciones que es el camino del trabajo el método para triunfar. A **Mamá**, por su amistad y complicidad, por su capacidad y sencillez para dar lecciones de vida.

Por su amor y apoyo incondicional, no sólo para conmigo sino también para con mi esposo y mi hija.

A mis hermanos, **Maura, Salvador, Ulises, Javier y Oscar**, por la hermosa vida familiar compartida. Por sus enseñanzas: seguridad en mí, ambición, disciplina, humildad y diversión.

Porque en la persona que soy está cada uno de ustedes.

A mi familia extendida: **Miriam, Valeria y Rebeca, Mayda, Marcos y Kesmareke**. Por su cariño, los hermosos momentos compartidos, el apoyo y la confianza en mi persona y “mis investigaciones”

A mi **Abuelita Carmen, a mis tíos y primos**, en especial a mis tíos-padrinos **Lety Ramos y José Luis Nieto**, por su apoyo, cariño, confianza y los inolvidables momentos que vivimos. Ojalá esta historia continúe.

**A ti, Ana Ximena, el mejor resultado del experimento de
amor que vivo con tu padre.**

En muy poco tiempo te has convertido en el motor principal
de mi vida.

Cuando empecé esta etapa profesional no imagine mi vida
contigo hija, ahora que la culmino ya no la puedo imaginar sin ti.
Me has llenado de felicidad y enseñado cosas tan hermosas. Gracias
por entender a mamá.

Te amo.

A ti Enrique, por quererme de todas las maneras.

Por ser mi “colaborador” en el exitoso Proyecto Ana Ximena.

Por tu apoyo incondicional para realizar mi doctorado, aún cuando significó algunas veces estar separados, hacerla de chofer, maletero, acompañante, etc. Por tu apoyo a mi familia, que nunca podré recompensar.

Por creer en mí como persona, como esposa, como madre, como profesionalista y apoyar siempre todos los proyectos que emprendo.

Por tu amor que ha perdurado a través del tiempo y la distancia.

Hoy te reafirmo que sigues estando bien correspondido: **Te amo.**

**ÍNDICE GENERAL**

Lista de figuras	i
Lista de tablas	iii
Resumen / Abstract	v/vii
Introducción	1
Capítulo I. Transmisión simple y en mezcla de los geminivirus <i>PHYVV</i> y <i>PepGMV</i> a plantas de chile <i>Capsicum annuum</i> por <i>Bemisia tabaci</i> .	24
Capítulo II. Análisis de la acumulación de los geminivirus <i>PHYVV</i> y <i>PepGMV</i> en plantas de chile y en el vector <i>Bemisia tabaci</i> .	47
Capítulo III. Efecto de la temperatura en la concentración viral y severidad de síntomas de <i>PHYVV</i> y <i>PepGMV</i> en plantas de chile.	67
Capítulo IV. Localización de los geminivirus <i>PHYVV</i> y <i>PepGMV</i> en su hospedero <i>Capsicum annuum</i> y en su vector <i>Bemisia tabaci</i> .	83
Discusión	100
Conclusiones	105
Anexos	106

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1. Diferentes especies de chiles cultivadas en México	1
Figura 2. Síntomas causados por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de chile y jitomate en el estado de Sinaloa, México	3
Figura 3. Micrografía electrónica de partículas geminivirales	4
Figura 4. Organización Genómica de los Geminivirus	6
Figura 5. Mosquita blanca, <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius	12
Figura 6. Cajas de reproducción de mosquita blanca	27
Figura 7. Cajas de reproducción de mosquita blanca	30
Figura 8. Productos de PCR obtenidos de extractos de DNA de mosquita blanca (MB) y de plantas usadas a través de varias transferencias generacionales	33
Figura 9. Detección de PHV en plantas infectadas con 1 mosca blanca	34
Figura 10. Detección de PHYVV en plantas inoculadas con el vector expuesto a diferentes periodos de adquisición	35



	Página
Figura 11. Detección de PHYVV en plantas expuestas a diferentes IAP's con el vector	36
Figura 12. Detección de PepGMV en plantas inoculadas con el vector expuesto a diferentes periodos de adquisición	37
Figura 13. Detección de PHYVV y PepGMV en planta y vector con infecciones mixtas	38
Figura 14. Detección por PCR de PHYVV y PepGMV en plantas usadas como fuente de virus, y en plantas y mosquitas libres de virus	71
Figura 15. Detección de geminivirus adquiridos por mosquita blanca	72
Figura 16. Detección de geminivirus en plantas inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas en infección simple o en mezcla	73
Figura 17. Análisis de Marcaje de sondas para hibridación	92
Figura 18. Procesamiento del tejido para Hibridación <i>in situ</i>	93
Figura 19. Hibridación <i>in situ</i> de tejido de plantas de chile infectadas de forma mixta con PHYVV y PepGMV por el vector <i>B. tabaco</i>	94
Figura 20. Hibridación <i>in situ</i> de tejido de insecto con periodo de adquisición-alimentación de 48 horas	95

**LISTA DE TABLAS**

	Página
Tabla 1. Clasificación de geminivirus	5
Tabla 2. Tipos de moscas blancas y sus plantas hospederas	11
Tabla 3. Elementos del proceso de la limpieza y multiplicación de la mosquita blanca	32
Tabla 4. Efectos de los Periodos de Acceso a la Adquisición- alimentación (AAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PHYVV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca	35
Tabla 5. Efectos de los diferentes Periodos de Acceso a la Inoculación (transmisión)- alimentación (IAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PHYVV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca	36
Tabla 6. Efectos de los Periodos de Acceso a la Adquisición- alimentación (AAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PepGMV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca	37
Tabla 7. Efecto de diferentes tipos de plantas fuentes de inóculo en la incidencia de infección mixta por mosquita blanca.	39
Tabla 8. Efecto de la densidad de vector (carga viral) en la incidencia* de infección por PHYVV y PepGMV a plantas en Chile cv. Sonora Anaheim transmitidos por mosca blanca.	55



	Página
Tabla 9. Efecto de la densidad de vector (carga viral) en la severidad de infección por PHYVV, PepGMV y la mezcla de ambos, a plantas de chile cv. Sonora Anaheim transmitidos por mosca blanca.	56
Tabla 10. Cuantificación de la carga viral de PHYVV en plantas en chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca.	57
Tabla 11. Cuantificación de la concentración viral de PepGMV en plantas en chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca.	58
Tabla 12. Cuantificación de la concentración viral de PHYVV y PepGMV en plantas en chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca a los 30 días post-inoculación	58
Tabla 13. Cuantificación viral en mosca blanca	59
Tabla 14. Efecto de la temperatura de incubación en la severidad en plantas de chile inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas con geminivirus	73
Tabla 15. Efecto de la temperatura de incubación en la incidencia viral en plantas de chile inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas	75
Tabla 16. Efecto de la temperatura en la concentración viral en infecciones simples y en mezcla de plantas de chile.	76
Tabla 17. Características de transmisión y periodos de transmisión por insecto.	84



RESUMEN

El chile (*Capsicum* spp.) es la principal hortaliza sembrada en México y presenta frecuentemente, entre otros, problemas derivados de enfermedades de índole geminiviral, destacando las ocasionadas en forma mixta por el virus huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper huasteco yellow vein*, PHYVV) y el virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic*, PepGMV).

En este trabajo se investigó la capacidad de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) de adquirir y transmitir de manera simultánea a los geminivirus PHYVV y PepGMV por su vector a plantas de chile (*Capsicum annuum*). Se obtuvo información relativa al efecto de factores involucrados en la interacción virus-planta, tales como el número de vectores por planta (densidad de vector), periodo de acceso a la adquisición alimentación (AAP), periodo de acceso a la inoculación (transmisión) alimentación (IAP), temperatura de adquisición-transmisión, fuentes virales (plantas infectadas) en infecciones sencillas y mixtas. Las variables de respuesta fueron: severidad (nivel de daño), incidencia (porcentaje de infección) y concentración viral. Además, se localizaron los sitios de acumulación de virus tanto en el vector como en la planta hospedera.

Los resultados de nuestros ensayos de transmisión sugieren que una sola mosquita blanca virulífera es suficiente para infectar con PHYVV, PepGMV o la mezcla de ambos, a plantas de chile. De igual forma, que un AAP de 1 hora fue suficiente para la adquisición de PHYVV y PepGMV por el vector. Quedó demostrado que se requiere un IAP mínimo de 48 horas para que el vector pueda transmitir esos geminivirus a la planta.

En los ensayos de transmisión mixta de PHYVV y PepGMV, se determinó que una mosquita blanca es capaz de adquirir y transmitir ambos geminivirus simultáneamente.



Por otra parte, en la infección mixta, se observó que PHYVV favorece la adquisición y transmisión de PepGMV y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile. Sin embargo, cuando las fuentes de inóculo viral están separadas, la eficiencia de adquisición y transmisión de PepGMV se reduce.

Para la transmisión de geminivirus PHYVV, PepGMV o la mezcla de ambos virus, el uso de uno o más vectores no tiene un impacto aparente en la incidencia, pero sí en la severidad de la enfermedad; además se mostró que a partir de una densidad de vectores de 8, la severidad de los síntomas de la infección se estabiliza.

Los resultados obtenidos en los ensayos de temperatura sugieren que una temperatura de 22°C promueve la severidad de la infección en plantas de Chile c.v. Sonora Anaheim, mientras que temperaturas bajas (8 °C) retardan el aumento en la concentración viral.

Al localizarse PHYVV en el floema y los tubos cribosos de la planta hospedera se deduce que esto permite una movilidad mayor a este virus. En contraste PepGMV, restringido a células del parénquima, tiene una movilidad menor, lo cual dificulta su dispersión. La localización de los sitios de acumulación viral dentro del vector confirman que los geminivirus son persistentes y se incorporan al sistema circulatorio del insecto, en donde todo indica que es necesario que se lleve a cabo alguna forma de procesamiento para que la transmisión al hospedero se pueda realizar.



ABSTRACT

Pepper chilli (*Capsicum annuum* L.) is the first vegetable sown in Mexico and frequently shows derived problems from diseases of geminiviral origin, standing out the ones generated a mixed way by the *Pepper huasteco yellow vein* (PHYVV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV).

It was researched the whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) capacity to acquire and transmit at the same time, the geminiviruses PHYVV and PepGMV through its vector to the pepper plants. Information was obtained related to the effect of the involved elements on the virus-plant interaction, such as the number of vectors per plant (vector's density), access period to the feeding acquisition (APP), Access period to inoculation, (Transmission) feeding (IAP), Acquisition-transmission temperature, Viral sources, (Infected plants) in both simple and mixed infections. The response variables were: Severity (level of damage), impact (infection percentage) and viral concentration. Also, the spots of accumulation of virus were located, both in the vector and the host plant.

The results of our transmission essays suggest that only one whitefly with the disease is enough to infect the pepper plants with PHYVV, PepGMV or the mix of both. Likewise, that an AAP of one hour was enough to the acquisition of PHYVV and PepGMV through the vector. It was stated and demonstrated that it is required a 48 hours minimum IAP so the vector could transmit those geminiviruses to the plant.

In the mix transmission essays of PHYVV and PepGMV, it was determined that a whitefly is able to acquire and transmit both geminiviruses simultaneously.



On the other hand, in the mixed infection, it was observed that PHYVV favors the acquisition and transmission of PepGMV, and thoroughly the dispersion of this virus in the Pepper plants. However, when the sources of viral inoculation are separated, the efficiency of acquisition and transmission of PepGMV is reduced.

To the transmission of geminiviruses PHYVV, PepGMV or the mix of both viruses, the use of one or more vectors do not have an apparent impact on the incidence, but it does in the severity of the disease; also, it was shown that starting from a vector density of 8, the severity of the symptoms of the infection gets stabilized.

The obtained results on the essays of temperature suggest that a temperature of 22 °C promotes the severity of the infection in the Pepper plants c.v. Sonora Anaheim, while low temperatures (8°C) delay the increase in the viral concentration.

When PHYVV is located at the floema and the cribosos tubes of the host plant, is found out that this allows a greater motility to this virus. In contrast PepGMV, restricted to cells of the parenquima, has a lesser motility, which makes more difficult its dispersion. The location of the sites of viral accumulation within the vector confirm that the geminiviruses are persistent and that they get incorporated to the circulatory system of the insect, where everything indicates that is necessary to develop any processing form so the transmission to the host could be done.



INTRODUCCIÓN

El cultivo del chile.

El género *Capsicum*, tiene como centro de origen al Sur de México y Centroamérica con 32 especies endémicas (Hunziker, 1979). En México el chile ha sido cultivado desde tiempos pre-hispánicos, y junto con el maíz, el frijol y la calabaza constituyeron la base de la alimentación de las culturas de Mesoamérica, donde fue domesticado (<http://www.agroenlinea.com>).

Las principales especies cultivadas en México son: *Capsicum baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*. Esta última es la más importante y agrupa a la mayor variedad de chiles. En la figura 1 se muestran las diferentes especies de chiles que se consumen en México.



Figura 1. Diferentes especies de chiles cultivadas en México.

Desde 1993, la producción mundial de chiles ha tenido un crecimiento del 48% de la superficie y se ha duplicado los volúmenes de producción. Este aumento en la producción de chile se debe a la creciente demanda de este producto en sus diversas presentaciones como son, frescos, secos y procesados.



Según datos de la FAO en 2006, la superficie mundial sembrada de chiles asciende a 1'696, 891 hectáreas, con una producción de 25'015, 498 toneladas. De 1993 a la fecha se observa un incremento del 40% en los rendimientos unitarios, debido al uso de nuevas tecnologías, quedando en un promedio de 14.74 ton/ha.

China es el país que presenta una mayor participación en la producción de chiles. Su superficie sembrada para el año 2006 fue de 612, 800 hectáreas, lo que representa un 36% de la superficie sembrada a nivel mundial, con una producción de 12'531,000 ton, esto es mas de la mitad de la producción mundial de chiles al año FAOSTAT, 2006).

El género *Capsicum* es la principal hortaliza sembrada en México. Nuestro país ocupa el segundo lugar mundial en volumen de producción y el tercero en superficie cosechada, con 1'853, 610 ton y 140,693 ha, participando con el 7% de la producción mundial en ton (FAOSTAT, 2006). La producción de chile verde en México se ha ido incrementando a una tasa de crecimiento anual de 2.29 % (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx> 2006).

Problemática del cultivo del chile.

México es el país productor de chile con mayor diversidad genética, pero en cuanto a niveles de producción mundial ocupa el segundo lugar por debajo de China (Food and Agriculture Organization, 2005). Esto se debe a los bajos rendimientos obtenidos (alrededor de 13.17 ton/ha). España y Estados Unidos, por ejemplo, registran rendimientos promedios de 46.15 y 33.63 ton/ha, respectivamente (Food and Agriculture Organization, 2006).



La causa de estos bajos rendimientos es debida, entre otras cosas, al ataque de patógenos como hongos (*Phytophthora capsici*, *Leveillula taurina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Verticilium*), nemátodos (*Meloidogyne incognita*) y enfermedades virales, causando pérdidas de un 20% al 100% de la cosecha (Torres Pacheco *et al.*, 1996). En la figura 2 se muestra la sintomatología presentada en el cultivo de chile por infección viral.



Figura 2. Síntomas causados por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de chile y jitomate en el estado de Sinaloa, México.

En el estado de Guanajuato se cultivan aproximadamente 7000 Ha. con chile. La superficie se ha ido reduciendo paulatinamente, entre otras causas, por el papel que los virus han tenido, destacándose los geminivirus.

En esta región hortícola se han dejado de sembrar miles de hectáreas de chile principalmente por problemas fitosanitarios que involucran a enfermedades de etiología viral y pudriciones de raíz por fungosis. Con ello, se dejan de aprovechar las opciones de mercadeo que se tienen al estar en el centro de consumo más grande del mundo.



Agentes virales fitopatógenos.

Los virus son entidades biológicas microscópicas constituidas por “una o más moléculas de ácido nucleico (ARN o ADN), normalmente encapsidadas en una cubierta proteica o lipoproteica, capaz de organizar su replicación en una célula hospedera”. La replicación de un virus depende de la maquinaria biosintética de la célula hospedera, lo que los hace parásitos intracelulares obligados (Matthews, 1991).

Geminivirus. Los hospederos celulares de los virus son de todo tipo: animales, vegetales, bacterias, etc. Dentro de los virus que afectan a las plantas (fitopatógenos) destacan los pertenecientes a la familia *Geminiviridae*, los que se caracterizan por su genoma de cadena de ADN sencilla circular, la cual esta encapsidada en partículas geminadas de geometría icosaédrica unidas por una de sus caras (Padidam *et al.*, 1995). En la figura 3 se muestra una micrografía electrónica de los geminivirus.

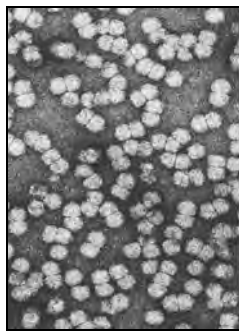


Figura 3. Micrografía electrónica de partículas geminivirales.

Los geminivirus están divididos en cuatro géneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*) basados en su estructura genómica, rango de hospederos y tipo de insecto vector (tabla 1) (Soto and Gilbertson, 2003; <http://phene.cpmc.columbia.edu/lctv/index.htm>).



Los geminivirus del género *Mastrevirus* y *Curtovirus* son de genoma monopartita y son transmitidos por chicharritas. Los *Mastrevirus* infectan plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. El género *Topocuvirus* incluye sólo al virus del pseudo-enchinamiento del tomate (TYLCV) que es transmitido por chicharrita saltadora. Los *Begomovirus* son transmitidos por moscas blancas (*Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii*) e infectan plantas dicotiledóneas en los trópicos y subtrópicos (Soto y Gilbertson, 2003).

Tabla 1. Clasificación de Geminivirus (ICTV).

Género	Estructura genómica	Planta hospedera	Insecto vector	Miembro tipo	Otros virus
I Mastrevirus	Monopartita	Mono- y dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Virus del estriado del maíz (MSV)	WDV DSV PSV
II Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)	Virus del enrollamiento apical del betabel (BCTV)	BSCTV BMCTV SpiCTV
III Begomovirus	Mono- y bipartita	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)	Virus del mosaico dorado del frijol (BGMV)	PHYVV TGMV SqLCV AbMV PepGMV
IV Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas saltadoras (<i>Membracidae</i>)	Virus del pseudo-enchinamiento del tomate (TPCTV)	



Los geminivirus pueden poseer uno (monopartitas) o dos componentes (bipartitas) genómicos, cada uno con un tamaño aproximado de 2.5 kb. La cápside está compuesta por 110 sub-unidades proteicas. La estructura geminada es formada por la fusión de dos icosahédros incompletos con 22 capsómeros pentaméricos en total (Padidam *et al.*, 1995).

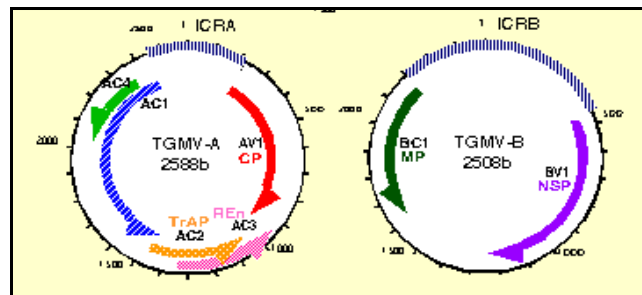


Figura 4. Organización Genómica de los Geminivirus. ICR: Región común, AV1: Proteína de la cápside, AC1: Proteína de replicación, AC2: Proteína potenciadora de la replicación, AC3: Eficiencia de replicación, BC1: Movimiento Núcleo-Citoplasma, BV1: Movimiento célula-célula.

En los geminivirus bipartitas, los componentes genómicos son llamados A y B. En el componente A se encuentran los genes para funciones de replicación, transcripción y encapsidación, mientras que en el componente B están los genes que codifican funciones de movimiento (Sudarshana, *et al.*, 1998). La figura 4 esquematiza la organización genómica de los geminivirus bipartitas.

El componente A tiene el potencial para codificar cinco productos génicos (AV1, AC1, AC2, AC3, AC4) y el componente B codifica dos productos génicos (BV1 y BC1). En base a estudios génicos y bioquímicos se ha elucidado la función de cada uno. El AV1 o CP codifica a la proteína de la cápside (Kallender *et al.*, 1988), necesaria para la transmisión por insecto (Azzam *et al.*, 1994).



La proteína AC1 o proteína Rep (proteína asociada a la replicación) es esencial para la replicación de ambos componentes geminivirales (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992, 1994). El producto génico AC2 o TrAP es un factor de la trans-activación necesario para la expresión de los genes AV1 y BV1 (Sunter and Bisaro, 1992) y un supresor de la respuesta de silenciamiento. La proteína AC3 potencia la acumulación de ADN viral (Sunter *et al.*, 1990) y también se conoce como proteína potenciadora de la replicación (REn).

La proteína BV1, también llamada NSP (nuclear shuttle protein), facilita el movimiento de los virus del núcleo al citoplasma, mientras que la proteína BC1 funciona tanto como una proteína clásica de movimiento viral (MP) como un factor que incrementa el límite del tamaño de exclusión de los plasmodesmos (Sanderfoot *et al.*, 1996; Sanderfoot and Lazarowitz, 1999).

Cada componente contiene unidades de transcripción divergentes, separadas por una Región Intergénica (RI), de aproximadamente 300 nucleótidos (nt) en el componente A y en el componente B de aproximadamente 900 nt. En la RI existe una secuencia llamada Región Común (RC) de alrededor de 200 nt, la cual suele ser idéntica para ambos componentes de un mismo geminivirus, pero diferente entre distintos geminivirus. La RC contiene una región de 30 nt capaz de formar una estructura de horquilla, rica en G-C en el tallo y una secuencia conservada rica en A-T en el asa, que contiene el sitio de inicio de la replicación. Además, en la RI se encuentran las regiones reguladoras que permiten la expresión coordinada temporal y espacial de los genes (Ascencio Ibáñez *et al.*, 1999).

Replicación geminiviral. La replicación de los geminivirus se lleva a cabo en el núcleo de las células infectadas, por el mecanismo del círculo rodante (Stenger *et al.*, 1991). Para llevar a cabo el proceso infectivo, los geminivirus requieren de factores del hospedero para mediar los procesos de replicación, transcripción, movimiento en la planta y adquisición por el vector (Fontes *et al.*, 1994).



La proteína AL1 (también llamada AC1, C1 o Rep) es la única proteína viral esencial para la replicación (Elmer *et al.*, 1988). AL1 reconoce el origen por unión a una secuencia específica de ADN (Fontes *et al.*, 1994), cataliza el rompimiento y la ligación de ADN para iniciar y terminar la replicación de círculo rodante (Orozco and Handley-Bowdoin., 1996) y puede actuar como una helicasa durante la elongación (Pant *et al.*, 2001).

AL1 también juega un papel importante en reprogramar a las células vegetales maduras para apoyar la replicación y reclutamiento de la maquinaria de replicación del hospedero (Luque *et al.*, 2002).

Muchos geminivirus se replican en células diferenciadas que han salido del ciclo celular y contienen niveles no detectables de las DNAs polimerasas del hospedero y factores asociados (Nagar *et al.*, 1995; Lucy *et al.*, 1996). Se cree que los geminivirus superan esta barrera por interacción con una proteína del hospedero, la proteína relacionada a retinoblastoma (pRBR), para inducir la transcripción de genes que codifican a las enzimas de replicación del hospedero (Egelkrout *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2000). Esta pRBR es un regulador clave del ciclo de división celular y diferenciación en plantas (López-Ochoa *et al.*, 2006). Esta característica convierte a los geminivirus en herramientas valiosas para estudiar los mecanismos por los que la división y diferenciación celular son reguladas por pRBR en plantas.

Se ha determinado que la hélice 4 y residuos conservados de leucina son parte de una interfase pRBR-enlace en proteínas de replicación de begomovirus (Argüello-Astorga *et al.*, 2004) y por analogía con los virus de ADN de mamíferos, la interacción entre Rep y pRBR podría ser debida a un requerimiento de fosforilación de la transición G₁/S y la progresión de la fase S durante la infección geminiviral (Mittnacht, 1998; Sherr and Roberts, 1999).



Por otro lado, ha sido reportada la presencia de DNAs satélites asociados a la infección con geminivirus. Estos DNAs son derivados de una delección parcial del genoma viral y muestran un alto grado de homología con un virus ayudador. En contraste a esto, las pequeñas moléculas (682 nt) de ADN circular encontradas en asociación con TLCV no son derivadas del genoma del virus ayudador y muestran características análogas a los satélites virales de RNA. Este tipo de molécula no ha sido encontrada en asociación con ningún otro geminivirus o virus de ADN de planta, animal o bacteriano (Dry *et al.*, 1997). Esta fue la primera demostración de que las moléculas satélite no son exclusivas de los sistemas virales de RNA. Bajo este mismo contexto, hay estudios que muestran que la diversidad de DNAs satélites asociados a begomovirus está relacionada con el hospedero y el origen geográfico (Briddon *et al.*, 2003). Varios análisis de la variación molecular indicaron que los satélites están “encajonados” de acuerdo a su localización geográfica pero tienen limitada la diversidad de su secuencia.

En pruebas de infectividad usando clonas de MYVV (*Malvastrum yellow vein virus*) y la molécula de DNA satélite se probó que el DNA- β de MYVV es indispensable para la inducción de síntomas en plantas de *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *Petuniahybrida* y *M. coromandelianum*, con lo cual se mostró que MYVV interactúa funcionalmente con la molécula heteróloga de ADN- β en plantas de *N. benthamiana* (Guo *et al.*, 2008).

La pseudorecombinación es una de las más importantes fuentes de variación genética viral. En begomovirus bipartitas, los dos componentes muestran una región común conteniendo secuencias repetidas (iterones). Cuando la proteína Rep inicia la trans-replicación de DNA-B reconoce de manera específica a esos iterones. Este mecanismo de reconocimiento es extremadamente específico en la secuencia (Fontes *et al.*, 1994) y usualmente está confinado a especies particulares de begomovirus; sin embargo, la replicación interespecífica puede ocurrir si los iterones son conservados (Saunders *et al.*, 2002).



Los geminivirus pueden sustentar la replicación heteróloga de DNA- β . La replicación de los componentes genómicos DNA-A y DNA-B de diferentes begomovirus bipartitas es muy específica en comparación con las interacciones entre el DNA- β y su virus ayudador (Mansor *et al.*, 2006)

Estos estudios han dado cabida a la identificación de tres tipos distintos de begomovirus de acuerdo a la composición de su genoma. Un primer grupo consiste en los geminivirus bipartitas que contienen los componentes A y B, un segundo grupo está integrado por los begomovirus monopartitas carentes del componente B, y un tercer grupo representado por los begomovirus que presentan una molécula satélite de DNA- β en plantas infectadas (Bridon *et al.*, 2003; Bull *et al.*, 2004). Este último grupo puede ser dividido en dos tipos de acuerdo a si la molécula de DNA- β es o no indispensable para la inducción de síntomas. El primer tipo es el mas abundante (Guo *et al.*, 2008).

Mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) como vector de geminivirus.

Las enfermedades causadas por geminivirus transmitidos por mosquita blanca han aumentado desde mediados de 1970, principalmente debido al incremento de las poblaciones del vector y su distribución en los agroecosistemas subtropicales.

La problemática relacionada con la mosquita blanca ha cobrado importancia debido a factores como el transporte de material infestado con estos insectos, el cambio en las condiciones climáticas, la intensificación de las prácticas agrícolas, el uso indiscriminado de insecticidas y el desarrollo de resistencia a éstos (Cohen, 1990).



Las mosquitas blancas pertenecen a la familia *Aleyrodidae* (orden Hemiptera) el cual incluye 1200 especies en 140 géneros, que afectan en distinta medida tanto a plantas cultivadas leñosas o herbáceas de interés alimentario, agrícola u ornamental, como a malas hierbas. Los adultos llegan a medir 1.5 mm de longitud.

Habiendo tantas especies de mosquita blanca es difícil identificarlas, y los expertos lo hacen ayudándose de las características anatómicas en sus diferentes estados de desarrollo además de su hospedero (Martin, 2007). En la tabla 2 se muestra esta clasificación.

Tabla 2. Tipos de moscas blancas y sus plantas hospederas

Nombre común	Nombre científico	Planta hospedera
	<i>Aleuroclava eucalypti</i> Singh	Eucalipto
Mosca blanca de los cítricos	<i>Siphonius phillyreae</i> (Halliday)	Cítricos
Mosca blanca de la azalea	<i>Pealius azaleae</i>	Azaleas y rododendros
Mosca blanca de la calabaza	<i>Aleyrodes proletella</i> L.	Cucurbitáceas
Mosca blanca de los invernaderos	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Gran variedad de cultivos
Mosca blanca del camote	<i>Bemisia tabaci</i> G.	Gran variedad de cultivos, solanáceas, cucurbitáceas, etc.
Mosca blanca de la hoja plateada	<i>Bemisia argentifolii</i> Bellows	Gran variedad de cultivos, solanáceas, cucurbitáceas, ponsetias, gerberas, etc.

Sin embargo sólo unas cuantas especies son plagas de cultivos importantes; entre ellas se encuentra la mosquita blanca del camote (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Avila-Valdéz e Hinojosa-Reyes, 2000). Esta especie ataca cultivos como el chile, apio, camote, espinaca, frijol, papa, tabaco, yuca, zanahoria, crucíferas y cucurbitáceas, además de algunas malezas.



El género de *Bemisia* de mosquita blanca, mostrado en la figura 5, son los únicos vectores de begomovirus conocidos.



Figura 5. Mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius.

En México la mosquita blanca *B. tabaci* fue reportada por primera vez en el sur de Tamaulipas en 1986 asociada a una enfermedad en chile de tipo viral a la que se denominó “Rizado amarillo del chile” (Brown *et al*, 1989; Garzón-Tiznado *et al*, 1989) y en la que posteriormente se encontraron involucrados en el síndrome a los Begomovirus virus huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) (antes denominado virus huasteco del chile) y al virus mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV), anteriormente denominado virus texano de chile (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En México, ambos virus han sido detectados de manera recurrente en infección mixta o separada en diferentes regiones productoras en chile y otras solanáceas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Vera Aguado, 2000).

Se ha estudiado la participación de endosimbiontes primarios presentes en *B. tabaci*, los que están implicados en la persistencia del virus en el interior del insecto. Esto mismo ocurre en algunos *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* transmitidos por pulgones (Morin *et al.*, 1999). Estos endosimbiontes también podrían estar implicados en la transmisión transovarial de la cepa israelí de TYLCV (TYLCV-Is) (Ghanim *et al.*, 1997) convirtiendo a las moscas blancas en reservorios virales.



También se ha observado que la acción de TYLCV en *B. tabaci* no es pasiva, ya que la presencia del ADN viral disminuye la eficiencia de la transmisión, la longevidad y la fecundidad del vector (Duffus, 1996; Rubinstein y Czosneck, 1997).

Los geminivirus frecuentemente se encuentran involucrados en infecciones mixtas y sinergistas, incrementando con esto la acumulación viral y la severidad de los síntomas (Harrison and Robinson, 1999). Estos pueden formar pseudo-recombinantes y recombinar a nuevas formas más virulentas (Rojas *et al.*, 2005). Aunado a la aparición de los DNA satélites podría presentarse una mayor variabilidad genética y una rápida evolución viral (López-Ochoa *et al.*, 2006).

Incógnitas sobre el fenómeno de transmisión de los geminivirus PHYVV y PepGMV que afectan la epidemiología y la severidad de las infecciones.

Se han tenido avances en la comprensión de las interacciones entre estos geminivirus en la planta, como la detección de interacciones a varios niveles (replicación y movimiento) y en diferentes modalidades (sinergismo y antagonismo) de los virus cuando se encuentran en mezcla en diferentes plantas hospederas (Méndez-Lozano *et al.*, 2003 y 2006).

Sin embargo, en el caso de PHYVV y PepGMV, nada se sabe sobre el proceso en que se da la infección conjunta involucrando al vector y la transmisión al hospedero.

En lo que concierne a la ruta que sigue el virión dentro de la mosquita blanca no se conocen las posibles limitantes celulares o moleculares que la partícula tiene que superar desde la ingestión hasta la transmisión. Tampoco se conocen las bases moleculares de la especificidad altamente conservada entre *Bemisia tabaci* y estos begomovirus.



Por otra parte, es desconcertante la observación de que altas infestaciones del insecto no producen altos niveles de infectividad o virulencia. En algunos casos unos cuantos vectores son suficientes para producir una alta infectividad (Cubillo *et al*, 1999).

Llama la atención que todos los estudios realizados hasta ahora tratan de virus que se transmiten mecánicamente. Así mismo, los trabajos no han incluido la cuantificación viral en el vector *B. tabaci*; lo que podría ayudar a esclarecer mejor el papel de los diferentes órganos del vector en el tránsito del virus.

Por otro lado no se ha realizado un seguimiento del movimiento del virus en el vector y su implicación en el desarrollo de la enfermedad. Otro punto de controversia es la posibilidad de que los geminivirus se repliquen en el vector.

De manera resumida quedan entonces las siguientes interrogantes:

1. Dada la presencia de infección mixta de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile, ¿tiene el vector mosquita blanca la capacidad de adquirir y transmitir en forma simultánea a estos geminivirus? y ¿cómo se ve influenciado el proceso de infección por los periodos de adquisición-alimentación y transmisión alimentación?
2. ¿Cuál es la tasa de replicación de PHYVV y PepGMV en la planta hospedera y en el vector *Bemisia tabaci*?
3. ¿Cuál es el efecto de las variaciones de la temperatura en la acumulación de PHYVV y PepGMV en la planta de Chile?
4. ¿Cuáles son los sitios en los que se localizan PHYVV y PepGMV en la planta hospedera y en el vector *Bemisia tabaci*?



En el presente trabajo se pretende dar respuesta a cada una de estas interrogantes. Para efectos de redacción, los resultados fueron organizados en los siguientes capítulos:

Capítulo I. Transmisiones simples y en mezcla de PHYVV y PepGMV a plantas de Chile *Capsicum annuum* por *Bemisia tabaci*. Se demostró la capacidad de *Bemisia tabaci* de adquirir y transmitir de forma simultánea a los geminivirus PHYVV y PepGMV a plantas de Chile *Capsicum annuum*.

También se determinó la influencia del número de vectores por planta, periodo de adquisición y periodo de transmisión en la relación de virulencia hospedero-vector en plantas de Chile *Capsicum annuum* de la variedad *Sonora Anaheim* infectadas por los geminivirus PHYVV y PepGMV teniendo como vector a la mosquita blanca *Bemisia tabaci*.

Capítulo II. Carga viral de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile y en el vector *Bemisia tabaci*. Se llevó a cabo la cuantificación de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile y en el vector a distintos periodos de incubación usando la técnica de PCR cuantitativa. La cuantificación en el vector permitió determinar la posible replicación de estos geminivirus en el vector.

Capítulo III. Variación de la carga viral de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile por efecto de la temperatura. Se determinó el efecto sobre la acumulación de PHYVV y PepGMV en planta cuando se lleva a cabo el proceso de transmisión a diferentes temperaturas usando la técnica de PCR cuantitativa.

Capítulo IV. Localización de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile y el vector *Bemisia tabaci* por Hibridación *in situ*. Se detectaron los sitios de acumulación viral de PHYVV y PepGMV en las plantas hospederas y en el vector.



Los resultados derivados de estos estudios podrían ser relevantes, porque si bien se han diseñado prácticas racionales para el manejo de las enfermedades de etiología geminiviral, subsisten problemas de este tipo que eventualmente no es posible superar y como los esfuerzos se orientan básicamente al control del vector, la información aportada en este trabajo puede ser de gran utilidad.

Bibliografía

Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong L.J., Orozco, B. M., Settlage, S.B. and Hanley-Bowdoin, L. (2004). A Novel Motif in Geminivirus Replication Proteins Interacts with the Plant Retinoblastoma-Related Protein. *Journal of Virology*. Vol. 78, No. 9 p. 4817–4826

Ascencio-Ibañez, J.T., G.R. Argüello-Astorga, J. Méndez-Lozano and R.F. Rivera-Bustamente. (2002). First report of *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86 (6): 692.

Avila Valdez, J. e Hinojosa Reyes, I. (2000). Manejo Integrado de Mosca Blanca. Folleto Técnico Num. 16. INIFAP- Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Pags.4-10 y 16-27.

Azzam O, Frazer J, de la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204:289–96.

Briddon, R. W., S. E. Bull, I. Amin, A. M. Idris, S. Mansoor, I. D. Bedford, P. Dhawan, N. Rishi, S. S. Siwatch, A. M. Abdel-Salam, J. K. Brown, Y. Zafar, and P. G. Markham. (2003). Diversity of DNA₂, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312:106–121.



Brown, J.K., Campodiónico, O.P. & Nelson, M. R. (1989). A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tigre disease.(Abstract). *Plant Disease* 73, 610.

Bull, S. E., W. S. Tsai, R. W. Briddon, P. G. Markham, J. Stanley, and S. K. Green. (2004). Diversity of begomovirus DNA_ satellites of non-malvaceous plants in east and south east Asia—brief report. *Arch. Virol.* **149**:1193–1200

Cohen S. (1990). Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En “Whiteflies: their bionomics, pest, status and management”. Pags. 211-225. Ed. Gerling, D. Intercept Ltd, U.K.

Cubillo, D., G. Sanabria and L. Hilje. (1999). Efficiency of live protection in whiteflies management in tomato. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. No. 51: 10-20.

Dry, I. B., Krake, L.R., Rigden, J.E. and Rezaian, M. A. (1997). A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, pp. 7088–7093.

Duffus, J.E. (1996). Whitefly-borne viruses. En: “Bemisia 1996: Taxonomy, biology, damage, control and management”. Pp:255-263. Ed. Gerling D., Mayer, R.T. Intercept Ltd., U.K.

Elmer, J.S., L. Brand, G. Sunter, W.E. Gardiner, D.M. Bisaro, and S.G. Rogers. (1988). Genetic analysis of tomato golden mosaic virus II. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. *Nucleic Acids Res.* 16:7043-7060.



Egelkrout, E., L. Mariconti, R. Cella, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. (2002). The activity of the proliferating cell nuclear antigen promoter is differentially regulated by two E2F elements during plant development. *Plant Cell* **14**:3225–3236.

Fontes, E.P.B., Luckow, A.V. and Hanley-Bowdoin, L. (1992). A Geminivirus replication protein is sequence-specific DNA binding protein. *The Plant Cell* **4**: 597-606.

Fontes, E. P. B., P. A. Eagle, P. S. Sipe, V. A. Luckow, and L. Hanley-Bowdoin. (1994). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* **269**:8459–8465

Garzón-Tiznado, J.A., R.F. Rivera-Bustamente, L. Rivera-Estrella, F. Delgadillo-Sánchez and O. Pozo-Campodionico. (1989). Estudio preliminar sobre el rizado amarillo del chile (*Capsicum annuum* L.) en el sur de Tamaulipas. Un geminivirus. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Edo. de México.

Garzón-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella and R. Rivera Bustamante. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biobalistic procedure. *Phytopathology* **83**: 514-521.

Ghanim M., Morin, S., Zeidan, M. and Czosnek H. (1997). Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240**: 295-303.



Guo, W., Jiang, T., Zhang, X., Li, G. and Zhou, X. (2008). Molecular Variation of Satellite DNA_ Molecules Associated with *Malvastrum yellow vein virus* and Their Role in Pathogenicity. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 1909–1913 Vol. 74, No. 6.

Harrison, B., and D. Robinson. (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**:369–398.

Hunziker, A. T. (1979). South American *Solanaceae*: a synoptic survey. J. G. Hawkes, R. N. Lester, and A. D. Skelding (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London.

Kallender, H., Petty, I.T., Stein, V.E., Panico, M., Blench, I.P., Etienne, A.T., Morris, H.R. Coutts, R.H. and Buck, W. (1988). Identification of the Coat Protein Gene of Tomato Golden Mosaic Virus. *J.Gen. Virol.* 69, 1351-1357.

Kong, L. J., B. M. Orozco, J. L. Roe, S. Nagar, S. Ou, H. S. Feiler, T. Durfee, A. B. Miller, W. Gruissem, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* **19**:3485–3495.

Lopez-Ochoa, L., Ramirez-Prado, J. and Hanley-Bowdoin, L. (2006). Peptide Aptamers That Bind to a Geminivirus Replication Protein Interfere with Viral Replication in Plant Cells. *Journal of Virology.* Vol. 80, No. 12, p. 5841–5853.

Lucy, A. P., M. I. Boulton, J. W. Davies, and A. J. Maule. (1996). Tissue specificity of *Zea mays* infection by maize streak virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:22–31.



Luque, A., A. P. Sanz-Burgos, E. Ramirez-Parra, M. M. Castellano, and C. Gutierrez. (2002). Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology* **302**:83–94.

Mansoor, S., Y. Zafar, and R. W. Briddon. (2006). Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. *Trends Plant Sci.* **11**:209–212.

Martin, N.A. (2007). Whitefly: Biology, identification and life cycle. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited. A Crown Research Institute.

Matthews, R.E.F. (1991). Definition of a virus. *Plant Virology*. Third Edition. Academic Press. Pg. 8.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. and Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huastec virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* **93**: 20-277.

Méndez-Lozano, J., Quintero-Zamora, E., Barbosa-Jaso, M.P., Leyva-López, N.E., Garzón-Tiznado, J.A. and Argüello-Astorga, G.R. (2006). A Begomovirus Associated with Leaf Curling and Chlorosis of Soybean in Sinaloa, Mexico is Related to Pepper Golden Mosaic Virus. *Plant Disease* **90** (1): 109.

Mittnacht, S. (1998). Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:21–27.

Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, van den Heuvel JF. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia*



tabaci is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256:75–84

Nagar, S., T. J. Pedersen, K. Carrick, L. Hanley-Bowdoin, and D. Robertson. (1995). A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*. 7:705–719.

Orozco, B., and Hanley-Bowdoin, L. (1996). A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology* 70, 148-158.

Padidam, M., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76, 249±263.

Pant, V., D. Gupta, N. R. Choudhury, V. G. Malathi, A. Varma, and S. K. Mukherjee. (2001). Molecular characterization of the Rep protein of the blackgram isolate of Indian mungbean yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 82:2559–2567.

Rojas, M. R., C. Hagen, W. J. Lucas, and R. L. Gilbertson. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:361–394.

Rubinstein ,G. and Czosneck, H. (1997). Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78:2683-2689.

Sanderfoot, A.A., Ingham, J.D. and Lazarowitz, G.S. (1996). A viral movement: protein as a nuclear Shuttle. *Plant Physiol.* 110: 23-33.



Sanderfoot, A.A. and Lazarowitz, G.S. (1999). Cooperation in viral movement: The gemivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *The Plant Cell*. 7: 1185-1194.

Saunders, K., N. Salim, V. R. Mali, V. G. Malathi, R. Briddon, P. G. Markham, and J. Stanley. (2002). Characterization of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* **293**:63–74.

Sherr, C.J., and J.M. Roberts. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**:1501–1512.

Soto, M. J. and Gilbertson, R. L. (2003). Distribution and rate of movement of the curtovirus *Beet mild curly top virus* (Family *Geminiviridae*) in the beet leafhopper. *Phytopathology* 93: 478-484.

Stenger, D.C., Revinton, G.N., Stevenson, M.C. and Bisaro, M.D. (1991). Replicational release of gemivirus genomes from tendently repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:8029-8033.

Sudarshana, M.R., Wang, H.L., Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. (1998). Dinamics of Bean Dwarf Mosaic Geminivirus cell to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(4): 277-291.

Sunter, G. and Bisaro, M.D. (1992). Transactivation in a Geminivirus: AL2 Gene is hended for coat protein expression. *Virology* 180: 416-419.



Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormuzdi, S.G., Brough, C.L. and Bisaro, D.M. (1990). Genetic analysis of TGMV: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* **179**: 69-77.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brow, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and Distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopatology* **86**: 1186-1192.

Vera Aguado, M. G. (2002). Detección de virus en jitomate (*Lycopersicon lycopersicum*), chile (*Capsicum annum*) y maleza, en los diferentes ambientes de cultivo en México. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

http: www.agroenlinea.com

http: www. Food and Agriculture Organization. 2005

http: www. Food and Agriculture Organization. 2006

http:www.siap.sagarpa.gob.mx

http://phene.cpmc.columbia.edu/lctv/index.htm



CAPÍTULO I

Transmisión simple y en mezcla de los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* a plantas de chile *Capsicum annuum* por *Bemisia tabaci*.

Antecedentes. En México la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gennadius es una plaga de cultivos importantes (Avila-Valdéz e Hinojosa-Reyes, 2000). Estos insectos afectan en distinta medida tanto a plantas cultivadas leñosas o herbáceas de interés alimentario, agrícola u ornamental, así como a malezas; entre los cuales destacan chile, tomate, apio, camote, espinaca, frijol, papa, tabaco, yuca, zanahoria, crucíferas y cucurbitáceas.

Los problemas agrícolas relacionados con mosquitas blancas se han incrementado debido a factores tales como: transporte de material infestado con estos insectos, el cambio en las condiciones climáticas, la intensificación de las prácticas agrícolas, el uso indiscriminado de insecticidas y el desarrollo de resistencia a éstos (Cohen, 1990).

La mosquita blanca *B. tabaci* fue reportada en México por primera vez en 1986, en el sur de Tamaulipas, asociada a una enfermedad en chile de tipo viral a la que se denominó “Rizado amarillo del chile” (Brown *et al*, 1989; Garzón-Tiznado *et al*, 1989) y en la que posteriormente se encontraron involucrados en el síndrome a los Begomovirus virus huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) (antes denominado virus huasteco del chile) y al virus mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV), anteriormente denominado virus texano de chile(Torres-Pacheco *et al.*, 1996).



En México, donde el chile es la principal hortaliza cultivada, ambos virus han sido detectados de manera recurrente en infección mixta o separada en diferentes regiones productoras en Chile y otras solanáceas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Vera Aguado, 2000).

Las infecciones mixtas en Chile que involucran al PHYVV y al PepGMV fueron las primeras infecciones naturales se reportaron involucrando geminivirus; esto convierte a este fenómeno en un modelo interesante para estudiar la adquisición y transmisión de ambos virus por *B. tabaci*. Se han tenido avances en la comprensión de la interacción entre estos geminivirus en la planta, como la detección de interacciones a varios niveles (replicación y movimiento) y en diferentes maneras (sinergismo y antagonismo) de los virus cuando se encuentran en mezcla en diferentes plantas hospedadoras (Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Sin embargo, en el caso de PHYVV y PepGMV, nada se sabe sobre el papel del vector en el proceso de adquisición y transmisión de ambos geminivirus (Medina-Ramos *et al.*, 2008).

Algunos datos sugieren que la transmisión de geminivirus por mosca blanca es del tipo persistente y circulativa. En la transmisión del virus del rizado de la hoja de la calabaza (*Squash leaf curl virus*, SLCV) se requiere de un periodo de latencia de alrededor de 6 a 12 horas anteriores al evento de transmisión (Rosell *et al.*, 1999, 2003). También se ha especulado que los geminivirus no se replican dentro de la mosca blanca ya que no hay paso transovarial, aunque reportes recientes de transmisión en el caso de TYLCV en una población de *B. tabaci* contradicen lo anterior (Ghanim *et al.*, 1997).

Por otra parte, es desconcertante que altas infestaciones del insecto no produzcan altos niveles de infectividad o virulencia; y en otras ocasiones unos cuantos vectores sean suficientes para producir una alta infectividad.



Llama la atención que en todo caso se trata de estudios de virus que se transmiten mecánicamente (Medina-Ramos *et al.*, 2008).

El conocimiento de la biología de la adquisición y transmisión de geminivirus por mosquita blanca es necesario para mejorar el control de enfermedades geminivirales (Hunter *et al.*, 1998; Medina-Ramos *et al.*, 2008).

Objetivo:

Determinar el efecto de los factores: densidad del vector (*Bemisia tabaci* Genn.), periodo de acceso a la adquisición-alimentación (AAP) y periodo de acceso a la inoculación-alimentación (IAP), en infecciones simples y en mezcla de los geminivirus PHYVV y PepGMV, transmitidos por mosquita blanca a plantas de chile *Capsicum annuum* de la variedad *Sonora Anaheim*.

Materiales y Métodos.

Establecimiento de la colonia de mosquita blanca (*B. tabaci* Genn.).

a. Obtención de la mosquita blanca. *Bemisia tabaci* fue obtenida de colectas en papa del Laboratorio de Entomología del Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se capturaron insectos adultos por medio de succión con bomba de vacío (Welch Vacuum Thomas Mod.2522B-01). Cada colonia estuvo compuesta por 750 insectos.

b. Crecimiento, desarrollo y manejo de diferentes generaciones de los vectores. Los adultos capturados fueron puestos en cajas de reproducción (60 X 35 X 30 cm) hechas de madera y con tela de organza (figura 6).



Las plantas hospederas utilizadas fueron: Algodón (*Gossypium hirsutum* cv. Delta Pine), frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Canario), Jitomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Bull) y Tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Éstas tenían de 4 a 5 hojas verdaderas al momento de la transferencia. La temperatura fue de 24-28° C (equivalente a 298 Unidades Calor Acumuladas (UCA) en frijol, 264.04 UCA para algodón, 347 UCA en jitomate y 395 UCA en tabaco) y de 70 % de humedad relativa. Las temperaturas y la humedad relativa fueron medidas con el sistema Hobo Onset de Computer Corporation (Bourne, MA 02532 USA).



Figura 6. Cajas de reproducción de mosquita blanca

La determinación de las UCA durante cada generación se determinó por el Método Residual:

$$U. C. = (T_{Máx} + T_{Min}) / 2 - \text{constante}$$

U. C. acumuladas = S U. C.

Donde: U. C. = Unidades calor

TMax = Temperatura máxima (°C)

TMin= Temperatura mínima (°C)

Constante mosquita blanca = 10°C

Constante = Temperatura Umbral Inferior del insecto.



c. Detección de presencia de geminivirus en los vectores y sus plantas hospederas. La presencia de geminivirus fue determinado por la Reacción en Cadena de Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) utilizando oligonucleótidos que amplifican un segmento de 1156 pb del componente A de los geminivirus (Rojas *et al.*, 1993). Adicionalmente se usaron los oligonucleótidos de MOT-CP, los cuales amplifican un segmento de 650 pb del componente A de geminivirus e incluye la región común (RC) y parte del gen de la proteína de la cápside (CP) (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador DNA Thermal Cycler (Mod. PxE 0.2, Thermo Electron Corp., Milford, MA) bajo las condiciones siguientes: 1 min 94°C, 1 min 30 seg 55°C y 2 min 72°C, durante 30 ciclos.

Los componentes de la reacción de PCR fueron: 2 µl de DNA (10 ng), 1 µl de cada oligonucleótido (10 mM), 0.5 µl de mezcla de deoxinucleótidos (10 mM), 2.5 µl de Buffer de PCR 10X, 1.5 µl de MgCl₂ (50 mM) y 0.2 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl) en un volumen final de 25 µl. El análisis electroforético fue en gel de agarosa (1%, 80 volts, 1 hora).

Obtención de plantas fuentes de PHYVV Y PepGMV. Para los estudios de adquisición y transmisión se inocularon plantas de Chile (*Capsicum annuum* c.v. Sonora Anaheim) por medio de biobalística (presión de disparo de 750 psi y distancia de 2 cm.) usando una concentración de 2.5 µg de cada componente viral (Anaya-López *et al.*, 2003). Estos componentes virales se encuentran clonados en el plásmido p-BlueScript (SK+) y para ser introducidos a las plantas fueron liberados con digestiones con enzimas de restricción (*Eco* RI para el componente A de ambos geminivirus; *Bam* HI para el componente B de PHYVV, y *Hind* III para el componente B de PepGMV). Después de ser inoculadas las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero y fueron utilizadas en pruebas de transmisión a los 15 días posteriores a inoculación (dpi).



Relaciones de transmisión virus-vector.

a. Ensayos de densidad de vectores. Para determinar el número mínimo de *B. tabaci* adultos requeridos para transmitir PHYVV y PepGMV, las mosquitas blancas fueron puestas a alimentarse en plantas infectadas durante un AAP de 48 horas y luego trasladadas en grupos de 1 y 2 vectores por planta durante un IAP de 48 horas.

b. Ensayos de periodos de acceso a la adquisición-alimentación (AAP). El AAP requerido para la transmisión de PHYVV y PepGMV fue determinado alimentando adultos de *B. tabaci* en plantas infectadas por periodos de 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Estas pruebas se llevaron a cabo con una mosquita por planta con un IAP de 48 horas.

c. Ensayos de periodos de acceso a la inoculación (transmisión)-alimentación (IAP). En cuanto al IAP requerido para la transmisión de PHYVV y PepGMV, este fue determinado alimentando adultos de *B. tabaci* en plantas infectadas por 24 horas de AAP. Estas pruebas se llevaron a cabo con una mosquita por planta con un IAP de 48 horas.

d. Ensayos de adquisición y transmisión mixta. El análisis consistió en evaluar 5 diferentes tipos de fuentes virales: 1) tres plantas solo con PHYVV, 2) tres plantas solo con PepGMV, 3) tres plantas con ambos virus, 4) tres plantas: una sólo con PHYVV, otra sólo con PepGMV y otra con la mezcla, 5) dos plantas: una sólo con PHYVV y otra sólo con PepGMV. Estas pruebas se llevaron a cabo con una mosquita por planta.



Condiciones generales para los eventos de adquisición y transmisión. Las mosquitas fueron puestas en contacto con las plantas fuente de virus o plantas de chile hospederas, de manera individual. Durante los periodos de adquisición o transmisión, las mosquitas y las plantas se mantuvieron dentro de una estructura consistente de un recipiente cilíndrico de plástico cuyo diámetro era de 11 cm. y con 15 cm. de altura. Los insectos fueron retirados una vez terminados los tratamientos correspondientes y las plantas fueron trasladadas a la cámara de crecimiento y mantenidas durante 5 días para permitir la incubación del virus. Las condiciones mantenidas durante el desarrollo de los experimentos fueron: temperatura 24°C y una humedad relativa de 70% (Figura 7).



Figura 7. Cámaras en las cuales se realizaron los ensayos de transmisión de geminivirus por mosca blanca.

Detección de geminivirus en plantas hospederas y mosquitas blancas de la colonia establecida. Fueron usados 2 pares de oligonucleótidos diseñados por Rojas *et al*, (1993), los cuales amplifican regiones de ≈ 650 y 1150 pb, respectivamente.



Detección de PHYVV y PepGMV. En la detección de PHYVV se usaron los oligonucleótidos 240 (5' GGCTTATTTGTAATAAGAGAGGTGT 3') y 241(5'GAATTAAAGGTACATGGACCACTT 3') que amplifican una región de ≈350 pb. Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización 94°C, 1 min; Hibridación 55°C, 1 min; Extensión 72°C , 2 min; durante 35 ciclos.

En la detección de PepGMV se usaron los oligonucleótidos JM23 (5' TGGTGTAGGACTCCAGCAGAGTC 3') y JM24 (5' TAGGCCACACCTTGGTGACCAAG 3') que amplifican una región de ≈ 288 pb. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador DNA Thermal Cycler (Mod. PxE 0.2, Thermo Electron Corp., Milford, MA). Los componentes de la reacción de PCR fueron: 2 µl de DNA (10 ng), 1 µl de cada oligonucleótido (10 mM), 0.5 µl de mezcla de deoxinucleótidos (10 mM), 2.5 µl de Buffer de PCR 10X, 1.5 µl de MgCl₂ (50 mM) y 0.2 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/µl) en un volumen final de 25 µl. El análisis electroforético fue en gel de agarosa (1%, 80 volts, 1 hora).

La medida de respuesta de las pruebas fue evaluada como el grado de severidad de la infección con la escala reportada por Godínez-Hernández *et al.*, (2001). La incidencia corresponde al número de plantas infectadas.

Extracción de ADN. Las extracciones de ADN vegetal fueron hechas con el método de Dellaporta *et al.*, (1983) y para las extracciones de ADN de insecto fue utilizado el Kit DNeasy Tissue (QIAGEN, Valencia C.A.). Después de ser retirados los insectos de las plantas fueron colectados y mantenidos a -70°C a para su posterior extracción individual. La disrupción del insecto se hizo en 180 µl de Buffer de Fosfatos pH 7.0 y se usó un homogenizador eléctrico.



Análisis estadístico. Los datos fueron sujetos al análisis de varianza usando el modelo general lineal acorde al método SAS. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron analizados por el método de Tukey (Montgomery, 1991).

Resultados.

Obtención, crecimiento, desarrollo y manejo de diferentes generaciones de la mosquita blanca. La colecta inicial de adultos de moscas blancas se realizó en un lote experimental de papa confinado dentro del Campo Experimental Bajío del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en plantas de 65 días de establecidas. Se trabajó con cinco generaciones usando de manera sucesiva 5 plantas de cada uno de los cultivos probados. Como puede observarse en la Tabla 3 el tabaco resultó ser, bajo las condiciones de este trabajo, el mejor hospedero para la multiplicación de la mosquita blanca en donde requirió de alrededor de 330 unidades calor para completar su ciclo (aproximadamente un mes).

Tabla 3. Elementos del proceso de la limpieza y multiplicación de la mosquita blanca

<i>Generación</i>	<i>Hospedero</i>	<i>Unidades Calor Acumuladas para completar un ciclo del insecto</i>	<i>Tiempo en días</i>	<i>Mosquitas blancas obtenidas</i>
Colecta inicial	Papa			750
1	Frijol	316.2	26	1256±15.70 b
2	Algodón	315.0	32	986±12.09c
3	Algodón	352.1	34	1050±9.70 c
4	Jitomate	325.0	36	1500±23.90 a
5	Tabaco cv Xanthi	331.0	33	1600±15.89 a

Los valores son medias ± su desviación estándar; 5 repeticiones por generación y (p>0.05)



Detección de presencia de geminivirus en los vectores capturados y sus hospederos. Con el fin de determinar presencia de geminivirus en la colecta inicial, y posteriormente, que en cada generación se lograba eliminar al virus del vector se realizaron PCR's en cada generación tanto en el insecto como en el hospedero. Como se puede observar en la Figura 8 a partir de la primera generación no se detectó la presencia de geminivirus con los oligonucleótidos PAL1V1978-PAR1c496 ni con los MOT-CP (Rojas *et al.*, 1993). Tampoco se detectaron geminivirus, con los pares de oligonucleótidos mencionados, en ninguno de los hospederos sucesivos que se utilizaron en las diferentes generaciones que se manejaron del vector.

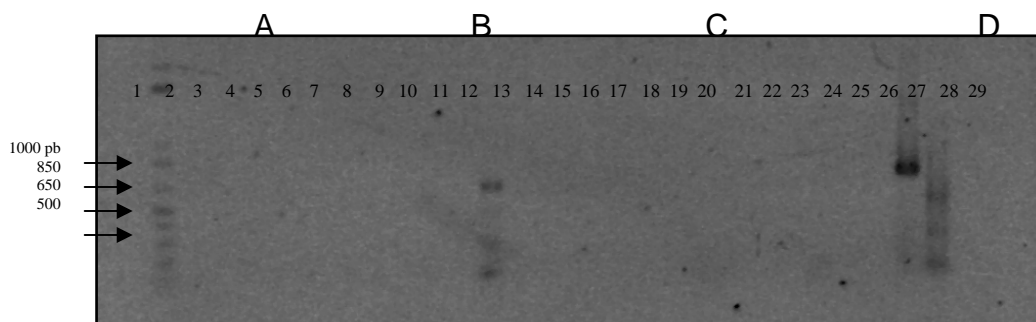


Figura 8. Productos de PCR obtenidos de extractos de DNA de mosquita blanca (MB) y de plantas usadas a través de varias transferencias generacionales. Panel A, Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Leader, carriles del 2 al 6 PCR con los cebadores de Rojas de la primera generación a la quinta de MB; Panel B, carriles del 7 al 11 PCR con los cebadores MOT-CP de la primera generación a la quinta; carril 12 PCR de la población inicial de MB con los cebadores de Rojas; carril 13 PCR de la población inicial de MB con los cebadores MOT-CP; Panel C, del carril 14 al 20 PCR con los cebadores de Rojas de las plantas usadas para producir de la primera a la quinta generación de MB, frijol, algodón, algodón, jitomate y tabaco; Panel D del carril 21 al 25 PCR con los cebadores MOT-CP de las plantas usadas para producir de la primera a la quinta generación de MB, frijol, algodón, algodón, jitomate y tabaco; carril 26 PCR con los cebadores MOT-CP de planta de papa de donde se realizó la colecta inicial de MB, carril 27 PCR con los cebadores de Rojas de planta de papa de donde se realizó la colecta inicial de MB; carril 28 y 29 PCR con los cebadores de Rojas y MOT-CP respectivamente de una planta limpia de Chile.



Curiosamente en el caso de la papa se detectaron geminivirus con los dos tipos de oligonucleótidos, sin embargo en el caso del vector solo se pudo determinar la presencia de geminivirus con el par de oligonucleótidos PAL1V1978-PAR1c496.

Estudios de transmisión de PHYVV y PepGMV.

Para determinar el número mínimo de vectores para transmitir a PHYVV y PepGMV se usaron una o dos mosquitas blancas por planta. Los resultados sugieren que una sola mosquita blanca fue suficiente para transmitir estos geminivirus y causar infección. En la figura 9, se muestra el resultado de la amplificación de ADN indica presencia viral cuando las plantas fueron inoculadas con una sola mosquita blanca infectiva.

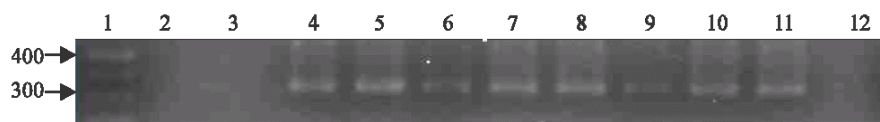


Figura 9. Detección de PHV en plantas infectadas con 1 mosca blanca. PCR con los cebadores 240 y 241, Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen); Carril 2: Control Negativo: Mosca blanca No infectiva; Carriles 4-7: plantas inoculadas con una solo mosquita blanca; Carriles 8-10: plantas inoculadas con dos mosquitas blancas Carril 11: Planta infectada con PHV.

El AAP requerido para la transmisión de PHYVV indica que 1 hora de ingestión fue tiempo suficiente para la adquisición de PHYVV (Tabla 4, Figura 10). El AAP más largo generó la mayor severidad de síntomas observada. Además se observó la menor incidencia para los AAP's de 12 y 24 horas en relación al resto de los tratamientos.



Tabla 4. Efectos de los Periodos de Acceso a la Adquisición-alimentación (AAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PHYVV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca

<i>Periodo de Acceso a la Adquisición-alimentación (AAP) (h)</i>	<i>Severidad del síntoma</i>	<i>Incidencia*</i>	<i>Detección de PHYVV en planta**</i>
48	4±0.30 ^a	18/20±1.0 ^a	Positivo
24	3±0.17 ^{ab}	16/20±0.8 ^{ab}	Positivo
12	3±0.19 ^{ab}	16/20±0.7 ^{ab}	Positivo
6	3±0.27 ^{ab}	17/20±1.0 ^a	Positivo
3	2±0.22 ^{bb}	18/20±0.7 ^a	Positivo
1	2±0.17 ^{bb}	18/20±0.9 ^a	Positivo

Los valores son medias ± su desviación estándar; 4 repeticiones por tratamiento y ($p>0.05$).
* Número de plantas infectadas por tratamiento. **Detección de PHYVV por PCR usando los oligonucleótidos 240 y 241.

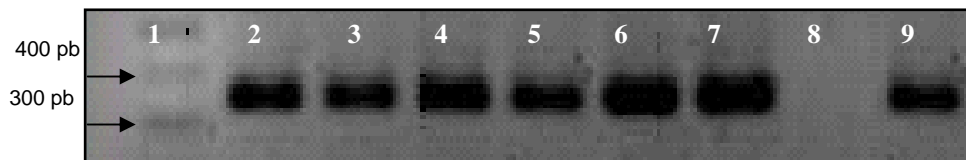


Figura 10. Detección de PHYVV en plantas inoculadas con el vector expuesto a diferentes periodos de adquisición; carriles 1 marcador; 2-7, periodos de adquisición (1, 3, 6, 12, 24, 48 horas respectivamente); 8 control negativo y 9 control positivo.

Fueron requeridas aproximadamente 48 horas para transmitir al PHYVV y PepGMV después de la adquisición (figura 11).

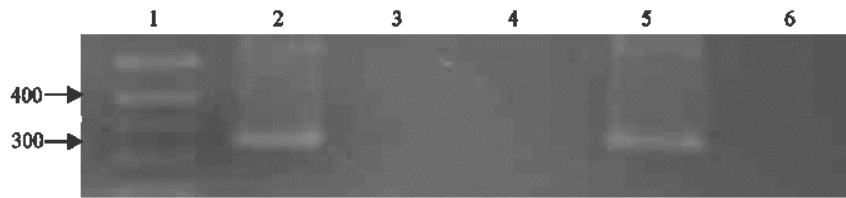


Figura 11. Detección de PHYVV en plantas expuestas a diferentes IAP's con el vector. Carril 1: Marcador molecular 1 kb Ladder; Carriles 2-4: IAP,s de 48, 24 y 12 horas, respectivamente; Carril 5: Control positivo y Carril 6: Control negativo.

Las plantas inoculadas no mostraron síntomas virales y el virus no fue detectado en plantas con IAP's de 12 o 24 horas (Tabla 5, Figura 11). Así como en el caso de PHYVV, PepGMV puede ser ingerido y adquirido por la mosquita blanca con un AAP de 1 hora (figura 12).

Tabla 5. Efectos de los diferentes Periodos de Acceso a la Inoculación (transmisión)-alimentación (IAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PHYVV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca

<i>Periodo de Acceso a la Adquisición-alimentación (AAP) (h)</i>	<i>Severidad del síntoma</i>	<i>Incidencia*</i>	<i>Detección de PHYVV en planta**</i>
48	4±0.02	18/20±0.89	Positivo
24	0±0.00	0/20±0.00	Negativo
12	0±0.00	0/20±0.00	Negativo

Los valores son medias ± su desviación estándar; 4 repeticiones por tratamiento y ($p>0.05$).
* Número de plantas infectadas por tratamiento. **Detección de PHYVV por PCR usando los oligonucleótidos 240 y 241.

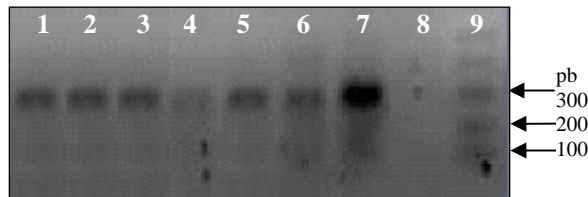


Figura 12. Detección de PepGMV en plantas inoculadas con el vector expuesto a diferentes periodos de adquisición; carriles 1-6: periodos de adquisición (1, 3, 6, 12, 24, 48 horas respectivamente); 7: control positivo; 8: control negativo y 9: marcador de tamaño molecular 1 kb Plus Ladder (Invitrogen).

Estos resultados pueden ser inferidos por la presencia de síntomas y de virus en la planta (Tabla 6). A mayor AAP, mayor severidad. La severidad de la enfermedad fue mayor cuando las plantas fueron inoculadas con PepGMV. Tanto PHYVV como PepGMV pueden ser transmitidos después de 48 horas de IAP.

Tabla 6. Efectos de los Periodos de Acceso a la Adquisición- alimentación (AAP) en la severidad de los síntomas inducidos por PepGMV y la incidencia de la infección por una mosquita blanca

<i>Periodo de Acceso a la Adquisición- alimentación (AAP) (h)</i>	<i>Severidad del síntoma</i>	<i>Incidencia*</i>	<i>Detección de PHYVV en planta**</i>
48	7±0.06 ^a	19/20±a	Positivo
24	6±0.09 ^{ab}	16/20±0.8 ^{ab}	Positivo
12	5±0.09 ^b	18/20±0.7 ^{ab}	Positivo
6	5±0.05 ^b	15/20±b	Positivo
3	5±0.07 ^b	16/20±a	Positivo
1	5±0.08 ^b	14/20±b	Positivo

Los valores son medias ± su desviación estándar; 4 repeticiones por tratamiento y (p>0.05). * Número de plantas infectadas por tratamiento. **Detección de PHYVV por PCR usando los oligonucleótidos 240 y 241.



El objetivo de los ensayos de infección mixta fue determinar si una sola mosquita blanca era capaz de ingerir, adquirir y transmitir a PHYVV y PepGMV, de forma simultánea. Los resultados sugieren que la transmisión simultánea fue posible (Tabla 7, tratamientos 3 y 5; figura 13, panel D y F). En todos los casos, la infección simultánea por ambos geminivirus fue detectada en plantas y vectores.

En el caso de los tratamientos 4 y 5, en la mitad de los vectores se detectó la presencia de PepGMV; sin embargo no fue transmitido a planta. En el tratamiento 3, las plantas fuente de virus contenían la mezcla de PHYVV y PepGMV, y ambos virus fueron ingeridos, adquiridos y transmitidos en proporciones similares. En cambio, en el tratamiento 4 donde solo una planta fuente contenía ambos virus, no todas las plantas fueron infectadas y los virus fueron adquiridos solo por el 50% de los vectores. En el tratamiento 5, donde no hay plantas fuente que contengan ambos geminivirus, la proporción de insectos infectivos y plantas infectadas con PepGMV se redujo.

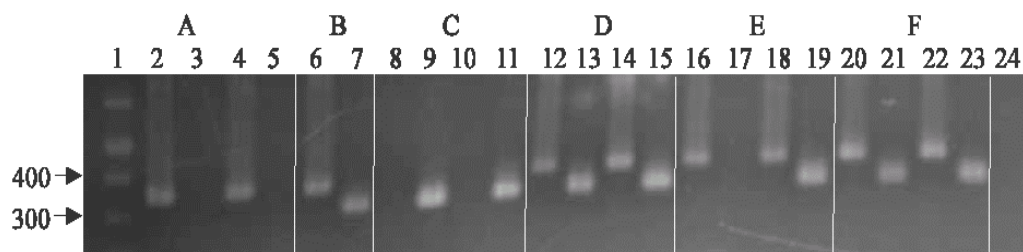


Figura 13. Detección de PHYVV y PepGMV en planta y vector con infecciones mixtas. Carriles pares PHYVV y carriles nones PepGMV, el número menor en cada panel corresponde a la detección en la planta y el mayor en el vector. Carril 1 marcador de peso molecular, Panel A: inoculación con PHYVV; Panel B: carril 6 control positivo de PHYVV y carril 7 control positivo de PepGMV; Panel C: inoculación con PepGMV; Panel D: plantas inoculadas con PHYVV+PepGMV; Panel E: Tratamiento incluyendo plantas inoculadas como sigue: 1planta PHYVV+1 planta PHYVV-PepGMV+1planta PepGMV; Panel F: Tratamiento con 2 plantas inoculadas de la siguiente manera: 1 planta con PHV y 1 con PepGMV y carril 24: control negativo. El tamaño del ADN amplificado es para PHYVV 350 pb y para PepGMV 288pb.



Tabla 7. Efecto de diferentes tipos de plantas fuentes de inoculo en la incidencia* de infección mixta por mosquita blanca.

<i>Tratamientos</i>	<i>PHYVV en planta</i>	<i>PepGMV en planta</i>	<i>PHYVV en mosquita blanca</i>	<i>PepGMV en mosquita blanca</i>
1 PHYVV (control)	18/20 \pm 2.34 ^a	0/20 \pm 0.00 ^c	18/20 \pm 1.56 ^{ab}	0/20 \pm 0.00 ^{cc}
1 PepGMV (control)	0/20 \pm 0.00 ^c	17/20 \pm 1.67 ^a	0/20 \pm 0.00 ^c	20/20 \pm 0.00 ^a
3 PHYVV-PepGMV	19/20 \pm 2.17 ^a	18/20 \pm 1.78 ^a	19/20 \pm 2.24 ^b	19/20 \pm 1.00 ^b
1 PHYVV+ 1 PHYVV- PepGMV + 1 PepGMV	12/20 \pm 1.98 ^b	0/20 \pm 0.05 ^c	20/20 \pm 0.00 ^a	11/20 \pm 1.28 ^{bc}
1 PHYVV + 1 PepGMV	13/20 \pm 2.10 ^b	2/20 \pm 0.07 ^b	20/20 \pm 0.00 ^a	4/20 \pm 2.10 ^c

**Los valores son medias \pm su desviación estándar; 4 repeticiones por tratamiento y ($p>0.05$).
* Número de plantas infectadas por tratamiento. **Detección de PHYVV por PCR usando los oligonucleótidos 240 y 241.**

DISCUSIÓN.

Es importante destacar el hecho de que la temperatura que permite tener aproximadamente 330 UCA en cerca de un mes parece ser lo más adecuado independientemente del hospedero que se use (jitomate o tabaco).

Por otro lado no hay referencia de que geminivirus que infecten a papa pasen a frijol, tal vez por ello como las mosquitas blancas virulíferas se alimentaron de esta leguminosa en el primer paso no la infectaron aunque se haya transmitido. En tal caso, los geminivirus probablemente se replican, pero no son capaces de dispersarse, situación similar a lo que se ha propuesto que ocurre en casos de tolerancia a geminivirus en Chile (Godínez Hernández *et al.*, 2001).



El hecho de que en las moscas blancas y los hospederos usados a partir de la primera generación no se detectó presencia viral sugiere que no hay paso transovarial de los geminivirus.

Si bien en el sistema PHYVV- *C. annuum* c.v. Sonora Anaheim los resultados demuestran que una sola mosquita blanca virulenta es capaz de realizar la infección, no se puede generalizar a otros geminivirus, ya que PHYVV difiere de otros geminivirus en que no es fácil su transmisión mecánica (Garzón-Tiznado et al., 1993) y quizá por eso se haya desarrollado una mayor eficiencia en la transmisión mediada por el vector. La eficiencia de transmisión de geminivirus ha sido previamente ilustrada en la interacción mosquita blanca-tomate- *Virus del enchinamiento y amarillamiento de la hoja del tomate* (TYLCV) (Cubillo et al., 1999). De cualquier forma este dato puede ser relevante para el manejo de la virosis que ocasiona el PHYVV en Chile. Previamente había sido reportado en tomate que 0.3 mosquitas blancas infectivas por planta fueron suficientes para causarle infección con geminivirus (Cubillo et al., 1999).

Los resultados del presente trabajo sugieren que 1 mosquita blanca virulífera es suficiente para causar la infección. También, se determinó que una mosquita blanca, individualmente, puede adquirir y transmitir de forma simultánea a los geminivirus PHYVV y PepGMV. Aun cuando ya se había documentado la existencia de infecciones mixtas por estos geminivirus en Chile (Torres-Pacheco, 1997) no se sabía como se daba el proceso de infección por su vector.

Tanto en PHYVV como en PepGMV se observa que a medida que el AAP fue más largo, mayor fue la severidad. Esto quizá se relacione con el hecho de que la concentración del inóculo induzca un determinado nivel de severidad (Anaya-López, 2003), y este evento se va alcanzando en la medida que el vector tiene más tiempo para alimentarse y así adquirir una mayor cantidad de geminivirus.



El hecho de que estos virus no puedan transmitirse de inmediato confirma que PHYVV y PepGMV como otros geminivirus, son persistentes (Cohen *et al.*, 1983; Harrison, 1985) y se incorporan al sistema circulatorio del insecto en donde todo indica que pudiera ser necesario que se lleve a cabo alguna forma de procesamiento antes de ser transmitidos a la planta hospedera.

En los tratamientos donde se evaluaron AAP's, en los cuales la fuente de inóculo contenía uno de los virus, o bien cuando todas las plantas fuente de inóculo contenían a los dos virus, se observó un comportamiento similar entre el PHYVV y el PepGMV. Sin embargo, cuando la fuente de inóculo consistió en plantas que podían tener a los dos virus por separado, la eficiencia de adquisición y transmisión de PepGMV se redujo, lo que sugiere una preferencia en la adquisición y transmisión de PHYVV en plantas de Chile. Esto quizá se deba a una mayor afinidad entre el PHYVV y el Chile, en comparación con la de PepGMV y la misma planta hospedera. A este respecto existen reportes en los que se ha señalado que en Chile, el PHYVV es capaz de complementar las funciones que implican al componente B de PepGMV, pero no a la inversa (Torres-Pacheco, 1997; Méndez-Lozano *et al.*, 2003).

Como el componente B de geminivirus aporta funciones relacionadas con el movimiento (Lazarowitz, 1992; von Arnim and Stanley, 1992), es posible que esto permita una mayor facilidad de movimiento al PHYVV en plantas de Chile que en el caso de PepGMV. En base a nuestros resultados probablemente lo anterior pueda deberse a una mayor disponibilidad de factores que pudieran interactuar en el movimiento de PHYVV en las diferentes partes de la planta. De ser así, eso podría explicar no sólo que se pueda transmitir más fácilmente el PHYVV a plantas de Chile, sino que también puede ser adquirido más fácilmente por el vector.



De tal forma que la infección mixta de PHYVV y PepGMV estaría favoreciendo la adquisición y transmisión de este último, y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile. Adicionalmente, la proteína de la cápside de los geminivirus juega un papel importante en la transmisión de PHYVV y PepGMV como también ha sido reportado en otros geminivirus (Brown *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1983).

Este estudio constituye un esfuerzo para entender la biología de las infecciones mixtas de geminivirus por mosquita blanca en la naturaleza.

Bibliografía

Anaya-López, J.L., I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, J.A. Garzón-Tiznado and J. L. Pons-Hernández. (2003). Resistente to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience* 38 (2): 251-255.

Ascencio-Ibañez, J.T., G.R. Argüello-Astorga, J. Méndez-Lozano and R.F. Rivera-Bustamente. (2002). First report of *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86 (6): 692.

Avila Valdez, J. e Hinojosa Reyes, I. (2000). Manejo Integrado de Mosca Blanca. Folleto Técnico Num. 16. INIFAP- Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Pags.4-10 y 16-27.

Brown, J.K., Campodiónico, O.P. & Nelson, M. R. (1989). A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tigre disease.(Abstract). *Plant Disease* 73, 610.



Cohen, S.R., Duffus, R.C. Larsen, H.Y. Liu and R.A. Flock, (1983). Purification, serology and vector relationships of *Squash leaf curl virus*, a whitefly-transmitted geminivirus. *Am. Phytopathol. Soc.*, 73(12): 1669-1673.

Cohen S. (1990). Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En "Whiteflies: their bionomics, pest, status and management". Pags. 211-225. Ed. Gerling, D. Intercept Ltd, U.K.

Cohen, A.C., Chu, C.C., Henneberry, T. Freeman, D. Nelson, J. Buckner, D. Margosan, P. Vali and L.H. Aung. (1998). Feeding biology of the whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Chin. J. Entomol.*, 18 (2): 65-82.

Cubillo, D., G. Sanabria and L. Hilje. (1999). Efficiency of live protection in whiteflies management in tomato. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. No. 51: 10-20.

Dellaporta, S. L., Woods, J. and J.B. Hicks. (1983). A plant minipreparations, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

Freeman, T.P., J.S. Buckner and D.R. Nelson. (2000). Stylet length of whitefly adults and nymphs and the mechanism of stylet insertion in to the leaves on host plants. *Microsc. Microanal.*, 6 (2): 876-877.

Garzón-Tiznado, J.A., R.F. Rivera-Bustamente, L. Herrera-Estrella, F. Delgadillo-Sánchez and O. Pozo-Campodiónico. (1989). Estudio preliminar sobre el rizado amarillo del chile (*Capsicum annum* L.) en el sur de Tamaulipas. Un geminivirus. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Edo. De México.



Garzón-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella and R. Rivera Bustamante. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biobalistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.

Garzón-Tiznado, J. A. (1998). Geminivirus transmitidos por mosquita blanca. En: Temas Selectos para el Manejo Integrado de la Mosquita Blanca. Memoria Científica Num. 6. INIFAP- Centro de Investigación Regional del Noreste. 93-112.

Ghanim M., Morin, S., Zeidan, M. and Czosnek H. (1997).Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240: 295-303.

Godínez-Hernández, Y., J.L. Anaya-López, R. Díaz-Plaza, M. González-Chavira, R.F. Rivera-Bustamante, I. Torres-Pacheco and R.G. Guevara-González. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience* 36: 139-142.

Hannley-Bowdoin, L., S.B., B.M. Orozco, S. Nagar and D. Robertson. (1999). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18(1): 71-106.

Harrison, B.D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23: 55-82.

Hunter, W.B., Hierbert, E., Webb, E., Tsai, J. H. and Polston, J. E. (1998). Location of Geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease*, 82: 1147-1151.



Lazarowitz, S. G. (1992). Geminiviruses: genome and structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science* 11: 327-349.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. and Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 20-277.

Montgomery, D.C. (1991). Design and Analysis of Experiments. DF. México. Grupo Editorial Iberoamericana, pp:589.

Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell and D.P. Maxwell, (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77(4):340-347.

Soto, M. J. and Gilbertson, R. L. (2003). Distribution and rate of movement of the curtovirus *Beet mild curly top virus* (Family *Geminiviridae*) in the beet leafhopper. *Phytopathology* 93: 478-484.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brow, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and Distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

Torres-Pacheco, I. (1997). Geminivirus involucrados en el “rizado amarillo” del chile: Interacciones entre PHV y TPV. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato.



Vera Aguado, M. G. (2002). Detección de virus en jitomate (*Lycopersicon lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*) y maleza, en los diferentes ambientes de cultivo en México. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya.

Von Arnim, A. & Stanley, J. (1992). Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* 186: 286-293.



CAPÍTULO II

Análisis de la acumulación de los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* en plantas de Chile y en el vector *Bemisia tabaci*.

Antecedentes.

La mayoría de los virus fitopatógenos son transmitidos por insectos vectores, entre los cuales destacan los hemípteros que incluyen a los áfidos, chicharritas, mosquitas blancas y trips (Hogenhout *et al*, 2008). Las interacciones entre estos virus y su rango de vectores pueden ir desde interacción mínima vector-insecto hasta tener una interacción molecular que incluye la transmisión circulativa, la cual consiste en movimiento del virus del intestino a la hemolinfa y su regreso al aparato bucal, específicamente a las glándulas salivales y transmisión propagativa que comprende la transcripción y replicación viral dentro del vector (Nault, 1997).

Uno de los factores más importantes implicados en la diseminación de virus es la cantidad de partículas virales introducidas a la planta hospedera a través de un vector. Para el caso del cultivo de jitomate inoculado con el virus de la marchitez manchada (TSWV) se ha reportado que fue afectado de manera diferente tanto en incidencia como en el rendimiento con diferentes cantidades de inóculo viral, situación que se ha demostrado también con plantas transgénicas (Moriones *et al.*, 1998).

En el caso de virus transmitidos por mosquita blanca, la introducción y asentamiento de poblaciones de estos insectos, ha conllevado a la aparición y/o intensificación de epidemias (Czosnek y Laterrot, 1997; Wisler *et al.*, 1998).



Este grupo de insectos, en especial *Bemisia tabaci*, han estado asociadas a la transmisión de virus pertenecientes al género *Begomovirus* pero también a la de virus de los géneros *Crinivirus*, *Carlavirus*, *Ipomovirus*, *Luteovirus* y *Nepovirus* (Duffus *et al.*, 1996; Matthews, 1991).

Ha sido reportado que 0.3 adultos por planta es la cantidad mínima de moscas blancas para que los virus sean diseminados rápidamente en un cultivo (Cubillo *et al.*, 1999).

En el caso de la infección por el virus del moteado amarillo del tomate (ToYMoV) a plantas de tomate evaluada con diferentes densidades de vector *B. tabaci* se reportó que no hay una relación entre la severidad de la enfermedad y la concentración relativa de ADN viral en los tejidos vegetales (obtenida por hibridación de ácidos nucleicos) (Ramírez y Rivera-Bustamante, 1996; Salazar *et al.*, 1998).

Para el caso del geminivirus PHYVV, usando biobalística como método de inoculación y cuantificando por densitometría de imagen, se determinó que existen variedades de Chile que presentan resistencia asociada a baja concentración viral, mientras que las variedades susceptibles tienen una alta concentración de ADN viral (Hernández-Verdugo, 2001).

Dado que de manera recurrente se han encontrado geminivirus infectando plantas en forma mixta es importante el análisis de este complejo de transmisión. En infecciones mixtas de PHYVV y PepGMV, realizadas por biobalística e injerto, se encontraron niveles de severidad mayores que los obtenidos en infecciones simples, y se observó que la severidad de los síntomas estaba estrechamente asociada con los niveles de ADN viral (Anaya-López *et al.*, 2003 a y b).



Usando la técnica de biobalística en ensayos de cantidad de inóculo viral con PHYVV, se reportó una inducción de la expresión de incidencia y severidad, siendo cuantificada la concentración viral de manera relativa con pruebas de ELISA (López-Martínez *et al*, 2004).

En el sistema de interacción de los geminivirus PHYVV y PepGMV con plantas de Chile, cuando son transmitidos por el vector *B. tabaci*, de forma simple y/o en mezcla hace falta información acerca de la relación de la severidad e incidencia de la infección con la concentración viral y densidad de vectores. En ningún estudio de este patosistema PHYVV-PepGMV-Chile, se ha utilizado al vector para hacer la inoculación. Además la concentración viral se ha determinado de manera indirecta.

Una de las técnicas usadas en la detección y cuantificación de patógenos es la PCR. En el caso de plantas, la aplicación de la técnica de la PCR para el diagnóstico de enfermedades se ha centrado en organismos en los cuales los patógenos no pueden ser fácilmente detectados. Entre las ventajas que presenta esta técnica es su sensibilidad, rapidez y potencial para la detección de varios patógenos simultáneamente. Un ejemplo del uso de esta técnica es la detección del virus del rizado de la hoja del tomate (TYLCV) en *Bemisia tabaci* (Khan JA, 2000). Además, la variante de esta técnica conocida como PCR en tiempo real facilita un monitoreo dinámico (ciclo a ciclo) de la reacción de PCR permitiendo la cuantificación del ácido nucleico presente en la muestra y de esta forma conocer la concentración del patógeno de interés en los tejidos del huésped o del vector (Mackay *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido usada para monitorear posibles epidemias de TYLCV (Morris y Malumphy, 2003).



Otro aspecto relevante es el análisis de los sistemas de interacción virus-vector y la posible capacidad del vector para replicar el virus, ya que esto los convertiría en reservorios virales. Existen reportes de una posible replicación del SLCV en *B. tabaci* (Cohen *et al.*, 1983; Rosell *et al.*, 1999). En el caso del virus TYLCV, hay contradicción en cuanto a su capacidad de replicación en su vector mosquita blanca (Ghanim *et al.*, 1998). Se ha determinado la concentración de TYLCV en su vector *B. tabaci* usando la técnica cuantitativa de PCR en tiempo real donde surge la posibilidad de que este virus aumente su concentración después de finalizar su AAP (Caciagli y Bosco, 1997).

También importante es el hecho de que en los estudios del sistema PHYVV y PepGMV-plantas de Chile transmitidos por el vector *B. tabaci*, de forma simple y/o en mezcla, es que no se ha realizado la cuantificación viral en su insecto vector. En general, hay muy poca información de infecciones mixtas de geminivirus en reportes previos (Anaya-López, 2003 b).

Objetivo.

Evaluar el efecto de la densidad de vector en la severidad de los síntomas, en la incidencia de infección y en la acumulación de ADN viral, tanto en infecciones simples como en la infección mixta PHYVV-PepGMV de *Capsicum annuum* y evaluar también el efecto de los periodos de latencia en la concentración viral en el vector.



Materiales y métodos.

Materiales biológicos: Se usaron clonas infecciosas de PHYVV y PepGMV tratadas como se describió en el capítulo anterior. Las plantas usadas fueron chiles de la variedad Sonora Anaheim. Las plantas que se usaron como fuente de virus fueron obtenidas como se indica en el capítulo anterior y se reporta en Medina-Ramos *et al.* (2008). Igualmente, los insectos vectores fueron obtenidos de una colonia de mosquita blanca *Bemisia tabaci* (biotipo B) establecida como se describió en el capítulo I y como se reportó en Medina-Ramos *et al.* (2008).

Severidad, incidencia y concentración de geminivirus PHYVV y PepGMV en plantas de Chile. Se usaron las siguientes densidades o cantidades de vectores por planta 1, 2, 4, 8, 16 y 32 y se usaron diferentes fuentes de inóculo: a) PHYVV, b) PepGMV y c) Mezcla PHYVV-PepGMV. Se generaron por lo tanto 18 tratamientos. Las mediciones se realizaron a los 5, 15 y 30 días posteriores a la inoculación.

Efecto del periodo de latencia en la acumulación de PHYVV y PepGMV en la mosquita blanca. Se evaluaron los siguientes periodos: 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación del virus en mosca blanca posteriores al AAP (1 hora). También se usaron diferentes fuentes de inóculo: a) PHYVV, b) PepGMV y c) Mezcla PHYVV-PepGMV. Se generaron 24 tratamientos.

Diseño experimental. Por cada tratamiento se establecieron 4 repeticiones con grupos de 5 individuos, para dar un total de 20. El arreglo dentro de las cámaras de crecimiento fue completamente al azar.



Condiciones generales para los eventos de adquisición y transmisión.

A. En plantas. Las mosquitas fueron puestas en contacto con las plantas fuente de virus, para permitir la adquisición del virus con un AAP de 24 horas. Posterior a este periodo las mosquitas, ahora infectivas, se pasaron de forma individual a una planta de chile sana para realizar el proceso de transmisión, el IAP fue de 48 horas. Estos se llevaron a cabo dentro de una estructura consistente de un recipiente cilíndrico de plástico cuyo diámetro era de 11 cm. y con 15 cm. de altura. Uno de los extremos del recipiente se unió haciéndolo coincidir sobre una maceta con sustrato cuyo diámetro coincidente era de 12 cm., con un volumen de 628.32 cm³ y una sola planta creciendo en ella.

Posterior al periodo de transmisión se retiraron las mosquitas de las plantas. Estas últimas fueron trasladadas a la cámara de crecimiento y mantenidas durante 30 días para permitir la incubación del virus. Las condiciones temperatura, humedad relativa y fotoperiodo mantenidas durante el experimento fueron de 24°C, 70 % y 12 horas luz/día, respectivamente.

B. En el vector mosquita blanca *B. tabaci*. Las mosquitas fueron puestas en contacto con las plantas fuente de virus o plantas de chile hospederas, de manera individual, para permitir la adquisición del virus con un AAP de 1 hora.

Posterior al periodo de transmisión se retiraron las mosquitas de las plantas. Los insectos fueron puestos individualmente en un contenedor de cristal de 1 cm de diámetro y 5 cm de alto, y fueron trasladados a la cámara de crecimiento y mantenidas a diversos periodos de latencia estudiados. Las condiciones temperatura, humedad relativa y fotoperiodo mantenidas durante el experimento fueron de 24°C, 70 % y 12 horas luz/día, respectivamente.



Medición de las variables de respuesta. Las variables medidas fueron: a) severidad de síntomas, b) incidencia de la infección y c) acumulación viral.

La detección de la presencia de PHYVV y PepGMV en la planta y en el insecto se hizo por medio de la PCR. Para la detección de PHYVV se usaron los primer's 240 (5' GGCTTATTTGTAATAAGAGAGGTGT 3') y 241(5'GAATTAAAGGTACATGGACCACTT 3') que amplifican una región de ≈350 pb. Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización 94 °C, 1 min; Hibridación 55 °C, 1 min; Extensión 72 °C , 2 min; durante 35 ciclos. La detección de PepGMV se usaron los primer's JM23 (5' TGGTGTAGGACTCCAGCAGAGTC 3') y JM24 (5' TAGGCCACACCTTGGTGACCAAG 3') que amplifican una región de ≈ 288 pb. Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización 94 °C, 1 min; Hibridación 52 °C, 1 min; extensión 72 °C, 2 min; durante 35 ciclos. El análisis electroforético fue en gel de agarosa (1%, 80 volts, 1 hora).

La severidad de la infección fue medida en base a la escala de síntomas reportada por Godínez-Hernández *et al* (2001). La incidencia corresponde al número de plantas infectadas por tratamiento.

Concentración viral. La cuantificación de los virus PHYVV y PepGMV en planta e insecto se realizó por PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (rtPCR) usando oligonucleótidos específicos para cada virus (para PepGMV: oligonucleótido sentido, 5'GGATTTTGGTGGTAGTGGCATT3'; oligonucleótido antisentido, 5'GGACTCCACAACATATGACAGAAGT3'; Secuencia de sonda reportero Taqman, 5'-FAM dye-CAAATATGGTGTAGGACTCC-NFQ-3'. Para PHYVV: oligonucleótido sentido, 5'TGAAATTAACATAAGTGGTCCATGTACCT 3'; oligonucleótido antisentido, 5'CCGTTAATCGCCAAGGAGCAT 3'; Secuencia de sonda reportero Taqman, 5'-FAM dye-CACGCTTAGGCATTTTGAATT-NFQ-3' en un termociclador para rtPCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).



Análisis estadístico. Los datos correspondientes fueron sujetos a un análisis de varianza usando el modelo general lineal con el método SAS.

Extracción de ADN vegetal. Fue realizada 30 días posteriores a la inoculación y se usó el método de Dellaporta (1983), usando 4 discos de hoja de 0.5 cm de diámetro por muestra.

Extracción de ADN de insecto. Después de cumplir el periodo de latencia evaluado, los insectos fueron colectados y mantenidos a -70°C para su posterior extracción de ADN. Para esta se usó el Kit DNeasy Tissue (Qiagen). Para la disrupción del insecto se hizo en 180 μl de Buffer de Fosfatos pH 7.0 y se utilizó para ello un homogenizador eléctrico. La extracción fue hecha de manera individual.

Resultados y Discusión.

A. Incidencia de infección por efecto de los geminivirus PHYVV y PepGMV en plantas de Chile.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de incidencia de la infección, medidos a los 30 días post-inoculación, en estos se puede observar que 8 insectos son suficientes para inducir el mayor porcentaje de infección y también, contra lo esperado, que con 32 insectos la incidencia es menor en infecciones individuales.

Pareciera que la presencia de ambos virus, en infecciones mixtas, tiene el efecto de aumentar la incidencia de la infección.



Tabla 8. Efecto de la densidad de vector (carga viral) en la incidencia* de infección por PHYVV y PepGMV a plantas en Chile cv. Sonora Anaheim transmitidos por mosca blanca.

Inóculo	NÚMERO DE INSECTOS VECTORES					
	1	2	4	8	16	32
PHYVV	18/20±0.74	18/20±0.89	18/20±1.28	20/20±0.00	20/20±0.00	16/20±1.17
PepGMV	16/20±0.40	16/20±0.67	16/20±0.98	20/20±0.00	20/20±0.00	18/20±0.83
PHYVV-PepGMV	16/20±1.10	16/20±0.77	18/20±0.88	20/20±0.00	20/20±0.00	20/20±0.00

Los valores son medias ± su desviación estándar; 4 repeticiones por tratamiento ($p > 0.05$).

*Número de plantas infectadas por tratamiento.

Lo anterior puede deberse a que los geminivirus se multiplican en el núcleo, en donde la expresión y la regulación de sus genes es dependiente de factores de la célula hospedera (por ejemplo ADN y ARN polimerasas, factores transcripcionales, etc.). Lo que implica una alta dependencia de los procesos equivalentes de su hospedero (Torres-Pacheco, *et al.*, 1996). Por ello, probablemente, el resultado observado se deba a una competencia por los sitios de la membrana nuclear y de los plasmodesmos. Al existir una competencia por dichos sitios, probablemente llegan a interferirse dando como resultado una baja eficiencia de la interacción virus-célula.

B. Severidad de síntomas por la infección de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile.

Las plantas infectadas en los diversos tratamientos fueron evaluadas en la severidad de síntomas presentados durante un periodo de 30 días, a lo largo del cual los niveles de severidad aumentaron paulatinamente. En la Tabla 9 se muestra un resumen de los niveles de severidad, a los 30 días, para los diferentes inóculos probados.



Para PHYVV inoculado individualmente, la mayor severidad se encontró con 8 vectores dando un grado de severidad de 5 y el menor grado de severidad, 2, se encontró con 1 vector, lo cual muestra una diferencia significativa (Tabla 8).

Tabla 9. Efecto de la densidad de vector (carga viral) en la severidad de infección por PHYVV, PepGMV y la mezcla de ambos, a plantas de chile cv. Sonora Anaheim transmitidos por mosca blanca.

Inóculo Viral	Número de insectos vectores					
	1	2	4	8	16	32
PHYVV	2±0.04 ^a	2±0.09 ^b	3±0.08 ^b	5±1.00 ^b	5±0.09 ^b	4±0.04 ^a
PepGMV	2±0.08 ^b	3±0.06 ^{ab}	5±0.08 ^b	6±0.07 ^a	6±0.08 ^{ab}	5±0.05 ^{ab}
PHYVV-PepGMV	2±0.08 ^b	2±0.05 ^a	4±0.05 ^a	5±0.08 ^{ab}	5±0.06 ^a	4±0.07 ^b

Los valores medios ± su desviación estándar; 4 repeticiones ($p>0.05$).

En forma similar, cuando PepGMV fue inoculado individualmente, la mayor severidad se encontró con 8 vectores dando un grado de severidad de 6 y el menor grado de severidad, 2, se encontró con 1 vector (Tabla 9). Estos resultados concuerdan con el comportamiento de severidad cuando los virus se inoculan simultáneamente (Tabla 9).

Este comportamiento de la característica de la severidad de síntomas, donde al parecer hay una máxima con una densidad de vector de 8, es similar al reportado para el virus del moteado del tomate (ToMoV) en el cual se determinó como afecta la densidad de adultos virulíferos de mosca blanca el desarrollo del síndrome, en el que a partir de 25 adultos la severidad se estabiliza (Salazar *et al.*, 1998).

De manera similar a los resultados de incidencia, con una menor densidad de vectores se indujo un mayor grado de severidad. Esto puede ser debido a la existencia de una competencia de tipo alostérica con las cargas virales mas altas (32 insectos) y en cambio con cargas virales mas bajas sea mas fácil el acceso a los sitios de reconocimiento para que se de la interacción entre el geminivirus y la planta.



En base a los resultados obtenidos, en cuanto severidad, en los sistemas geminivirus-chile se observó que no existe una correlación entre la cantidad de virus y la severidad del síndrome en las condiciones en que se llevó a cabo el ensayo. Y de manera especulativa se puede decir que pocos vectores ocasionan una manifestación importante de los síntomas de la enfermedad y que la presencia de muchos vectores puede no tener importancia agronómica, en una época y en una región determinada (Mann, *et al.*, 1997).

C. Concentración de PHYVV y PepGMV en plantas de Chile.

Los resultados de concentración viral obtenidos con PCR en tiempo real (Tabla 10) muestran que cuando se inoculó sólo con PHYVV con una densidad de vector de 32 moscas blancas, se indujo una mayor concentración de ADN viral en la planta. Mientras que cuando fue inoculado en mezcla, la mayor concentración viral fue alcanzada con una densidad de vectores de 16 moscas blancas.

Tabla 10. Cuantificación de la carga viral de PHYVV en plantas en Chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca.

DPI*	Número de insectos vectores											
	1		2		4		8		16		32	
	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix
5	2.66±0.7	1,96±1.45	3.19±0.58	2,26±0.97	1.67±1.44	2,23±0.65	4.34±0.29	2,09±0.2	2.70±0.1	2,22±0	3.17±0	2,76
4								3	7	.81	.108	±0.69
15	5.77±0.5	3,22±0.88	9.09±0.72	6,16±0.63	2.94±0.38	3,81±1.12	5.33 ±0.57	8,18±1.0	4.18±0.5	9,49	11.29	4,74±0.
6								7	4	±0.66	±0.47	83
30	6.24±1.1	5,40±0.47	10.07±0.99	9,92±1.53	16.70±0.17	4,33±0.49	8.01 ±0.22	11,24±0.	9.21±1.4	12,25±	54.45±	7,69
1								48	2	0.38	0.26	±1.02

*Días post-inoculación.

Las concentraciones virales están dadas $g \times 10^{-8}$

Los valores medios \pm su desviación estándar; 4 repeticiones ($p > 0.05$).

En el caso de los tratamientos con PepGMV (Tabla 11), la mayor concentración viral se indujo con 2 moscas blancas cuando fue inoculado de manera individual, y con 8 moscas blancas cuando fue inoculado en mezcla con PHYVV.



Tabla 11. Cuantificación de la concentración viral de PepGMV en plantas en chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca.

DPI*	NÚMERO DE INSECTOS VECTORES											
	1		2		4		8		16		32	
	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix
5	14.3±0.74	24.2±0.56	15.1±0.86	13.3±0.44	13.1±0.24	15.4±0.33	12.8±0.99	23.0±0.58	11.5±0.47	14.5±0.66	10.9±0.95	21.1±0.96
15	16.9±1.47	33.1±0.93	20.2±0.79	19.7±0.63	18.9±0.46	16.1±0.49	13.4±0.86	62.2±0.41	12.7±0.92	18.9±0.48	11.0±1.44	24.8±0.78
30	18.7±0.88	61.7±0.32	22.0±1.21	25.4±0.97	19.2±0.91	18.6±0.66	17.3±1.04	63.5±0.46	17.1±0.24	20.7±0.57	11.5±0.22	26.9±1.04

*Días post-inoculación.
 Las concentraciones virales están dadas $g \times 10^{-8}$
 Los valores medios \pm su desviación estándar; tres repeticiones ($p>0.05$).

Estos datos no están relacionados de manera directamente proporcional con el efecto observado en el caso de severidad, ya que si bien con la inoculación con 8 insectos se tuvo mayor eficiencia en la severidad, no se observó lo mismo en cuanto a la concentración viral. En la tabla 12 se muestra a manera de resumen las concentraciones virales de PHYVV y PepGMV en plantas de chile.

Tabla 12. Cuantificación de la concentración viral de PHYVV y PepGMV en plantas en chile cv. Sonora Anaheim transmitido por mosca blanca a los 30 días post-inoculación.

Geminivirus	Número de insectos vectores											
	1		2		4		8		16		32	
	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix	Ind	Mix
PHYVV	6.24±1.1	5.40±0.47	10.07±0.99	9.92±1.53	16.70±0.17	4.33±0.49	8.01 ±0.22	11,24±0.	9.21±1.4	12,25±	54.45±	7,69
	1							48	2	0.38	0.26	±1.02
PepGMV	18.7±0.8	61.7±0.32	22.0±1.21	25.4±0.97	19.2±0.91	18.6±0.66	17.3±1.04	63.5±0.4	17.1±0.2	20.7±0	11.5±0	26.9±1.
	8							6	4	.57	.22	04

Las concentraciones virales están dadas $g \times 10^{-8}$
 Los valores medios \pm su desviación estándar; 4 repeticiones ($p>0.05$).

Una posible explicación a este fenómeno sería que la inoculación con una menor densidad de vectores es más eficiente en términos físicos y mecánicos, mientras que una inoculación con una mayor densidad de vectores es más eficiente e términos de eventos de inoculación.



D. Concentración de PHYVV y PepGMV en la mosquita blanca *B. tabaci* por efecto del periodo de latencia.

En el Tabla 13 se muestran los resultados de concentración viral en el vector usando la técnica de PCR en tiempo real. De manera interesante se observa que la concentración de PHYVV y PepGMV dentro del vector es variable, lo cual podría implicar que estos geminivirus se replican en la mosca blanca durante el proceso de incubación (latencia) antes de ser transmitidos a las plantas hospederas.

En el caso de PHYVV se observa que la mosca blanca tiene una mayor concentración viral a las 12 horas después de haber adquirido el virus de manera individual de una fuente de inóculo; mientras que cuando la adquisición de virus PHYVV se hizo de una fuente de inóculo que contenía a la mezcla de virus, el tiempo al cual se encontró la mayor concentración viral fue a las 72 horas.

En el caso de PepGMV se detectó la mayor concentración viral a las 6 horas después de haber adquirido el virus de manera individual; mientras que cuando la adquisición de virus se hizo de una fuente de inóculo que contenía a la mezcla, el tiempo al cual se encontró la mayor concentración viral disminuyó a 4 horas.

Tabla 13. Cuantificación viral en mosca blanca.

Periodo de incubación (horas)	CARGA VIRAL			
	PHYVV Infección individual	PHYVV Infección mixta	PepGMV Infección individual	PepGMV Infección mixta
0	4,59 ±0.86	1,91±0.39	1.73±0.81	3,78 ±0.42
2	6,12 ±0.42	1,95 ±0.19	8.53±0.96	0,02*±0.93
4	5,39 ±1.08	4,63 ±0.88	9.13±0.76	0.18 *±0.87
6	4,42±0.48	5,50 ±1.04	14.68±0.86	0,03*±0.54
12	19,70±0.69	11,50±0.91	7.99±0.37	7,56±1.12
24	1,28 ±1.19	1,57±0.45	6.30±0.49	0,09*±0.99
48	4,71 ±0.98	3,68 ±0.68	5.06±0.45	0,02*±0.83
72	5,52 ±0.23	64,25±0.38	1.09±0.62	0,05*±0.85

Las concentraciones virales están dadas $\times 10^7$ g y en * están dadas en g.
Los valores medios \pm su desviación estándar; 4 repeticiones ($p > 0.05$).



Estos resultados muestran que la concentración de partículas virales dentro del vector no es constante, es decir hay un comportamiento definido en PHYVV y PepGMV en adquisición individual en el cual la concentración llega a un punto máximo y luego decae. Este mismo comportamiento se observa para PepGMV adquirido de manera mixta, pero aquí se acorta el tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima. Tal pareciera que la presencia de PHYVV en la fuente de inóculo potencia a PepGMV, mientras que se observa un efecto contrario para PHYVV, porque la presencia de PepGMV en la fuente de inóculo alarga el periodo en el cual se alcanza la mayor concentración viral.

Estos resultados corresponderían al hecho de que los geminivirus son virus del tipo persistente y se incorporan al sistema circulatorio del vector en donde todo indica que es necesario se lleve a cabo alguna forma de procesamiento para que la transmisión a la planta hospedera se pueda realizar.

Estos resultados parecen reforzar los obtenidos en los tratamientos expuestos en el capítulo anterior, donde se señala la probabilidad de que la adquisición y la transmisión de PHYVV son más eficientes debido a una mayor afinidad entre el hospedero y el patógeno. Además de los reportes en los que se ha señalado que en Chile, PHYVV es capaz de complementar las funciones que implican al componente B de PepGMV, pero no al revés (Torres-Pacheco, 1996; Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Como el componente B de geminivirus aporta funciones relacionadas con el movimiento (Lazarowitz, 1992; von Arnim and Stanley, 1992), es posible que esto permita una mayor facilidad de movimiento al PHYVV en plantas de Chile que al PepGMV.



En base a nuestros resultados, lo anterior podría deberse a una mayor disponibilidad de factores que interactúan en el movimiento de PHYVV en las diferentes partes de la planta. De ser así, eso podría explicar no sólo que se pueda transmitir más fácilmente el PHYVV a plantas de Chile, sino que también puede ser adquirido más fácilmente por el vector. De tal forma, que la infección mixta de PHYVV y PepGMV estaría favoreciendo la adquisición y transmisión de este último, y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile.

Además la posibilidad de que estos geminivirus se repliquen dentro del vector, convertiría a las moscas blancas en reservorios virales y la implicación de este hecho en la diseminación de la infección sería muy importante.

Bibliografía

Anaya-López, J.L., I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, J.A. Garzón-Tiznado and J. L. Pons-Hernández. 2003 a. Resistente to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience* 38 (2): 251-255.

Anaya-López, J.L., Godínez-Hernández, Y., Muñoz-Sánchez, C.I., Guevara-Olvera L., Guevara-González R.G., Rivera-Bustamante, R.F., González-Chavira, M. y Torres-Pacheco, I. 2003 b. Identificación de Resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del Chile (PepGMV) y el virus huasteco del Chile en plantas de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(2):225-234.

Brown, J.K., Campodiónico, O.P. & Nelson, M. R. 1989. A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tigre disease. (Abstract). *Plant Disease* 73, 610.



Caciagli, P. And Bosco, D. 1997. Quantitation Over Time of tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* 87(6):610-613.

Cohen, S., Duffus, J.E., Larsen, R.C., Iiu, H.Y. and Flock, R.A. 1983. Purification, serology and vector relationships of squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 73: 1669-1673.

Cubillo, D.; Sanabria, G.; Hilje, L. 1999. Eficacia de coberturas vivas al suelo para el manejo de *Bemisia tabaci* como vector de geminivirus en jitomate. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 51:10-20.

Czosnek, H., Laterrot, H. 1997. A worldwide survey of Tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology*, 142:1391-1406.

Duffus, J.E. (1996). Whitefly-borne viruses. En: "Bemisia 1996: Taxonomy, biology, damage, control and management". Pp:255-263. Ed. Gerling D., Mayer, R.T. Intercept Ltd., U.K.

Garzón-Tiznado, J.A., R.F. Rivera-Bustamente, L. Herrera-Estrella, F. Delgadillo-Sánchez and O. Pozo-Campodionico.1989. Estudio preliminar sobre el rizado amarillo del chile (*Capsicum annuum* L.) en el sur de Tamaulipas. Un geminivirus. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Edo. México.

Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H. 1998. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 240:295–303.



Godínez-Hernández , Y., Anaya-López, J.L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante R.F. and Guevara-González R.G. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chilli peppers from Yucatán, México. *Hortscience* 36: 139-142.

Hernández-Verdugo S., Guevara-González R.G., Rivera-Bustamante R.F. and Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations.

Hogenhout, S.A., Ammar, E., Whitfield, A.E. and Redinbaugh M.G. 2008. Insect vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:327-359

Khan JA. 2000. Detection of Tomato leaf curl geminivirus in its vector *Bemisia tabaci*. *Indian J Exp Biol.* 38 (5): 512-515.

Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: genome and structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science* 11: 327-349.

López- Martínez, N.A., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R.G., González-Chavira, M. Mora-Avilés, M.A., Reynoso-Camacho, R., Garzón-Tiznado, J.A. y Rivera-Bustamante, R. (2004). Influencia de algunos factores en la interacción gemnivirus-chile. En memorias: First World Pepper Convention 82-91.

Lozano, G., Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2003. First Report of Sweet Pepper (*Capsicum annuum*) as a Natural Host Plant for *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 88:224.



Mackay I.M., Arden, K.E. and Nittsche A. 2002. Nucleic Acids Research 30 (6): 1292-1305.

Mann J.A., Harrington R., Carter N., Plumb R.T. 1997. Control of aphids and barley yellow dwarf virus in springsown cereals. *Crop protection* 16 (1): 81-87.

Matthews, R.E.F. (1991). Definition of a virus. *Plant Virology*. Third Edition. Academic Press. Pg. 8.

Medina-Ramos, G; De La Torre-Almaráz, R; Bujanos-Muñiz, R; Guevara-González, R.G; Tierranegra-García, N; Guevara-Olvera, L; González-Chavira M.M; & Torres-Pacheco, I. (2008). Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* in Chili Pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.). *Journal of Entomology*, 5 , 176-184.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. and Rivera-Bustamante, R.F. 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 20-277.

Moriones, E., J. Aramburu, J. Riudavets, J. Arno, and A. Lavina. (1998). Effect of plant age at time of infection by *tomato spotted wilt virus* on the yield of field grown tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:295–300.

Morris, J. and Malumphy, C. 2003. TaqMan detection of TYLCV in *Bemisia tabaci*. www.europeanwhiteflystudiesnetwork.com

Nault L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol.Soc. Am.* 90:521–41



Polack, Andrés L. 1999. Protección Vegetal-EEA INTA-San Pedro. (<http://www.clarin.com/suplementos/rural/1999/03/06/c-01201d.htm>).

Ramirez, P. y Rivera-Bustamante, R. 1996. Identificación de geminivirus. In Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. L. Hilje. (ed.). CATIE. Turrialba, Costa Rica. Serie Materiales de Enseñanza N° 37. p. 30-41.

Rodrigo Villar, G. 2002. El amarilleo de las cucurbitáceas: diagnóstico y microscopía de las relaciones virus-planta y virus-vector. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. Escola Tecnica Superior d' Enginyeria Agraria. España.

Rosales V., Inés Marlene. Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: Uso de Herramientas Moleculares. Unidad de Biotecnología. INIA-CRI La Platina. <http://inia.cl/biotecnología/news>.

Rosell, R.C., Torres-Jeréz, I. and Brown, J.K. 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Virology* 89 (3): 239-246.

Salazar, E., Cubillo, D., Ramírez, P., Rivas Platero, G. y Hilje, L. 1998. Severidad del moteado amarillo del tomate y reducción del rendimiento del cultivo en respuesta a la densidad de adultos virulíferos de *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de plagas (Costa Rica) No. 50. Pp: 42-50.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brow, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R. F. 1996. Detection and Distribution of geminiviruses in Mexico and the southern Unites States. *Phytopatology* 86: 1186-1192.



Wisler G.C., Duffus J.E., Liu H.Y. and Li R.H. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Disease* 82:270-280.

Von Arnim, A. & Stanley, J. 1992. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* 186: 286-293.



CAPÍTULO III

Efecto de la temperatura en la concentración viral y severidad de síntomas de *PHYVV* y *PepGMV* en plantas de Chile

Introducción.

Los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* han sido estudiados ampliamente para determinar su distribución (Torres-Pacheco *et al.*, 1996), replicación (Arguello-Astorga *et al.*, 1994), expresión genética (Monsalve *et al.*, 2002), resistencia de sus hospederos (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005), interacciones entre geminivirus (Mendez-Lozano *et al.*, 2003), y transmisión por insecto (Medina-Ramos *et al.*, 2008), pero no hay reportes acerca de el efecto de la temperatura en aspectos como acumulación de DNA viral y severidad de síntomas en plantas infectadas con estos virus.

El tipo de interacción planta-virus podría estar influenciada por varios factores tales como aislado viral (Pelham, 1972), cantidad del inóculo, estado fenológico de la planta (Roggero *et al.*, 1996), genética de la planta (Laterrot, 1973; Pelham, 1972) y temperatura (Nuez *et al.*, 1994).

La respuesta de la planta hospedera a la infección viral puede ser alterada por la temperatura en varias formas. Por ejemplo, en la interacción del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) con el Chile (*Capsicum chinense*) se ha detectado que la resistencia depende de la temperatura y estado fenológico del Chile (Soler, *et al.*, 1998). Las temperaturas bajas pueden ocasionar una restricción en la distribución del virus en los tejidos, como en el caso de trigo (*Hordeum vulgare*) infectado con virus del mosaico del bromo (BMV) (Ding, *et al.*, 1999). La temperatura afecta la acumulación de derivados defectivos (DI) de ARN's de interferencia en virus como el de moteado del frijol común (BBMV) (Llamas *et al.*, 2004).



Por otra parte, se ha reportado que bajas temperaturas inhiben la resistencia, mediada por ARN de interferencia, contra el virus del moteado anular de la orquídea (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) (Szittyá, *et al.*, 2003).

De manera interesante, cinco especies de geminivirus de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) inducen incrementos en los niveles de ARN de silenciamiento en yuca y en tabaco (*Nicotiana benthamiana*) en un rango de temperatura de 25°C a 30°C, disminuyendo la aparición de síntomas en las hojas nuevas (Chellappan *et al.*, 2005).

Objetivo:

Establecer las bases para entender el efecto de la temperatura en las interacciones chile-geminivirus (PHYVV y/o PepGMV).

Materiales y métodos.

Material biológico: Clonas infecciosas de PHYVV y PepGMV tratadas como se describió en capítulo previos (Garzón Tiznado *et al.*, 1993; Torres Pacheco, *et al.*, 1996). Las plantas de chile usadas fueron de la variedad Sonora Anaheim. Las plantas fuente de virus fueron obtenidas como indica en capítulos anteriores (Medina-Ramos *et al.*, 2008). Los insectos vectores fueron obtenidos de una colonia de mosquita blanca *Bemisia tabaci* (biotipo B) establecida como se describió en el capítulo I y como se reportó en Medina-Ramos *et al.* (2008).

Procedimiento de infección: Las mosquitas blancas libres de virus fueron puestas en contacto con cada tipo de planta fuente de virus por un AAP de 24 horas dentro de una estructura plástica (11 cm de diámetro y 15 cm de altura). Se retiraron los vectores al terminar este periodo y fueron puestos en contacto con plantas sanas de chile (4-6 hojas verdaderas) en grupos de 1 y 8 mosquitas blancas por planta durante un IAP de 48 horas.



Al terminar el proceso de infección, las mosquitas fueron retiradas y mantenidas a -20°C para su posterior análisis. Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento durante 20 días para permitir la dispersión del virus.

Diseño del experimento. Se evaluaron los siguientes niveles de temperatura: 33, 26, 24, 22, 18 y 8°C , con una humedad relativa de 70%. Las temperaturas de 26, 24 y 22°C representan las temperaturas medias de las regiones productoras de chile de México. Las temperaturas de 33°C y 8°C representan la temperatura umbral superior e inferior, respectivamente, del cultivo y de *B. tabaci* (Muñiz y Numbela, 2001). Por cada tratamiento se establecieron 3 repeticiones de 20 plantas cada una (60 plantas por tratamiento) y, el ensayo se realizó con uno u ocho vectores por planta. Se probaron diferentes fuentes de inóculo: a) PHYVV, b) PepGMV y c) Mezcla PHYVV-PepGMV. El arreglo dentro de las cámaras de crecimiento fue completamente al azar. El análisis de las plantas infectadas se realizó a los 20 días posteriores a la inoculación.

Detección de PHYVV y PepGMV en plantas de chile y mosquitas blancas. La presencia o ausencia de PHYVV y PepGMV en la planta y en el insecto fue determinada por medio de la PCR con oligonucleótidos específicos para cada virus, según lo reportado previamente (Anaya-López *et al.*, 2003; Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (1%, 80 volts, 1 hora). La respuesta medida en estos ensayos fue el grado de severidad acorde a la escala reportada por Godinez-Hernandez *et al.*, (2001). Las extracciones de ADN de plantas infectadas fueron hechas usando el protocolo descrito por Dellaporta *et al.*, (1983). La extracción de ADN de insecto se realizó con el kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia C.A., USA). La disrupción del insecto se hizo en 180 μl de Buffer de Fosfatos pH 7.0 y se usó un homogenizador eléctrico. La extracción fue hecha de manera individual.



Cuantificación de genomas geminivirales. La cuantificación de los virus PHYVV y PepGMV en planta e insecto se realizó por PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (rtPCR) usando oligonucleótidos específicos para cada virus (para PepGMV: oligonucleótido sentido, 5´GGATTTTGGTGGTAGTGGCATT3´; oligonucleótido antisentido, 5´GGACTCCACAACATATGACAGAAGT3´; Secuencia de sonda reportero Taqman, 5´-FAM dye-CAAATATGGTGTAGGACTCC-NFQ-3´. Para PHYVV: oligonucleótido sentido, 5´TGAAATTAACATAAGTGGTCCATGTACCT 3´; oligonucleótido antisentido, 5´CCGTTAATCGCCAAGGAGCAT 3´; Secuencia de sonda reportero Taqman, 5´-FAM dye-CACGCTTAGGCATTTTGAATT-NFQ-3´ en un termociclador para rtPCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

Análisis estadístico. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza usando el modelo general lineal con el método SAS.

Resultados.

Análisis previo a plantas y vectores. Las plantas usadas como fuente de virus, fueron previamente inoculadas usando la técnica de biobalística, bajo las condiciones descritas en el capítulo 1. Se comprobó por PCR la presencia viral en estas plantas y en la figura 14 se muestra el análisis electroforético (paneles A y B). Como puede verse, en la figura 14, las plantas usadas como fuente de virus fueron infectadas eficazmente con cada virus. Para verificar que tanto las plantas como los vectores a usarse en los tratamientos estuvieran libres de virus, se obtuvo ADN de estos antes de la infección y se analizó por PCR. Todas las muestras, de plantas e insectos, estuvieron libres de virus (figura 14 Paneles C y D).

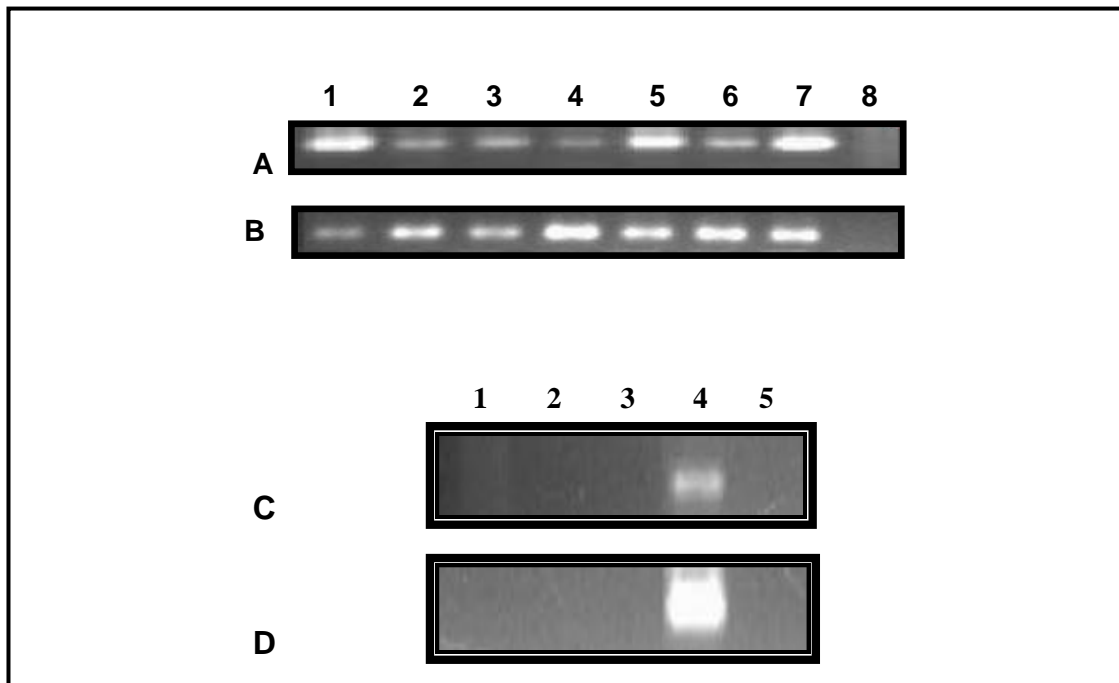


Figura 14. Detección por PCR de PHYVV y PepGMV en plantas usadas como fuente de virus, y en plantas y mosquitos libres de virus. Panel A, Detección de PHYVV (tamaño del fragmento amplificado 350 pb). Carriles 1-3: plantas infectadas con PHYVV. Carriles 4-6: plantas infectadas de manera mixta con PYYHV y PepGMV. Carril 7: control positivo. Carril 8: control negativo. Panel B, detección de PepGMV (tamaño del fragmento amplificado 280 pb). Carriles 1-3: Plantas infectadas solo con PepGMV. Carriles 4-6: plantas infectadas con PHYVV. Carriles 4-6: plantas infectadas de manera mixta con PYYHV y PepGMV. Carril 7: Control positivo. Carril 8: control negativo. Panel C: Detección de PHYVV en plantas y mosquitos blancas libre de virus. Carriles 1-3: plantas a usar en los ensayos, Carril 4: Control positivo, Carril 5: mosquitos a usar como vector. Panel D: Detección de PepGMV en plantas y mosquitos blancas libre de virus. Carriles 1-3: plantas a usar en los ensayos, Carril 4: control positivo, Carril 5: mosquitos a usar como vector.



Para evaluar que las mosquitas blancas adquirieran a PHYVV y/o PepGMV durante el AAP, se analizaron muestras de su ADN por PCR (Figura 15, paneles A y B). Como puede verse en esta figura, ambos geminivirus fueron adquiridos por las mosquitas blancas.

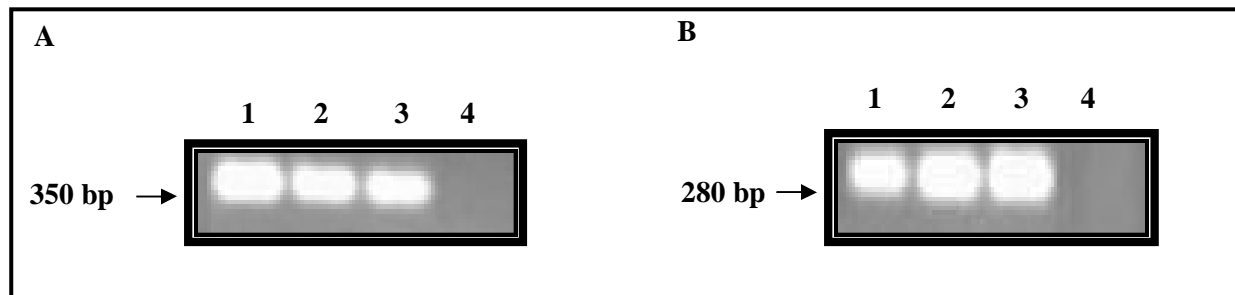


Figura 15. Detección de geminivirus adquiridos por mosquita blanca. A) Panel A: PHYVV. B) Panel B: PepGMV. Carril 1: mosquita blanca infección simple; Carril 2: mosquita blanca infección mixta. Carril 3: Control positivo; Carril 4: Control negativo.

Adicionalmente, ambos geminivirus fueron detectados en plantas de Chile (c.v. Sonora Anaheim) inoculados con 1 u 8 insectos (Figura 16, paneles C y D); lo cual prueba la eficiencia del sistema de inoculación usado en este trabajo como se había reportado previamente (Medina-Ramos *et al.*, 2008).

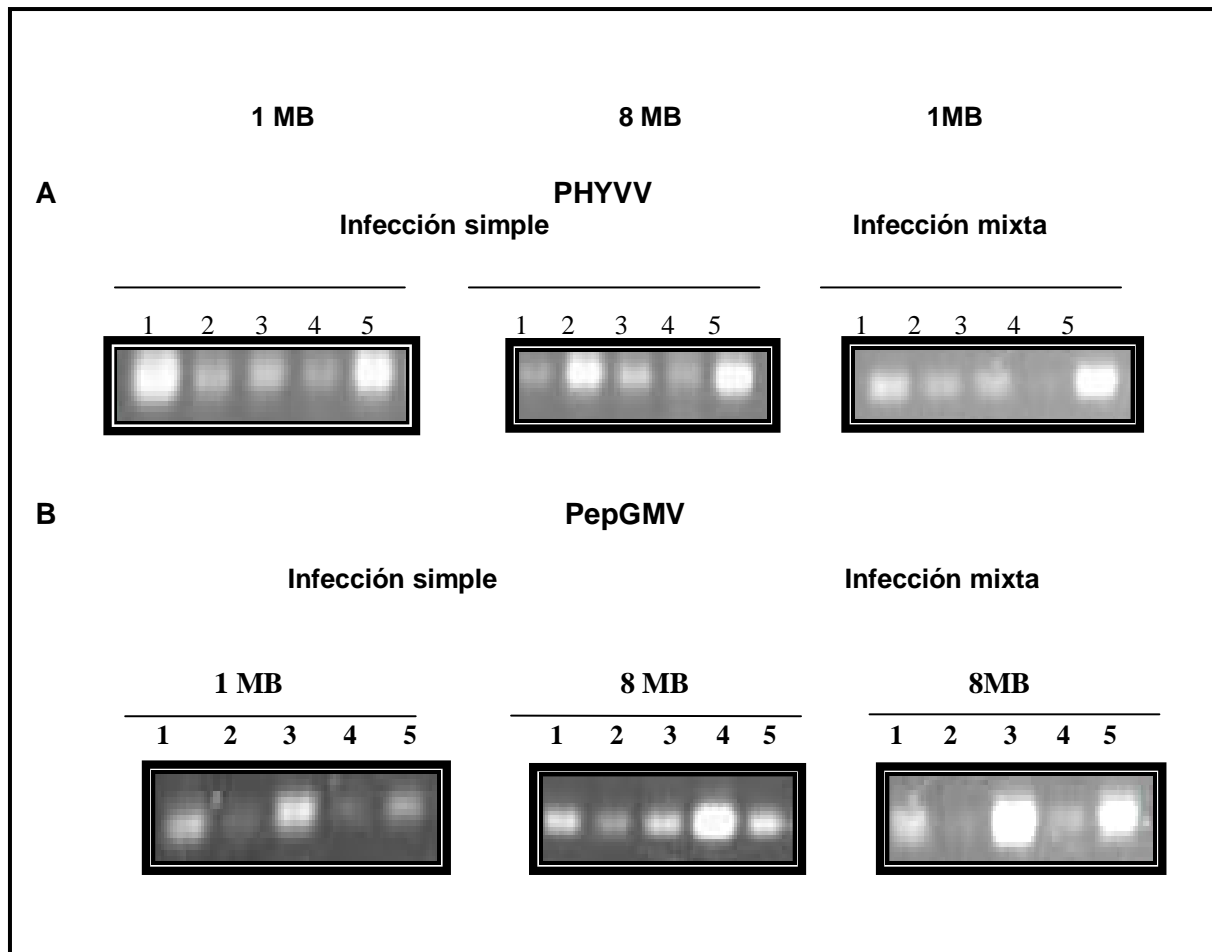


Figura 16. Detección de geminivirus en plantas inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas en infección simple o en mezcla. Panel A: Detección de PHYVV. Panel B: Detección de PepGMV.

Análisis de severidad de síntomas en plantas.

La determinación de la severidad de síntomas en plantas fue evaluada de acuerdo a la escala reportada por Godínez-Hernández et al., 2001. Como se muestra en la Tabla 14, la severidad mas alta fue observada a 22 °C, tanto para infección simple o mixta, usando 1 mosquita blanca.



Por otro lado, cuando se usaron 8 mosquitas blancas, nuevamente 22°C fue la temperatura en la cual se registró la severidad más alta en las plantas (Tabla 14).

Adicionalmente, usando 8 mosquitas blancas, la severidad incremento muy levemente en comparación con los ensayos de 1 mosquita blanca y este aumento fue de manera no proporcional.

Tabla 14. Efecto de la temperatura de incubación en la severidad en plantas de chile inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas con geminivirus

Temperatura (°C)	Número de mosquitas blancas	Severidad		
		PepGMV	PHYVV	Mezcla
8	1	2 ± 0.15	2 ± 0.18	1 ± 0.10
18	1	3 ± 0.10	2 ± 0.17	2 ± 0.20
22	1	4 ± 0.20	5 ± 0.10	6 ± 0.16
24	1	2 ± 0.17	2 ± 0.18	3 ± 0.20
26	1	3 ± 0.18	3 ± 0.10	4 ± 0.20
33	1	3 ± 0.10	3 ± 0.15	3 ± 0.10
8	8	2 ± 0.10	2 ± 0.10	1 ± 0.17
18	8	3 ± 0.20	3 ± 0.15	3 ± 0.15
22	8	6 ± 0.15	7 ± 0.20	8 ± 0.18
24	8	3 ± 0.20	3 ± 0.15	3 ± 0.10
26	8	4 ± 0.15	4 ± 0.10	6 ± 0.10
33	8	4 ± 0.20	4 ± 0.10	3 ± 0.10

Incidenia de la infección y concentración viral

La mayor incidencia de infección en plantas se dio a 18 y 22°C, cuando se usó 1 mosquita blanca; en cambio, para 8 mosquitas blancas la mejor incidencia de infección estuvo entre 22 y 24 °C (Tabla 15).



Tabla 15. Efecto de la temperatura de incubación en la incidencia viral en plantas de Chile inoculadas con 1 u 8 mosquitas blancas infectivas con geminivirus

Temperatura (°C)	Número de mosquitas blancas	Incidencia*		
		PHYVV	PepGMV	Mezcla
8	1	24/60	36/60	30/60
18	1	57/60	51/60	57/60
22	1	54/60	60/60	54/60
24	1	48/60	48/60	57/60
26	1	48/60	51/60	51/60
33	1	51/60	39/60	51/60
8	8	42/60	48/60	30/60
18	8	57/60	57/60	57/60
22	8	57/60	60/60	60/60
24	8	59/60	59/60	60/60
26	8	57/60	57/60	57/60
33	8	54/60	48/60	51/60

*No. plantas infectadas/No. plantas inoculadas

La concentración viral más alta, para infecciones simples y en mezcla, tanto para los ensayos con 1 u 8 mosquitas blancas, se localizó en 8 y 22°C. La concentración viral más alta fue obtenida con PHYVV y 1 mosquita blanca a ambas temperaturas (Tabla 16).



Tabla 16. Efecto de la temperatura en la concentración viral en infecciones simples y en mezcla de plantas de Chile.

Temperatura (°C)	Número de mosquitas blancas	Concentración viral	
		PHYVV (*)	PepGMV (*)
8	1	1403.7±0.47 (1737±1.15)	2694±0.34 (1029±0.27)
18	1	18.35±0.98 (7.93±1.56)	2.146±1.50 (6.1±1.21)
22	1	5545±0.35 (1099.7±0.16)	5.89±0.98 (21.97±0.79)
24	1	6.85±2.51 (2.40±1.5)	7.20±0.65 (5.63±0.71)
26	1	10.28±1.83 (2.95±1.0)	5.46±0.63 (5.37±1.82)
33	1	5.42±1.24 (4.01±0.41)	1.62±0.17 (3.87±0.356)
8	8	209±0.36 (691.19±0.15)	28816±0.41 (956.09±0.402)
18	8	4.44±0.26 (27.28±0.66)	11.82±1.41 (7.10±1.06)
22	8	82.47±0.53 (2947.8±0.35)	22.31±0.29 (84.21±1.45)
24	8	4.67±0.79 (25.86±1.23)	9.57±1.08 (76.58±0.81)
26	8	14.63±0.11 (11.71±1.04)	16.51±0.20 (45.5±1.07)
33	8	1.10±0.56 (6.72±0.38)	8.97±1.64 (14.86±0.60)

(*)* cuantificación de virus en infecciones mixtas.

Discusión.

Al evaluar la densidad de vectores (1 u 8 mosquitas blancas) se volvió a comprobar que 1 mosquita blanca es capaz de provocar una enfermedad geminiviral y que un número alto de vectores (8 mosquitas blancas) garantiza una inoculación exitosa. Interesantemente, las tendencias en ambos casos de inoculación, en relación a la severidad de síntomas, incidencia y concentración viral fueron similares.



El análisis del efecto de la temperatura sobre las variables evaluadas mostró las siguientes relaciones: 1) en cuanto a los síntomas de severidad e incidencia de la infección, los mayores niveles fueron detectados para la infección con PepGMV, tanto en inoculación simple como en mezcla a temperaturas entre 18 y 24°C (predominando 22°C) cuando la inoculación se hizo con 1 u 8 mosquitas blancas, 2) la concentración viral fue mayor cuando se usó 1 u 8 mosquitas blancas a temperaturas de 8 °C y 22°C.

De manera interesante, las plantas usadas en los ensayos de infección mixta contienen más cantidad de ADN de PHYVV que de PepGMV, lo cual coincide con los reportes de Méndez-Lozano *et al.*, (2003), acerca del comportamiento de estos geminivirus en plantas de Chile.

Adicionalmente y basados en los resultados de este trabajo, se puede mencionar que la temperatura de incubación es determinante en la interacción geminivirus-chile, en la cual la temperatura de 22°C potencia una severidad e incidencia altas; y temperaturas bajas (8°C) potencian una alta concentración viral. Es bien conocido que las interacciones planta-virus son fuertemente influenciadas por factores ambientales; especialmente por temperatura (Szittyá *et al.*, 2003). Altas temperaturas están frecuentemente asociadas con la atenuación de síntomas (enmascaramiento térmico, “heat masking”) y bajos contenidos virales en plantas infectadas con virus (Johnson, 1922; Hull, 2004).

En contraste, una rápida dispersión de enfermedades virales y el desarrollo de síntomas severos están frecuentemente asociados con temperaturas bajas (aire frío) (Hine *et al.*, 1970; Gerik *et al.*, 1990). En este estudio, temperaturas relativamente bajas como 18-22°C corresponden con altos niveles de severidad, incidencia y concentración viral.



En este aspecto, los tratamientos a 8°C mostraron que la temperatura no está directamente relacionada con una alta severidad e incidencia de la infección, provocando una alta concentración viral, lo cual coincide nuevamente con reportes previos.

Harrison (1956) especuló que el contenido viral de una planta representa un equilibrio entre la replicación y la degradación, y que la actividad del sistema de degradación del virus incrementa con la temperatura. Sin embargo, los mecanismos moleculares de estos efectos de temperatura no están completamente entendidos; una posibilidad es que el ARN de silenciamiento es el sistema de degradación del virus. Se ha demostrado que la defensa de la planta mediada por ARN de silenciamiento es dependiente de la temperatura, con temperaturas bajas, se ocasiona una inhibición de este sistema (Szittyia *et al.*, 2003). Este fenómeno podría explicar de manera general, los resultados de severidad, incidencia y concentración viral obtenidos en este trabajo. Finalmente, estos resultados sugieren que las temperaturas de incubación entre 18-24 °C promueven una mayor severidad de los síntomas y la incidencia de las infecciones con PHYVV y PepGMV en infecciones simples o en mezcla.

Bibliografía

Anaya-López, J.L; Torres-Pacheco I; Guevara-González, R.G; González-Chavira, M; Pons-Hernández, J.L; Guevara-Olvera, L; Muñoz-Sánchez, C.I; Hernández-Verdugo, S & Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Resistance to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers (*Capsicum spp*). *Hortscience*, 38, 251-255.



Anaya-López, J.L; Pérez-Mora, E; Torres-Pacheco, I; Muñoz-Sánchez, C.I; Guevara-Olvera, L; González-Chavira, M; Ochoa-Alejo, N; Rivera-Bustamante, R.F;& Guevara-González, R.G. (2005). Inducible Gene Expression by *Pepper Huasteco Geminivirus* (PHV) in *Capsicum chinense* Jacq. Plants with Resistance to Geminivirus Infections. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 276-282.

Argüello-Astorga, G.R; Guevara-González, R.G; Herrera-Estrella, L.R; & Rivera-Bustamante R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*, 203, 90-100.

Chellappan, P; Vanitharani, R; Ogbe, F; & Fauquet, C. M. (2005). Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants. *Plant Physiology*, 138, 1828-1841.

Dellaporta, S.L; Wood, J; & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.

Ding, X. S; Flasiński S; & Nelson R. S. (1999). Infection of Barley by Brome Mosaic Virus Is Restricted Predominantly to Cells in and Associated with Veins through a Temperature-Dependent Mechanism. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12, 615–623.

Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibañez, J. T., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. F. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology*, 83, 514-521.



Gerik, J.S., Duffus, J.E., Perry, R., Stenger, D.C. and Van Maren, A.F. (1990). Etiology of tomato plant decline in the California Desert. *Phytopathology* **80**: 1352-1356.

Godínez-Hernández, Y; Anaya-López, J.L; Díaz-Plaza, R; González-Chavira, M; Torres-Pacheco, I; Rivera-Bustamante, R.F, & Guevara-González, R.G. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *Hortscience*, 36, 139-142.

Harrison, B.D. (1956). Studies on the effect of temperature on virus multiplication in inoculated leaves. *Annu. Appl. Biol.*, 44, 215-226.

Hine, R.B., Osborne, W.E., & Dennis, R.E. (1970). Elevation and temperature effects on severity of maize virus in sorghum in Arizona. *Plant Disease Report*, 54, 1064-1068.

Hull, R. (2004). Matthews. Plant Virology. Fourth edition. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Johnson J. (1922). The relation of fair temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology*, 12, 438-440.

Laterrot, H. (1973). Resistance de la tomate au virus de la mosaïque du tabac. Difficultés rencontrées pour la sélection de variétés résistantes. *Annals Améliorate Plantes*, 23, 287-316.

Llamas, S., Sandoval, C., Babin, M., Pogany, J., Bujarski, J. J., & Romero, J. (2004). Effect of the host and temperature on the formation of defective RNAs associated with *Broad bean mottle virus* infection. *Phytopathology*, 94, 69-75.



Medina-Ramos, G; De La Torre-Almaráz, R; Bujanos-Muñiz, R; Guevara-González, R.G; Tierranegra-García, N; Guevara-Olvera, L; González-Chavira M.M; & Torres-Pacheco, I. (2008). Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* in Chili Pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.). *Journal of Entomology*, 5 (3):176-184.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M; & Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huastec virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93, 270-277.

Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2002). Geminivirus Gene Expression and Replication. *In: Plant Viruses as Molecular Pathogens*. Haworth Press, Inc. ISBN: 1-56022-895

Muñiz, M; & Nombela, G. (2001). Differential Variation in Development of the B- and Q-Biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on Sweet Pepper at Constant Temperatures. *Environmental Entomology*. 30(4):720–727.

Nuez, F., Díez, M. J., Roselló, S., Lacasa, A., Jordá, C., Martín, M., & Costa, J. (1994). Genetic resistance to TSWV (Tomato spotted wilt virus) in *Capsicum* spp. *Capsicum Eggplant Newsletters*, 13, 86-87.

Pelham, J. (1972). Strain-genotype interaction of tobacco mosaic virus in tomato. *Annals of Applied Biology*, 71, 219-228.

Roggero, P., Lisa, V., Nervo, G., & Pennazio, S. (1996). Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'PI-152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Phytopathology Mediterranean*, 35, 117-120.



Soler, S., Díez, M. J., & Nuez, F. (1998). Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Disease*, 82, 1199-1204.

Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., & Burgyán, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *EMBO Journal*, 22, 633-640.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, F.R. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, 86, 1186-1192.



CAPITULO IV

Localización de los geminivirus *PHYVV* y *PepGMV* en su hospedero *Capsicum annuum* y en su vector *Bemisia tabaci*.

Introducción.

La mayoría de los virus fitopatógenos son transmitidos por insectos del orden Homóptera, entre los que se incluyen áfidos, mosquitas blancas, chicharritas y trips (Murphy *et al.*, 1995). Estos virus se mueven a través del insecto vector, del intestino medio a la hemolinfa o a otros tejidos y finalmente a las glándulas salivales, de ahí pueden ser transmitidos a las plantas hospederas cuando se están alimentando. El movimiento y/o replicación de los virus fitopatógenos en su insecto vector requiere de interacciones específicas entre el virus y el vector (Hogenhout *et al.*, 2008).

El elevado grado de especificidad que muestran algunos virus por sus vectores, junto con las diferencias que se observan en los lugares de retención y acumulación viral implican la existencia de una asociación muy estrecha entre estos (van del Heuvel *et al.*, 1997).

Se han descrito 4 mecanismos de transmisión de virus por insecto: Transmisión no persistente, Transmisión semi-persistente, transmisión persistente circulativa y Transmisión persistente propagativa. En la tabla 17 se muestran las características de cada uno de estos tipos de transmisión (Kennedy *et al.*, 1962).



Tabla 17. Características de transmisión y periodos de transmisión por insecto.

Característica biológica	No persistente (estilete)	Semi-persistente (Intestino anterior)	Persistente circulativo	Persistente propagativo
AAP e IAP*	Segundos, minutos	Minutos, horas	Horas, días	Horas, días
Periodo de latencia (Incubación)	No hay	No hay	Horas, días	Días, semanas
Tiempo de retención en el vector	Minutos, se pierde después del masticado	Horas, se pierde después del masticado	Días, semanas	Durante toda la vida del insecto
Presencia en la hemolinfa del vector	No	No	Si	Si
Multiplicación en el vector	No	No	No	Si
Transmisión transovarial	No	No	No	Frecuentemente

*AAP: Periodo de acceso a la adquisición; IAP: periodo de acceso a la inoculación.

Los virus pertenecientes al género *Begomovirus*, transmitidos por *B. tabaci* son transmitidos de modo persistente circulativo no propagativo (Hogenhout *et al.*, 2008). Este tipo de transmisión involucra el paso del virus a través del cuerpo del insecto y consiste de 2 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 secreciones salivares (Liu *et al.*, 1997; Palmer y Rybicki, 1998).



En mosquita blanca, los geminivirus han sido observados en células epiteliales del intestino, así como en las glándulas salivales accesorias. El paso limitante para la transmisión está definido cuando el virus pasa al hemocelo y luego es transmitido, o cuando pasa del intestino al hemocelo (Rosell *et al.*, 1999). En el caso específico de Begomovirus, se han localizado por fluorescencia en dos primeros tercios del intestino medio y no fueron encontrados ni en el esófago, la boca del intestino ni en el último tercio del mismo (Hunter *et al.*, 1998).

La transmisión de virus tipo persistente es muy específica y está definida por periodos de adquisición elevados (Duffus, 1996). La proteína de la cápside de los geminivirus determina la especificidad del vector (Bridson *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997). En el caso del virus del mosaico africano de la yuca (ACMV), un geminivirus transmitido por mosquita blanca, al hacer mutaciones en la región de la proteína de la cápside y reemplazarla con la proteína de la cápside del virus de enchinamiento apical de la remolacha (BMCTV), el cual es transmitido por la chicharrita *C. tenellus*, se demostró que la región N-terminal de 25-28 aminoácidos es importante para la transmisión por insecto, mediando como receptor en la endocitosis en el intestino y en las glándulas salivales del insecto (Soto *et al.*, 2005). Los *Begomovirus* requieren que la proteína de la cápside este funcional para su transmisión por mosquita blanca (Azzam *et al.*, 1994). La composición de la proteína de la cápside de los aminoácidos 123 a 149 y los residuos 149 a 172 contribuyen a la eficiencia de la transmisión por mosquita blanca (Hohnle *et al.*, 2001).

Después de ser transmitidos por el insecto vector, los geminivirus, al igual que la gran mayoría de los virus fitopatógenos, requieren de productos de origen viral (proteína AL1 o Rep, AV1 o CP, BV1 o BR1, BC1 o BL1 y el satélite DNA- β) para su desplazamiento sistémico y, por tanto, para el desarrollo de la infección.



Dichos productos interactúan con factores de la célula huésped para su función. Existen fundamentalmente 2 tipos de movimiento viral, uno a corta distancia, célula a célula, y otro que involucra la dispersión del virus por el sistema vascular de la planta (Ruiz-Medrano y Rivera-Bustamante, 1997).

Las funciones de movimiento en los geminivirus bipartitas están codificadas en el componente B por los genes BC1 (localizada en la periferia celular (Pascal, *et al.*, 1994; Sanderfoot *et al.*, 1996) y BV1 (localizada en el núcleo (Pascal *et al.*, 1993)). A este grupo pertenecen el PHYVV y PepGMV. El modelo propuesto para el movimiento del virus en la planta indica que BV1 transporta al genoma de los geminivirus, ya sea como virión o como complejo nucleoprotéico, del núcleo al citoplasma y viceversa, mientras que BC1 interactúa con el ADN viral y/o BV1 en los plasmodesmos, desplazándolo a una nueva célula (Ruiz-Medrano y Rivera-Bustamante, 1997). En el caso del PHYVV se ha mostrado que la proteína de la cápside no es esencial para la infección sistémica (Guevara-González *et al.*, 1999). Un aspecto importante dentro de las relaciones de patogenicidad de geminivirus es la interacción virus-vector. Aunque se ha estudiado como se dan estas interacciones en varios sistemas virales, para el caso de las infecciones mixtas PHYVV y PepGMV no se han determinado los sitios de localización de estos virus en su vector mosquita blanca, debido a lo complicado que resulta visualizar a PHYVV y PepGMV en los tejidos del insecto. Para localizar a nivel celular los componentes virales de los geminivirus PHYVV y PepGMV, en este trabajo se sugiere a la técnica de hibridación *in situ* como la más adecuada. En estudios recientes se ha localizado, principalmente en tejido vascular, a los geminivirus PHYVV y PepGMV tanto en infecciones simples como en mixtas (Rentería-Canett, 2007). Estos estudios de localización de los geminivirus PHYVV y PepGMV sólo se han hecho para la planta hospedera, no así para el vector. De manera que existe poca información de donde se encuentran estos geminivirus en específico dentro de la mosquita blanca *B. tabaci*.

**Objetivo.**

Determinar los sitios de localización de los geminivirus PHYVV y PepGMV en la planta hospedera de Chile y en el insecto vector mosquita blanca.

Metodología.

Materiales biológicos: Clonas infecciosas de PHYVV y PepGMV tratadas como se describió en el capítulo I. Las plantas usadas fueron chiles c.v. Sonora Anaheim. Las plantas fuente de virus fueron obtenidas como indica en el capítulo I (Medina-Ramos *et al.*, 2008). Los insectos vectores fueron obtenidos de una colonia de mosquita blanca *Bemisia tabaci* (biotipo B) establecida como se describió en el capítulo I y como se reportó en Medina-Ramos *et al.* (2008).

Procedimiento de infección de plantas: Las mosquitas blancas libres de virus fueron puestas en contacto con cada tipo de planta fuente de virus por un AAP de 24 horas dentro de una estructura plástica (11 cm de diámetro y 15 cm de altura). Se retiraron los vectores al terminar este periodo y fueron puestas en contacto con plantas sanas de Chile (4-6 hojas verdaderas) en grupos de 8 mosquitas blancas por planta durante un IAP de 48 horas. Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento durante 20 días para permitir la dispersión del virus.

Cinética de adquisición en insectos. Para determinar la localización de los virus PHYVV y PepGMV dentro del vector se realizó una cinética de adquisición-alimentación de virus, cuyos niveles fueron: 0, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas.

Condiciones generales de los eventos de adquisición-alimentación. Por cada tratamiento se establecieron 5 repeticiones. Las mosquitas fueron puestas en contacto con las plantas fuente de virus durante los diferentes AAP's probados.



Las condiciones a las cuales se llevo a cabo el experimento fueron: temperatura 24°C y 70 % de humedad relativa. Al término del periodo de adquisición-alimentación los insectos se retiraron de las plantas fuente de virus y se prosiguió con la técnica de hibridación *in situ*.

Hibridación *in situ*.

Las etapas seguidas en este proceso fueron:

1. Marcaje de sondas para hibridación: Los componentes virales se encuentran clonados en el plásmido Blue Script (SK+) en la bacteria *E. coli* de la cual fueron extraídos los ADN plasmídicos usando el kit comercial DNeasy Mini Prep de Qiagen. Estos ADN's fueron usados para marcarje no radiactivo con Digoxigenin-II-dUTP (Roche) por una reacción de PCR; la metodología seguida fue:

a. Calentamiento sin enzima: 94°C; 3 minutos; 1 ciclo.

Mezcla de reacción:

ADN (100 ng)	1.5 µl
dNTP's (10 mM)	5 µl
Primer forward (50 ng/µl)	2 µl
Primer reverse (50 ng/µl)	2 µl
dUTP digoxigenina (25 nmol)	1 µl
H ₂ O	<u>28.5 µl</u>
Total	40.0 µl

b. Adición de la enzima y continuación del PCR bajo las siguientes condiciones:

94°C	35 segundos	} 35 ciclos
55°C (PHYVV) 62°C (PepGMV)	35 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	7 minuto	1 ciclo



La mezcla de la enzima fue hecha de la siguiente manera:

Buffer 10X	5 μ l
H ₂ O	4.8 μ l
Takara Ex Taq HS	<u>0.2 μl</u>
	10 μ l

c. Análisis electroforético: En gel de agarosa (1%, 80 volts, 1 hora).

2. Procesamiento del tejido para Hibridación *in situ*:

- a. Fijación del tejido: Los tejidos frescos de hoja infectada y de insecto infectivo fueron sumergidos en una solución fijadora FA (formaldehído 12%) durante 24 horas. Las muestras fueron deshidratadas enjuagando 2 veces en etanol al 50%. Los tejidos fueron sumergidos durante 30 minutos consecutivamente en etanol al 50%, 60%, 70%, 80% y 90%. Después el tejido fue sumergido en una solución de etanol al 95% con 0.01 de safranina durante toda la noche. Realizar 2 cambios de etanol al 100% por 30 minutos cada uno.
- b. Infiltración, inclusiones y cortes de tejido: La infiltración se realizó sumergiendo los tejidos durante 30 minutos de manera consecutiva en las siguientes soluciones:
 1. Etanol-Citrisolv 3:1
 2. Etanol-Citrisolv 1:1
 3. Etanol-Citrisolv 1:3

Decantar esta solución y adicionar la mitad del volumen de citrisolv fresco. Adicionar gránulos de parafina (TissuePrep, *Fisher Scientific*) y se incubó a 56°C toda la noche. Decantar cuidadosamente la mezcla parafina-citrisolv, para no dañar los tejidos, y adicionar parafina líquida. Este paso se repitió 2-3 veces por día durante 3 días.



Los tejidos fueron orientados en bloques de parafina para lo cual se precalentaron las bases de los moldes (Fisher) sobre una placa a 55°C, se colocó una gotita de parafina líquida para acomodar sobre ella el tejido de acuerdo a la orientación deseada (corte transversal o longitudinal) y se colocó encima un anillo de plástico (Fisher) para ser llenado con parafina líquida. Los moldes con parafina se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4°C.

Consecutivamente se hicieron cortes de 5 µm con un microtomo rotatorio HM 315 (Microm) y se colocaron sobre laminillas (Sigma) para incubarse toda la noche a 42 °C sobre una plancha.

3. Hibridación y revelado

Se desparafinaron los tejidos sumergiendo las laminillas en citrisolv durante 10 minutos, dos veces.

Los tejidos fueron hidratados en un gradiente de soluciones de alcohol, de la siguiente manera:

1. Solución 1: Etanol 100%- Safranina 0.01%. Dos lavados durante 1 minuto cada uno.
2. Solución 2: Etanol 90%- Safranina 0.01%. Durante 1 minuto.
3. Solución 3: Etanol 70%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
4. Solución 4: Etanol 50%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
5. Solución 5: Etanol 30%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
6. Solución 6: NaCl 0.85%. Durante 2 minutos.



Inmediatamente se hizo un tratamiento a cada laminilla con 500 μ l de proteasa (2 μ l/ml) disuelta en amortiguador 1X para proteinasa K (10X: Tris-HCl 100 mM y EDTA 50 mM, pH 8) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se bloqueó con glicina 0.2% disuelta en PBS 1X durante 2 minutos para posteriormente deshidratarse los tejidos en el siguiente gradiente de alcoholes:

1. Solución 5: Etanol 30%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
2. Solución 4: Etanol 50%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
3. Solución 3: Etanol 70%- Safranina 0.01%- NaCl 0.85%. Durante 1 minuto.
4. Solución 2: Etanol 90%- Safranina 0.01%. Durante 1 minuto.
5. Solución 1: Etanol 100%- Safranina 0.01%. Dos lavados durante 1 minuto cada uno.

Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda para continuar con la hibridación.

Se mezclaron 4 μ l de cada sonda (previamente desnaturalizadas a 94°C durante 5 minutos y enfriadas en hielo) en 5 ml de la solución de prehibridación (NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, EDTA 5 mM, formamida 50%, sulfato de dextran 10%, solución Denhardt 1X).

Se colocaron 500 μ l de esta mezcla sobre cada laminilla cubriéndolas con parafilm y se incubaron a 42°C durante toda la noche. A continuación se lavaron las laminillas en una solución de formamida al 50% en SSC 2X a 42°C durante 30 minutos y 5 minutos en la misma solución fresca.

Después se bloqueó con una solución de leche descremada al 4% disuelta en PBS 1X durante 45 minutos a temperatura ambiente. El exceso de leche se lavó con PBS 1X. En la solución de PBS 1X y leche descremada 4% se disolvió el anticuerpo contra digoxigenina (Roche) a una concentración de 1:2000.



De esta mezcla se colocaron 400 μ l a cada laminilla y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo fue lavado con PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El revelado se realizó con 300 μ l de una solución NBT-BCPI (Nitro azul tetrazolio/bromo-cloro-indol fosfato, Roche) por laminilla incubando en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 3 días. Las laminillas se sumergieron por 1 minuto en el gradiente de alcohol de 30-100%. Se coloca sobre cada laminilla unas gotas de resina Permount (Fisher) y un cubreobjetos. Se incubaron 2 días a temperatura ambiente. Se toman fotografías con una cámara digital en un microscopio de campo claro con los objetivos 10x, 20x y 40x.

Esta técnica se realizó en las siguientes etapas: a) Marcaje de sonda para hibridación (con dUTP digoxigenina por medio de un PCR), b) Procesamiento de tejido (Fijación, infiltración, inclusión en parafina y cortes de tejido), c) Hibridación del tejido con la sonda marcada y d) Revelado.

Resultados

Marcaje de sondas para hibridación. Los productos del PCR que amplificaron las bandas de PHYVV y PepGMV marcados con dUTP-digoxigenina fueron observados en un gel de agarosa 1% (Figura 17). Estos ADN's son los que se utilizaron como sondas para las pruebas de hibridación *in situ*.

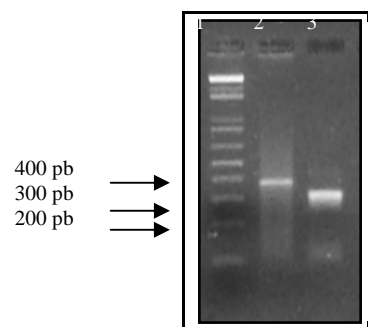


Figura 17. Análisis de Marcaje de sondas para hibridación. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador 1 kb; Carril 2: PHV; Carril 3: PepGMV.



En la figura 18 se muestra de manera gráfica las diferentes etapas del procesamiento del tejido, tanto de planta como de insecto, para realizar sobre estos cortes histológicos la hibridación molecular.

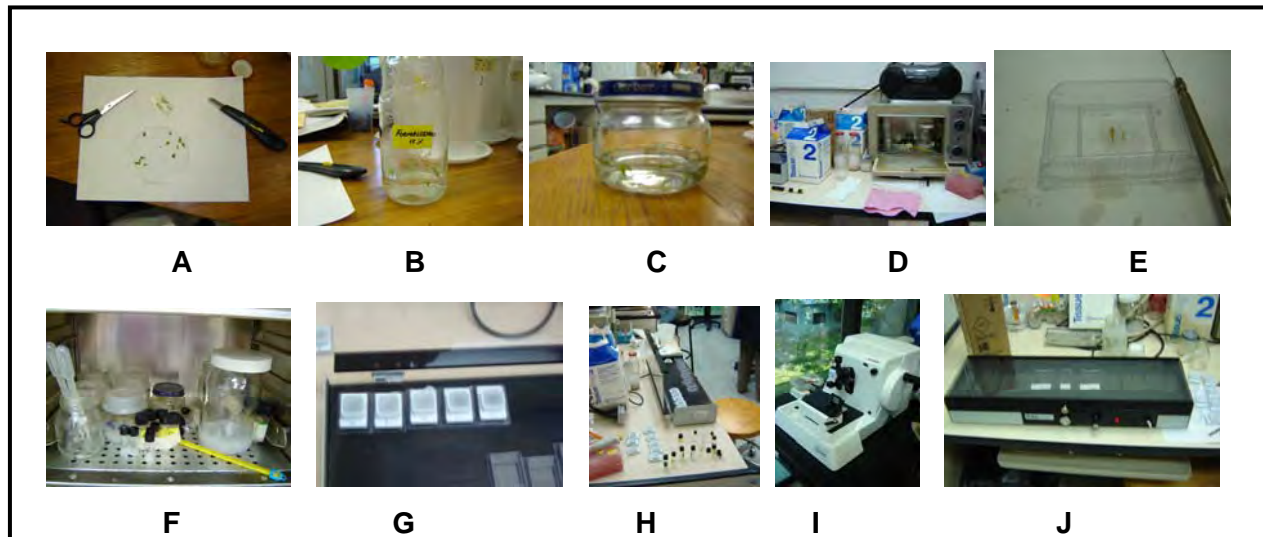


Figura 18. Procesamiento del tejido para Hibridación *in situ*. A. Corte de tejido vegetal. B. Fijación de tejido en solución fijadora FA. C. Infiltración en parafina-citrosolv. D. Cambio de parafina. E. Mantenimiento a 56°C en estufa. F, G y H. Orientación de los tejidos en bloques de parafina. I. Cortes al microtomo. J. Fijación de los cortes a laminillas (portaobjetos).

En la figura 19 se muestran las fotografías al microscopio correspondientes al tejido vegetal infectado de forma mixta PHYVV-PepGMV. En ésta muestra se observa que PHYVV se encuentra en las células acompañantes del floema y tubos cribosos, lo cual le permite una movilidad mayor dentro de la planta. En contraste, PepGMV, está restringido a células del parénquima, haciendo su movimiento de célula a célula más lento.

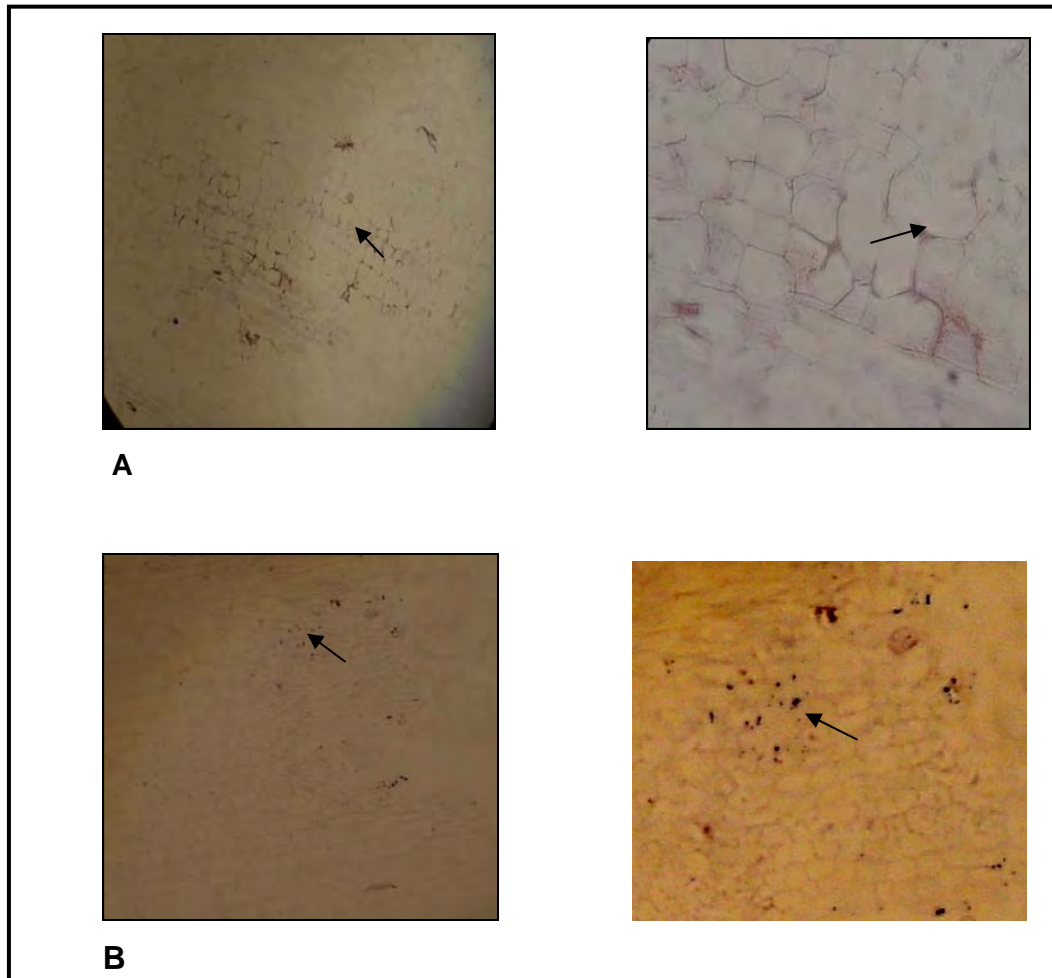


Figura 19. Hibridación *in situ* de tejido de plantas de chile infectadas de forma mixta con PHYVV y PepGMV por el vector *B. tabaci*. Panel A: Hibridación con sonda PHYVV, Panel B: Hibridación con sonda PepGMV.

En cuanto a los resultados obtenidos en el tejido de insecto, mostrados en la figura 20 se observa que la localización de ambos virus es similar, encontrándose en el tracto digestivo, aunque son necesarias 48 horas posteriores a la adquisición del virus por el vector, para que éste sea detectado en las glándulas salivales.

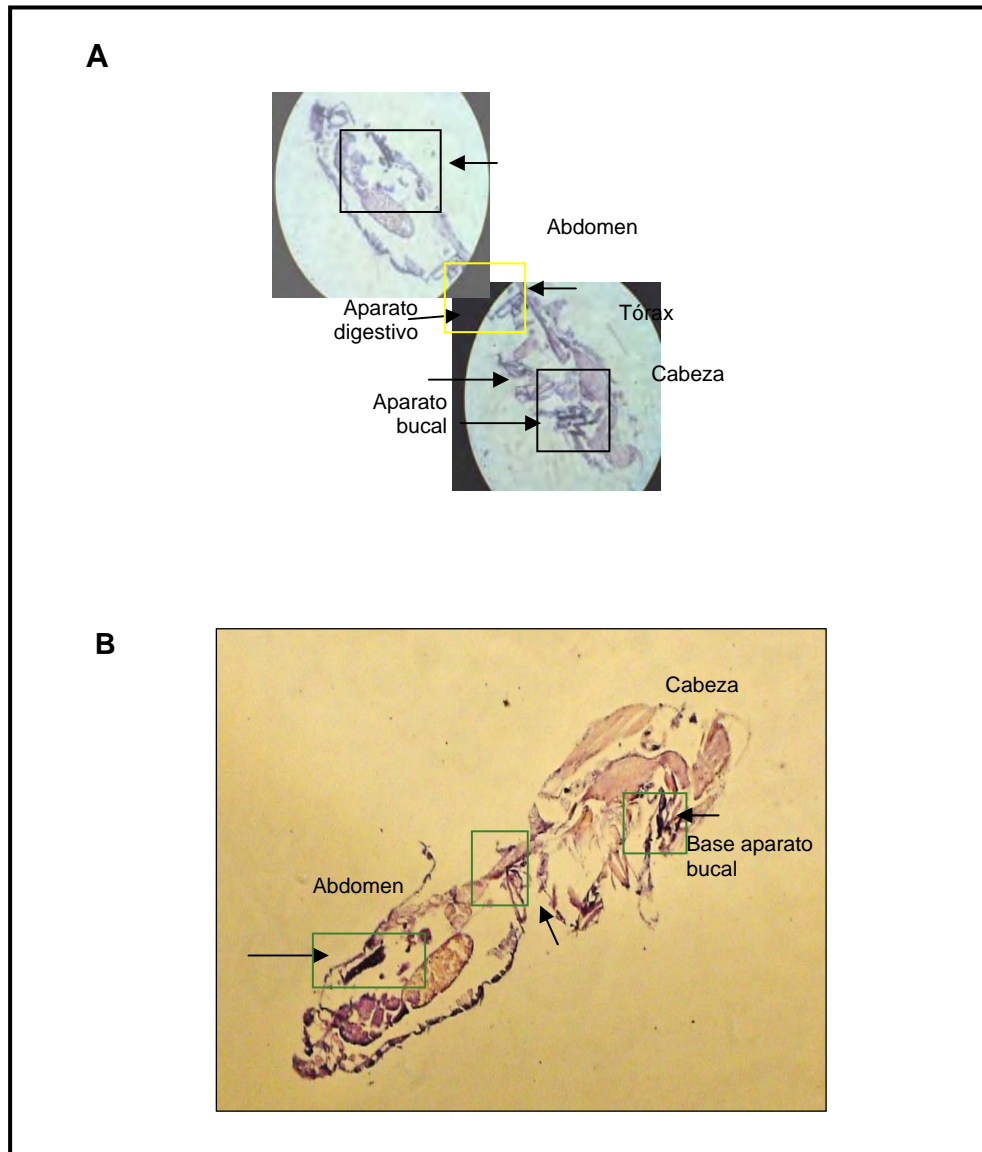


Figura 20. Hibridación *in situ* de tejido de insecto con periodo de adquisición-alimentación de 48 horas. A. Sonda PHYVV. B. Sonda PepGMV. Las flechas señalan los sitios con presencia viral.



Discusión.

La localización de PHYVV en el floema y los tubos cribosos de la planta hospedera sugiere que este virus puede tener una movilidad mayor. En contraste PepGMV, restringido a células del parénquima, probablemente tiene una movilidad menor, lo cual dificulta su dispersión en la planta. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Rentería-Canett *et al.*, (2007) que sugieren que existe una diferencia en la tasa de replicación y/o movimiento de ambos virus durante la infección mixta en la planta. En cuanto a la localización, en el tracto digestivo y aparato bucal en el insecto vector, en los periodos determinados de AAP, IAP y periodo de latencia, este sería el primer reporte de la localización de PHYVV y PepGMV en *B. tabaci*, y concuerda con la ruta propuesta por Hunter *et al* (1998) para los begomovirus ToMV y CaLCV, en la que se sugiere que el virus al ser ingerido del tejido de plantas infectadas entra por los estiletes y pasa al esófago e intestino anterior, posteriormente a la cámara filtrante y el intestino medio, de donde el virus pasa a través de membranas a la hemolinfa, donde al entrar en contacto con la membrana de las glándulas salivales atraviesan esas barreras y finalmente llegan a los ductos salivales y al final a la saliva contenida en los estiletes, y regresar nuevamente a las plantas al alimentarse.

Bibliografía

Azzam O, Frazer J, de la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204:289–96

Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177:85–94



Duffus, J.E. (1996). Whitefly-borne viruses. En: "Bemisia 1996: Taxonomy, biology, damage, control and management". Pp:255-263. Ed. Gerling D., Mayer, R.T. Intercept Ltd., U.K.

Guevara-González R.G., Ramos P.L. and Rivera-Bustamante R.F. (1999). Complementation of Coat Protein Mutants of Pepper Huasteco Geminivirus in transgenic Tobacco Plants. *Phytopathology* 89(7): 540-545.

Hofer P, Bedford ID, Markham PG, Jeske H, Frischmuth T. (1997). Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236:288–95

Hogenhout S.A., Ammar E.D., Whitfield A.E. and Redinbaugh M.G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu.rev.Phytopathol.* 46:327-359.

Hohnle M, Hofer P, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG, Frischmuth T. (2001). Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible *Abutilon mosaic virus* isolate. *Virology* 290:164–71

Hunter W.B., Hierbert E., Webb, S.E., Tsai, J.H. and Polston, J.E. (1998). Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease* 82: 1147: 1151.

Kennedy JS, Day MF, Eastop VF. (1962). *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses.* London: Commonw. Inst. Entomol.



Liu, S., Bedford, I.D., Briddon, R.W. and Markham, P.G. (1997). Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic virus geminiviruses requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology*. 78: 1791-1794.

Medina-Ramos, G; De La Torre-Almaráz, R; Bujanos-Muñiz, R; Guevara-González, R.G; Tierranegra-García, N; Guevara-Olvera, L; González-Chavira M.M; & Torres-Pacheco, I. (2008). Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* in Chili Pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.). *Journal of Entomology*, 5 , 176-184.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (1995). Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology. Supplement 10*.

Palmer, K.E. and Rybicki, E.P. (1998). The molecular biology of Mastreviruses. *Advances in Virus Research*. 50: 183-233.

Pascal, E., Goodlove, P.E., Wu, L.C. & Lazarowitz, S.G. (1993). Transgenic Tobacco Plants Expressing the Geminivirus BL1 Protein Exhibit Symptoms of Viral Disease. *Plant Cell* 5, 795-807.

Pascal, E., Sanderfoot, A. A., Ward, B. A., Medville, R., Turgeon, R., and Lazarowitz, S. G. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* 6, 995-1006



Rentería-Canett, I., Ruiz-Medrano, R. y Rivera-Bustamante, R.F. (2007). Infecciones mixtas de geminivirus en plantas de Chile: “Efectos en la localización y replicación de los virus PHYVV y PepGMV”. *En: Congreso Nacional de Virología.* Querétaro, México.

Rosell, R.C., Torres-Jeréz, I. and Brown, J.K. (1999). Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Virology* 89 (3): 239-246.

Ruiz-Medrano, R. y Rivera-Bustamante, R. (1997). Los geminivirus: Patógenos de plantas como modelos. *En: “Perspectivas de la microbiología en México” (Homenaje a Carlos Casas Campillo).* Eds.: J. Ruiz-Herrera, D. Guzmán de Peña y J.J. Peña Cabriales. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. & Lazarowitz, S.G. (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle: The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology* 110, 23-33.

Soto M J, Chen LF, Seo YS, Gilbertson RL. (2005). Identification of regions of the *Beet mild curly top virus* (family *Geminiviridae*) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology* 341:257–70.

van den Heuvel, J.F., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff V. and Brault, V. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* 71:7258–65.



DISCUSIÓN.

Parece ser que 330 UCA en aproximadamente un mes es lo más adecuado para la reproducción de mosquita blanca independientemente de que use tabaco o jitomate como hospedero.

Por otro lado no hay referencia de que geminivirus que infecten a papa vayan a frijol, tal vez por ello como las mosquitas blancas virulíferas se alimentaron de esta leguminosa en el primer paso generacional, la infección no progresó aun cuando el virus haya sido transmitido. En tal caso, los geminivirus probablemente si se replican, pero no son capaces de moverse dentro de la planta; situación similar a lo que se ha propuesto que ocurre en casos de de tolerancia en chile a geminivirus (Godínez-Hernández *et al.*, 2001). El hecho de que en los diversos hospederos usados a partir de la primera generación no se detectara la presencia viral sugiere que posiblemente no hay paso transovarial de los geminivirus.

Si bien en el sistema PHYVV-Chile cv. Sonora Anaheim los resultados sugieren que una sola mosquita blanca virulífera es capaz de iniciar la infección, no se puede generalizar, ya que el PHYVV difiere con otros geminivirus en que sólo puede ser transmitido vía insecto (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) y quizá por eso se haya desarrollado una mayor eficiencia la transmisión mediada por el vector. De cualquier forma este dato puede ser relevante para el manejo de la virosis que ocasiona el PHYVV en Chile.

Tanto en PHYVV como en PepGMV se observa que a medida que el tiempo de adquisición fue más extenso, mayor fue la severidad, esto quizá se relacione con el hecho de que la concentración del inoculo induzca un determinado nivel de severidad (López-Martínez *et al.*, 2003), y esta condición se va alcanzando en la medida que el vector tiene más tiempo para alimentarse y así adquirir una mayor cantidad de geminivirus.



Es posible que bajo estas condiciones, un bajo nivel de severidad le dé la posibilidad a la planta de alcanzar el estado fenológico de antesis y floración, y de esa manera la planta se vea menos afectada (López-Martínez *et al.*, 2003).

El hecho de que este virus no se pueda transmitir de inmediato confirma que como otros geminivirus estos también son persistentes y se incorporan al sistema circulatorio del insecto en donde todo indica que es necesario que se lleve a cabo alguna forma de procesamiento para que se pueda realizar la transmisión al hospedero.

Curiosamente, en los procesos de adquisición y transmisión en los cuales la fuente de inóculo solo contenía uno de los virus, o bien cuando todas las plantas fuente de inóculo contenían a los dos virus, se observó un comportamiento similar entre el PHYVV y el PepGMV. Sin embargo cuando la fuente de inóculo consistió en plantas que podían tener a los virus por separado, la eficiencia de adquisición y transmisión del PepGMV se redujo. Probablemente la transmisión de PHYVV es más eficiente en Chile debido a una mayor afinidad entre el hospedero y el patógeno.

Al respecto existen reportes en los que se ha señalado que en Chile, el PHYVV es capaz de complementar las funciones que implican al componente B de PepGMV, pero no al revés (Torres-Pacheco, 1997; Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Como el componente B de geminivirus aporta funciones relacionadas con el movimiento (Lazarowitz, 1992; von Arnim and Stanley, 1992), es posible que esto permita una mayor facilidad de movimiento al PHYVV en las plantas de Chile que al PepGMV. A la luz de nuestros resultados probablemente lo anterior pueda deberse a una mayor disponibilidad en las diferentes partes de la planta de Chile, de factores que pueden interactuar en el movimiento con el PHYVV.



De ser así, eso podría explicar no solo que se pueda transmitir más fácilmente sino que también se pueda adquirir más fácilmente el PHYVV por el vector en plantas de Chile. La infección mixta de PHYVV y PepGMV estaría favoreciendo la adquisición y transmisión de este último y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile.

De los ensayos para evaluar el efecto de la temperatura emergen dos aspectos relevantes. Por un lado la temperatura de 22°C es la más propicia para la incidencia y severidad de la enfermedad en el sistema patogénico Chile en donde se involucran geminivirus y su vector. Por otro lado se confirma que si bien un solo insecto es suficiente para inducir la enfermedad en una planta los efectos son mayores cuando se involucran más insectos. Sin embargo el efecto no es directamente proporcional, lo que sugiere que el factor importante en el disparo de la severidad y dispersión de la patogénesis viral en Chile es la temperatura. Es relevante que la temperatura de 22°C resultara ser la más propicia ya que la geminivirosis que disparó en México la atención en este tipo de patógenos fue el “rizado amarillo del Chile” reportado al sur del Estado de Tamaulipas (Garzón-Tiznado *et al.*, 1989), una zona tropical donde las medias de temperatura son mayores a 26°C. Sin embargo, el cultivo de Chile en esas regiones es invierno, período en que se presentan los fenómenos denominados “nortes” caracterizados por bajas de temperatura. Esto probablemente sea parte de la explicación del fenómeno de la falta de correlación directamente proporcional, en algunas ocasiones, entre la cantidad de mosquita blanca y la severidad y velocidad de dispersión de las geminivirosis.

Lo anterior, entonces depende del factor limitante; la falta de vector en temperaturas propicias o la falta de temperatura propicia en los casos que existe abundancia de vector. Es evidente que los niveles de severidad y dispersión más altos se dan en la interacción patógeno hospedero que incluye PepGMV.



No obstante es más estable en cualquier temperatura, la interacción en la cual se involucra al PHYVV. Esta situación refuerza la noción de que existe mayor grado de co-evolución entre este último virus y la planta de Chile (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Además, en conjunto con lo reportado por Méndez-Lozano *et al.*, (2003), en el cual se menciona que PepGMV pudiera tener un menor grado de coevolución con el Chile que PHYVV, podría explicar los altos niveles de acumulación viral de PHYVV en Chile.

La localización de PHYVV en el floema y los tubos cribosos de la planta hospedera permite una movilidad mayor. En contraste PepGMV, restringido a células del parénquima, tiene una movilidad menor, lo cual dificulta su dispersión en la planta. Además al localizar a los geminivirus en el tracto digestivo y el del vector

En cuanto a la localización, en el tracto digestivo y aparato bucal en el insecto vector, en los periodos determinados de AAP, IAP y periodo de latencia, este sería el primer reporte de la localización de PHYVV y PepGMV en *B. tabaci*.

Bibliografía.

Garzón-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella and R. Rivera Bustamante. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biobalistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.

Garzón-Tiznado, J.A., R.F. Rivera-Bustamante, L. Herrera-Estrella, F. Delgadillo-Sánchez and O. Pozo-Campodionico. (1989). Estudio preliminar sobre el rizado amarillo del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el sur de Tamaulipas. Un geminivirus. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Edo. de México.



Godínez-Hernández, Y., J.L. Anaya-López, R. Díaz-Plaza, M. González-Chavira, R.F. Rivera-Bustamante, I. Torres-Pacheco and R.G. Guevara-González. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience* 36: 139-142.

Lazarowitz, S. G. (1992). Geminiviruses: genome and structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science* 11: 327-349.

López-Martínez, N.A., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R.G., González-Chavira, M. Mora-Avilés, M.A., Reynoso-Camacho, R., Garzón-Tiznado, J.A. y Rivera-Bustamante, R. (2004). Influencia de algunos factores en la interacción geminivirus-chile. En memorias: First World Pepper Convention 82-91.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. and Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huastec virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 20-277.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brow, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and Distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

Torres-Pacheco, I. (1997). Geminivirus involucrados en el "rizado Amarillo del chile": Interacciones entre PHV y TPV. Tesis de Doctorado. Cinvestav-Irapuato, Gto. México.

Von Arnim, A. & Stanley, J. (1992). Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* 186: 286-293.



CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que fue desarrollado este trabajo, los datos obtenidos nos permiten sugerir las siguientes conclusiones:

1. No existe paso transovarial de los geminivirus en su vector *Bemisia tabaci* biotipo B.
2. En el sistema PHYVV-Chile cv. Sonora Anaheim-mosquita blanca un solo vector por planta es capaz de propagar la enfermedad.
3. En el sistema PHYVV-Chile cv. Sonora Anaheim-mosquita blanca el tiempo de adquisición y transmisión se correlacionaron directamente con la severidad y la incidencia
4. La mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gennadius es capaz de adquirir y transmitir en forma mixta a los geminivirus PHYVV y PepGMV.
5. Los virus PHYVV y PepGMV son persistentes y se incorporan al sistema circulatorio del vector.
6. En la infección mixta de PHV y PepGMV se estaría favoreciendo la adquisición y transmisión de este último y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile.
7. La explicación de las epidemias erráticas en términos de la correlación directa entre la cantidad de vector y la severidad y disparo de la epidemia depende de la temperatura como factor limitante.



Anexos

Se muestran los artículos publicados derivados del presente trabajo:

1. **Effect of Temperature on Viral Concentration and Symptoms Severity of PHYVV and PepGMV in Pepper Chili. 2009.** Medina-Ramos G., Hernández M. E., Guevara-González R.G., González-Chavira M. and Torres Pacheco I. En revisión en: *Journal of African Biotechnology*.
2. **Co-Transmission of Pepper Huasteco yellow vein virus and Pepper golden mosaic virus in Chili Pepper by Bemisia tabaci (Genn.). 2008.** Gabriela Medina Ramos, Rodolfo De La Torre Almaráz, Rafael Bujanos Muñiz, Ramón G. Guevara González, Nancy Tierranegra García, Lorenzo Guevara Olvera, Mario M. González Chavira and Irineo Torres Pacheco. *Journal of Entomology* Vol.5 No.3. (**Artículo requisito para obtención del grado**).
3. **Factores de importancia en la transmisión biológica de los geminivirus virus huasteco de la vena amarilla del chile y virus del mosaico dorado del chile. (2007).** Gabriela Medina-Ramos, Irineo Torres-Pacheco, Rodolfo de la Torre-Almaráz, Rafael Bujanos-Muñiz y Ramón G. Guevara-González. 2007. En: Gaceta del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG). Pp. 22-29.
4. **Caracterización biológica de un geminivirus asociado con el mosaico amarillo del abutilon (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) en México / Biological characterization of a geminivirus associated with abutilon (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) yellow mosaic virus in México. (2006).** Rodolfo De la Torre-Almaráz, Adrián Romero-Rodríguez, Alejandro Cruz Monsalvo-Reyes, Gabriela Medina-Ramos, Irineo Torres-Pacheco y Roberto Ruiz-Medrano. *Agrociencia* Vol.40 No. 3. Pgs.335-347.
<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/may-jun/art-6.pdf>

Effect of Temperature on Viral Concentration and Symptoms Severity of PHYVV and PepGMV in Chili Pepper

^{1, 3} Medina-Ramos G., ^{1, 2} Hernandez M. E., ⁴ Guevara-Gonzalez R.G. ¹Gonzalez-Chavira M. and ⁴Torres Pacheco I*.

¹Unidad de Biotecnología, Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Pecuarías, Carr. Celaya San Miguel de Allende Km 6.5, Apdo. Postal 112, C.P. 3810, Celaya Gto. Mexico. ²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av Tecnológico y A. García Cubas S/N, Colonia FOVISSSTE, Apdo. Postal 57, Celaya Gto. México. ³Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de estudios superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De Los Barrios No. 1. Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, C.P. 54090, Edo. De México, México. ⁴Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario Cerro de las Campanas, C. P. 76010, Querétaro Qro. México. Tel. +52 01 (442) 1921200 ext. 6096. Fax. +52 01 (442) 1921200 ext. 6006.

* Corresponding author: Dr. Irineo Torres-Pacheco. E-mail: irineo.torres@uaq.mx

Abstract. The effect of temperature in viral concentration and disease severity on chili pepper plants inoculated with Pepper Huasteco Yellow Vein Virus (PHYVV) and Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV) was investigated. Both viruses were inoculated in a single and mixed manner. Inoculation was carried out using whiteflies *Bemisia tabaci* Genn. as vectors. The results suggested that incubation temperatures of 22 °C, promoted disease severity in chili pepper plants c.v. Sonora Anaheim. Low temperatures (8°C) augmented viral concentration. On the other hand, the number of insect vectors did not seem to be determinant on the behavior of the mentioned variables.

Key words: geminivirus, chili pepper, temperature effect, whiteflies

Introduction

Pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV, formerly PHV) and pepper golden mosaic virus (PepGMV) are geminiviruses of genus *Begomovirus*, they have bipartite genome, are transmitted by the whitefly (*Bemisia tabaci* Genn) and infect dicots, including chili pepper (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2005). These geminiviruses are among the most widely distributed in chili pepper crops in México, and losses caused by diseases involving them ranged from 20 to 100 % (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005). PHYVV and PepGMV have been studied extensively to determine their distribution (Torres-Pacheco *et al.*, 1996), replication (Arguello-Astorga *et al.*, 1994), gene expression (Monsalve *et al.*, 2002), host resistance (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005), interactions between geminivirus (Mendez-Lozano *et al.*, 2003), and insect transmission (Medina-Ramos *et al.*, 2008), but there are no reports about the effect of temperatures on behavior as concentration and severity within infected plants with these viruses.

The type of plant-virus interaction could be influenced by several factors such as the virus isolate (Pelham, 1972), inoculum pressure, plant growth stage (Roggero *et al.*, 1996), plant genetic background (Laterrot, 1973, Pelham, 1972) and temperature (Nuez *et al.*, 1994).

Host plant response to virus infection might be altered by temperature in several forms. Thus, in Tomato spotted wilt virus (TSWV)-pepper (*Capsicum chinense*) interaction there has been detected that resistance depend on the temperature and growth stage of pepper (Soler, *et al.*, 1998). Normal tissue restriction can be overcome by shift of temperature as in the case of barley (*Hordeum vulgare*) infected with brome mosaic virus (BMV) (Ding, *et al.*, 1999). Temperature also affects the accumulation of derived defective interfering (DI) RNAs in virus as *Broad bean mottle virus* (BBMV) (Llamas *et al.*, 2004).

On the other hand, it has been reported that low temperature inhibits RNA silencing mediated resistance against virus in Cymbidium ringspot virus (CymRSV) (Szittyá, *et al.*, 2004). Interestingly, five species of cassava geminiviruses induced-RNA silencing in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and tobacco (*Nicotiana benthamiana*) increased by raising the temperature from 25°C to 30°C, with the appearance of less symptomatic newly developed leaves, regardless of the nature of virus (Chellappan *et al.*, 2005). Therefore, the aim of this work was to establish the basis for understanding the effect of temperature in pepper-geminiviruses (PHYVV and/or PepGMV) interaction under growth-chamber conditions. Our results suggested that severity in chili pepper infected with PHYVV and PepGMV was diminished in a low temperature (8°C) in comparison to high temperature (22°C) and, this severity was associated with a low viral concentration in the plant.

Materials and methods

Biological material. Infectious clones of PHYVV and PepGMV which have been described earlier (Garzón Tiznado *et al.*, 1993; Torres Pacheco, *et al.*, 1996) were used during this work. Plants used in this study were chili pepper cv. Sonora Anaheim. The virus-source plants for this study were obtained as previously reported (Medina-Ramos *et al.*, 2008).

Procedure of infection. A virus-free whitefly *Bemisia tabaci* (biotype B) colony was established according to Medina-Ramos *et al.*, (2008). These whiteflies were contacted with each kind of virus-source plant for a 24 h acquisitions access period (aap) inside of a structure consisting in a plastic container measuring 11 cm in diameter and 15 cm height. The vector was withdrawn once the process was completed. Growth chamber conditions were maintained at a temperature of 24°C and relative humidity of 70%. Then, experimental pepper plants at the four-leaf stage were contacted with only one virulent

whitefly for each one for a 48 h period in the same conditions of temperature and relative humidity previously mentioned. Further, insects were recovered and maintained to -20 °C for DNA extraction.

Experimental procedure. Several temperature levels: 33, 26, 24, 22, 18 and 8 °C, with 70% of relative humidity in all the trials were tested. Temperatures 26, 24 and 22 °C are typical of several chili pepper producing areas in México, whereas 33 and 18 °C are almost the biological threshold of chili pepper and *B. tabaci* (Muñiz and Numbela, 2001). Three replicates of twenty plants each one (sixty per treatment) were carried out. Assays were carried out with PHYVV, PepGMV and their respective mixed infection. The experimental plants were arranged inside the growth chambers in a completely randomized design. Pepper plants were maintained during 30 days inside the growth chamber to allow the incubation of the virus. Selection of plants for viral DNA analysis was made 20 days after the inoculation.

Detection of PHYVV and PepGMV within chili pepper plants and whiteflies. Detection of PHYVV and PepGMV in the plants and in the insects was carried out using PCR with specific primers for each virus as reported previously (Anaya- López *et al.*, 2003; Mendez-Lozano *et al.*, 2003). The amplified DNA fragments were analyzed by electrophoresis in agarose gels (1%, 80 volts, 1h). The measured response in these trials was the grade of severity of the infection according to the scale reported by Godinez-Hernandez *et al.*, (2001). DNA extraction from experimental plants was carried out as described in Dellaporta *et al.*, (1983). Insect DNA extraction was carried out using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia C.A., USA). Disruption of the insects was made in an electric mixer with 180 µL of phosphates buffer pH 7.0 and then homogenized.

Geminiviruses'genomes quantitation. PHYVV and PepGMV genomes were quantified using real time PCR (rtPCR) using specific primers for each virus (For PepGMV: forward primer, 5'GGATTTTGGTGGTAGTGGCATTTT3'; reverse primer, 5'GGACTCCACAACATATGACAGAAGT3'; Taqman reporter sequence, 5'-FAM dye-CAAATATGGTGTAGGACTCC-NFQ-3'. For PHYVV: forward primer, 5'TGAAATTAACATAAGTGGTCCATGTACCT; reverse primer, 5'CCGTTAATCGCCAAGGAGCAT3'; Taqman reporter sequence, 5'-FAM dye-CACGCTTAGGCATTTTGAATT-NFQ-3') in a thermocycler for rtPCR (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

Statistical Analysis. Data were subjected to analysis of variance using the general linear models with the SAS methods.

Results

Previous analysis to plants and vectors. Plants previously inoculated with PHYVV and/or PepGMV were used as virus source to infect experimental plants. It was tested the respective viral presence into the plant by PCR and the typical results are shown in Figure 1 (Panels A and B). As seen in figure 1, plants used as virus source effectively were infected with each virus used in the work. In order to verify the virus-free state within plants and whiteflies used in further trials, DNA samples were obtained from experimental biological material before making those trials and PCR analyzed. In all samples virus-free plants and whiteflies were detected (Figure 1 C and D). To evaluate that initially virus-free whiteflies mentioned before, had acquired to PHYVV or to PepGMV, the respective samples were analyzed by PCR (Figure 2 A and B). As seen in the figure, both geminiviruses were acquired by whiteflies.

Additionally, both geminiviruses were detected within pepper plants (cv. Sonora Anaheim) inoculated either with 1 or 8 whiteflies (Figure 3 C and D); which probed the efficiency of the inoculation system used in this work as previously reported (Medina-Ramos *et al.*, 2008).

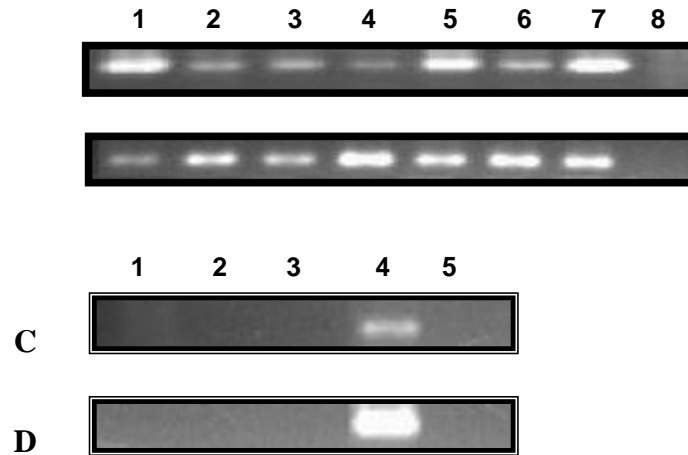


Figure 1. Detection by PCR of PHYVV and PepGMV within plants used as virus source, virus-free plants and whiteflies. Panel A, Detection of PHYVV (size amplification 350 bp). Lines 1-3, infected plants with PHYVV. Lines 4-6 mixed infected-plants with PYYHV and PepGMV. Line 7 positive control. Line 8 negative control. Panel B, detection of PepGMV (size amplification 280 bp). Lines 1-3 Plants only infected with PepGMV. line 4-6 mixed infected plants with PYYHV and PepGMV. Line 7 positive control. Line 8 negative control. Panel C, Detection of PHYVV in virus-free plants and whiteflies. Lines 1-3 samples of experimental plants, line 4 positive control, line 5 sample of whiteflies used as vector. Panel D, Detection of PepGMV. Lines 1-3 samples of experimental plants, line 4 positive control, line 5 sample of whiteflies used as vector.



Figure 2. Detection of geminiviruses' acquisition within whiteflies. A) Panel A, PHYVV. B) Panel B, PepGMV. Lane 1, whitefly single infection; Lane 2, whitefly mixed infection. Lane 3, positive Control; Lane 4, negative Control.

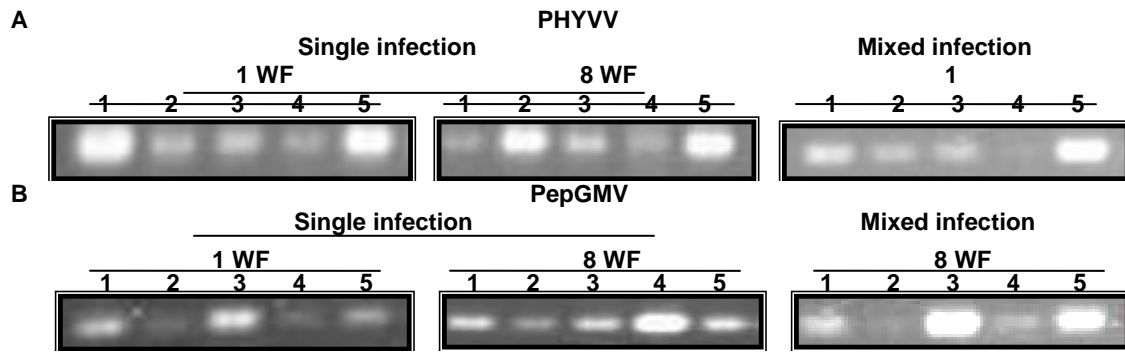


Figure 3. Detection of geminiviruses with plants inoculated with 1 or 8 single or mixed virus-infected whiteflies. Panel A, PHYVV detection in tissue samples from 5 plants in single and mixed infection using 1 whitefly (1 WF) or 8 whiteflies (8 WF). Panel B, same simbology but detection of PepGMV.

Symptoms severity on plants. Determination of symptoms severity on plants was evaluated according to reports by Godínez-Hernández et al., 2001. As shown in Table 1, the higher severity was observed either in single or mixed infection at 22 °C using one whitefly. The major severity levels were detected both in mixed and PepGMV single infection (Table 1). On the other hand, when eight whiteflies were used in the study, again 22 °C was the temperature in which the highest severity on plants was observed (Table 1). Additionally, using eight whiteflies severity slightly increased in comparison to one whitefly infections although not in a proportional manner.

Table 1. Effect of temperature of incubation on severity in pepper plants inoculated with 1 or 8 geminiviruses-infected whiteflies

Temperature (°C)	Number of whiteflies	Severity		
		PepGMV	PHYVV	Mixed
8	1	2 ± 0.15	2 ± 0.18	1 ± 0.10
18	1	3 ± 0.10	2 ± 0.17	2 ± 0.20
22	1	4 ± 0.20	5 ± 0.10	6 ± 0.16
24	1	2 ± 0.17	2 ± 0.18	3 ± 0.20
26	1	3 ± 0.18	3 ± 0.10	4 ± 0.20
33	1	3 ± 0.10	3 ± 0.15	3 ± 0.10
8	8	2 ± 0.10	2 ± 0.10	1 ± 0.17
18	8	3 ± 0.20	3 ± 0.15	3 ± 0.15
22	8	6 ± 0.15	7 ± 0.20	8 ± 0.18
24	8	3 ± 0.20	3 ± 0.15	3 ± 0.10
26	8	4 ± 0.15	4 ± 0.10	6 ± 0.10
33	8	4 ± 0.20	4 ± 0.10	3 ± 0.10

Incidence of infection and virus concentration. The incidence of plant infection was higher at 18 and 22 °C when used one whitefly; whereas for eight whiteflies the best infections were reached at 22 and 24 °C (Table 2). Virus concentration in single and mixed infections was the highest when used 1 or 8 whiteflies and temperatures of 8°C and 22 °C. The highest virus concentration was obtained with PHYVV and one whitefly at both temperatures (Table 3).

Table 2. Effect of temperature of incubation on virus incidence within pepper plants inoculated with 1 or 8 geminiviruses-infected whiteflies

Temperature (°C)	Number of whiteflies	Incidence (No. infected/No. inoculated plants)		
		PHYVV	PepGMV	Mixed
8	1	24/60	36/60	30/60
18	1	57/60	51/60	57/60
22	1	54/60	60/60	54/60
24	1	48/60	48/60	57/60
26	1	48/60	51/60	51/60
33	1	51/60	39/60	51/60
8	8	42/60	48/60	30/60
18	8	57/60	57/60	57/60
22	8	57/60	60/60	60/60
24	8	59/60	59/60	60/60
26	8	57/60	57/60	57/60
33	8	54/60	48/60	51/60

Table 3. Effect of temperature on viral concentration in single and mixed infections of pepper plants.

Virus concentration			
Temperature (°C)	Number of whiteflies	PHYVV ()*	PepGMV ()*
8	1	1403.7±0.47 (1737±1.15)	2694±0.34 (1029±0.27)
18	1	18.35±0.98 (7.93±1.56)	2.146±1.50 (6.1±1.21)
22	1	5545±0.35 (1099.7±0.16)	5.89±0.98 (21.97±0.79)
24	1	6.85±2.51 (2.40±1.5)	7.20±0.65 (5.63±0.71)
26	1	10.28±1.83 (2.95±1.0)	5.46±0.63 (5.37±1.82)
33	1	5.42±1.24 (4.01±0.41)	1.62±0.17 (3.87±0.356)
8 (956.09±0.402)	8	209±0.36 (691.19±0.15)	28816±0.41
18	8	4.44±0.26 (27.28±0.66)	11.82±1.41 (7.10±1.06)
22	8	82.47±0.53 (2947.8±0.35)	22.31±0.29 (84.21±1.45)
24	8	4.67±0.79 (25.86±1.23)	9.57±1.08 (76.58±0.81)
26	8	14.63±0.11 (11.71±1.04)	16.51±0.20 (45.5±1.07)
33	8	1.10±0.56 (6.72±0.38)	8.97±1.64 (14.86±0.60)

()* data among parenthesis are for the respective virus in mixed infection.

Discussion

In this study the geminiviruses' inoculation methodology using whiteflies showed to be efficient as reported before by Medina-Ramos *et al.*, 2008. Besides, it was evaluated the possibility that one whitefly was enough to provoke geminivirus disease, and on the other hand, that a high vector number (eight whiteflies) guaranteed the success of inoculation and thus, carry out the aim of this work. Interestingly, the tendencies in both inoculation cases regarding symptoms severity, incidence and virus concentration were similar.

Then, we carried out the analysis of the effect of temperature on the variables under evaluation in this work. First, regarding to symptoms severity and incidence of infection, the major levels were detected both in mixed and PepGMV single infection at temperatures between 18 and 24 °C (with predominance at 22 °C) when inoculation was done either with 1 or 8 whiteflies. This latter result agrees with those reported by Mendez-Lozano *et al.*, (2003), in which it is mentioned that PepGMV could have a lesser coevolution with pepper than PHYVV, such as, the former virus accumulates higher levels than the latter one within this host. On the other hand, virus concentration was the highest when used 1 or 8 whiteflies and temperatures of 8 °C and 22 °C. Interestingly, on the whole, the pepper plants used in the study supported more quantity of PHYVV genomes than those of PepGMV in mixed infections, which again agree with reports of Mendez-Lozano *et al.*, 2003, for the behavior of these geminiviruses in mixed infections within pepper plants. Additionally and based in our results, it could be mentioned that temperature of incubation is determinant in this geminiviruses-pepper interaction, in which temperatures of 22°C displayed a higher severity, incidence; and low temperatures (8°C) supported a higher virus concentration than those observed with high temperature.

It has been recognized that plant-virus interactions are strongly modified by environmental factors; especially by temperature (Szittyia *et al.*, 2003). High temperature is frequently associated with attenuated symptoms ('heat masking') and with low virus content of virus-infected plants (Johnson, 1922; Hull, 2004). In contrast, rapid spread of virus diseases and the development of severe symptoms are frequently associated with cold air temperature (Hine *et al.*, 1970; Gerik *et al.*, 1990). In our study, relative low temperatures as 18-22°C corresponded with higher levels of severity, incidence and virus concentration. In this latter aspect, 8 °C showed to be a temperature that although did not related a high severity or incidence of infection, provoked a high virus concentration, which again agree with the mentioned reports. Harrison (1956) has speculated that the virus content of a plant represents equilibrium between replication and degradation and that the activity of the virus degrading system increases with temperature. However, although the underlying molecular mechanisms of these effects of temperature are still not enough understood one possibility is that RNA silencing is the virus degradation system. It has been demonstrated that RNA silencing-mediated plant defense is temperature dependent, with low temperatures occasioning an inhibition and rising temperatures activating it (Szittyia *et al.*, 2003). This phenomenon could explain in general, the behavior of severity, incidence and virus concentration observed in this work. Finally, taken together our results suggest that incubation temperatures between 18-24 °C promote symptoms severity and incidence of infections with PHYVV and PepGMV in single or mixed infections. Besides, one geminivirus-infected (single or mixed) whitefly is enough in order to promote severe disease in pepper plants.

Acknowledgements

Authors thanks to FOMIX-GTO (GTO-2003-CO2-1154, agreement 03-24-A-022), and Proyecto de equipamiento del Laboratorio de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la UAQ-2008. Gabriela Medina-Ramos also acknowledges to CONACYT and DGEP-UNAM for fellowship support. Hernandez-Maldonado acknowledges to CONCYTEG. Authors acknowledge also to Adriana Medellín for technical review of english writting.

References

Anaya-López, J.L; Torres-Pacheco I; Guevara-González, R.G; González-Chavira, M; Pons-Hernández, J.L; Guevara-Olvera, L; Muñoz-Sánchez, C.I; Hernández-Verdugo, S & Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Resistance to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers (*Capsicum spp*). Hortscience, 38, 251-255.

Anaya-López, J.L; Pérez-Mora, E; Torres-Pacheco, I; Muñoz-Sánchez, C.I; Guevara-Olvera, L; González-Chavira, M; Ochoa-Alejo, N; Rivera-Bustamante, R.F;& Guevara-González, R.G. (2005). Inducible Gene Expression by *Pepper Huasteco Geminivirus* (PHV) in *Capsicum chinense* Jacq. Plants with Resistance to Geminivirus Infections. Canadian Journal of Plant Pathology, 27, 276-282.

Argüello-Astorga, G.R; Guevara-González, R.G; Herrera-Estrella, L.R; & Rivera-Bustamante R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. Virology, 203, 90-100.

Chellappan, P; Vanitharani, R; Ogbe, F; & Fauquet, C. M. (2005). Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants. Plant Physiology, 138, 1828-1841.

Dellaporta, S.L; Wood, J; & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1, 19-21.

Ding, X. S; Flasiński S; & Nelson R. S. (1999). Infection of Barley by Brome Mosaic Virus Is Restricted Predominantly to Cells in and Associated with Veins through a Temperature-Dependent Mechanism. Molecular Plant Microbe Interactions, 12, 615–623.

Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibañez, J. T., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. F. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology*, 83, 514-521.

Godínez-Hernández, Y; Anaya-López, J.L; Díaz-Plaza, R; González-Chavira, M; Torres-Pacheco, I; Rivera-Bustamante, R.F, & Guevara-González, R.G. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *Hortscience*, 36, 139-142.

Hine, R.B., Osborne, W.E., & Dennis, R.E. (1970). Elevation and temperature effects on severity of maize virus in sorghum in Arizona. *Plant Disease Report*, 54, 1064-1068.

Hull, R. (2004). *Matthews Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Johnson J. (1922). The relation of fair temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology*, 12, 438-440.

Laterrot, H. 1973. Resistance de la tomate au virus de la mosaïque du tabac. Difficultés rencontrées pour la sélection de variétés résistantes. *Annals Améliorate Plantes*, 23, 287-316.

Llamas, S., Sandoval, C., Babin, M., Pogany, J., Bujarski, J. J., & Romero, J. (2004). Effect of the host and temperature on the formation of defective RNAs associated with *Broad bean mottle virus* infection. *Phytopathology*, 94, 69-75.

Medina-Ramos, G; De La Torre-Almaráz, R; Bujanos-Muñiz, R; Guevara-González, R.G; Tierranegra-García, N; Guevara-Olvera, L; González-Chavira M.M; & Torres-Pacheco, I. (2008). Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* in Chili Pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.). *Journal of Entomology*, 5 , 176-184.

Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M; & Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huastec virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93, 270-277.

Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2002). Geminivirus Gene Expression and Replication. In: *Plant Viruses as Molecular Pathogens*. Haworth Press, Inc. ISBN: 1-56022-895

Muñiz, M; & Nombela, G. (2001). Differential Variation in Development of the B- and Q-Biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on Sweet Pepper at Constant Temperatures. *Environmental Entomology*. [30\(4\)](#):720–727.

Nuez, F., Díez, M. J., Roselló, S., Lacasa, A., Jordá, C., Martín, M., & Costa, J. (1994). Genetic resistance to TSWV (Tomato spotted wilt virus) in *Capsicum* spp. *Capsicum Eggplant Newsletters*, 13, 86-87.

Pelham, J. (1972). Strain-genotype interaction of tobacco mosaic virus in tomato. *Annals of Applied Biology*, 71, 219-228.

Roggero, P., Lisa, V., Nervo, G., & Pennazio, S. (1996). Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'PI-152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Phytopathology Mediterranean*, 35, 117-120.

Soler, S., Díez, M. J., & Nuez, F. (1998). Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Disease*, 82, 1199-1204.

Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., & Burgyán, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal*, 22, 633- 640.

Torres-Pacheco, I.; Garzón-Tiznado, A.; Brown,J.K.; Becerra-Flora,A.; & Rivera-Bustamante, F.R. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, 86, 1186-1192.

**Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and
Pepper golden mosaic virus in Chili Pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.)**

^{1,2}Gabriela Medina-Ramos, ¹Rodolfo De La Torre-Almaráz, ²Rafael Bujanos-Muñiz,
⁵Ramón G. Guevara-González, ⁴Nancy Tierranegra-García, ³Lorenzo Guevara-Olvera,
²Mario M. González Chavira and ⁵Irineo Torres-Pacheco

¹Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De Los Barrios No. 1,
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, C.P. 54090. Edo, De México, México

²Campo Experimental Bajío, Centro de Investigación Regional del Centro,
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carr. Celaya-San
Miguel de Allende Km. 6.5. Apdo, Postal No. 112, C.P. 38010, Celaya, Gto, México

³Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya,
Av. Tecnológico y A. García Cubas, S/N, Col. FOVISSTE. Apdo. Postal 57,
Celaya, Gto, México

⁴Instituto Tecnológico de Roque. Carr. Celaya-Juventino Rosas, Apdo,
Postal 508 Roque, Celaya, Gto, C.P. 38110 México

⁵Facultad de Ingeniería, Centro Universitario Cerro de las Campanas,
Universidad Autónoma de Querétaro, C.P.76010 Querétaro, Qro, México

Abstract: The capacity of simultaneously acquiring and transmitting *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) geminiviruses by their whitefly vector (*Bemisia tabaci* Gennadius) to pepper plants *Capsicum annuum* was investigated. Information was obtained relating to the effect of factors involved in the virus-plant interaction such as whiteflies density by plant, Acquisition Access Periods (AAP), Inoculation Access Periods (IAP) and source of viral infected plants. Transmission trials indicated that a single virus-infested whitefly can transmit PHYVV and PepGMV to pepper plants. It was demonstrated that an AAP of 1 h was sufficient for acquisition of PHYVV and PepGMV by the vector. A minimum IAP of 48 h was required for the vector to transmit these geminiviruses to the plant. We also determined that one whitefly was capable of acquiring and transmitting both geminiviruses simultaneously. It appears that PHYVV helps in the dispersion of PepGMV inside the plant. Several possible explanations of our results are discussed.

Key words: Whitefly, geminivirus, vector transmission, pepper, virus-vector interaction.

INTRODUCTION

The whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius is a pest of many important crops in Mexico (Avila-Valdez and Hinojosa-Reyes, 2000). This species affects crops such as pepper, tomato, celery, sweet potato, spinach, bean, potato, tobacco, cassava, carrot, crucifers and cucurbits. Whiteflies belong to the order Hemiptera, which includes 1200 species of 140 genera. These insects affect crops and weeds in different ways either they are herbaceous or ligneous. The agricultural problems related to whiteflies have increased due to factors such as: the transportation of infected material with insects, changes in weather conditions, intensification of agricultural practices, indiscriminate use of insecticides

Corresponding Author: Irineo Torres-Pacheco, Facultad de Ingeniería, Centro Universitario Cerro de las Campanas,
Universidad Autónoma de Querétaro, C.P.76010 Querétaro, Qro, México

and development of insecticide resistance (Cohen, 1990). The whitefly *B. tabaci* was first reported in Mexico in Southern Tamaulipas in 1986, associated with the pepper disease named rizado amarillo del chile (Brown *et al.*, 1989; Garzón-Tiznado *et al.*, 1989), in which geminiviruses were subsequently found to be involved (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Garzón-Tiznado, 1998; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Geminiviruses belong to the Geminiviridae family. They have twined particle morphology and circular, single stranded DNA genome, with either monopartite or bipartite genomic organization (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). The Geminiviridae include four genera (Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus and Begomovirus), based on genomic structure, host range and type of insect vector. Mastrevirus and Curtovirus have monopartite genomes and are transmitted by leafhoppers. The Mastreviruses infect monocots and Curtoviruses infect dicots. Topocuvirus includes all variants of the *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV). Finally, Begomoviruses, containing a bipartite genome, are whitefly (*Bemisia tabaci*)-transmitted and infect dicotyledonous plants (Soto and Gilbertson, 2003).

The first reported geminivirus-associated disease of pepper crops was the rizado amarillo del chile caused by Begomoviruses including *Pepper huasteco virus* (PHV, now called *Pepper huasteco yellow vein virus* or PHYVV) and *Texas pepper virus* (TPV, now called *Pepper golden mosaic virus* or PepGMV), that were associated with the disease (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco, 1997). In Mexico, pepper is the one of the most important horticultural crops. In different pepper producing regions, both PHYVV and PepGMV have been detected in mixed or single infections (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Vera-Aguado, 2000).

The rizado amarillo del chile was the first reported disease associated with mixed infections by geminiviruses and thus provide an interesting model to study acquisition and transmission of both viruses by *B. tabaci*. Some research has been carried out in México in order to understand the pepper-geminivirus interaction (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). However, nothing is known about the process regarding the role of the vector in the acquisition and transmission of both geminiviruses (Hunter *et al.*, 1998). Some data suggests that the transmission of geminiviruses is carried out in a persistent and circulative manner. A period of latency of approximately 6 to 12 h was required before the transmission event of *Squash leaf curl virus* (SLCV) (Rosell *et al.*, 1999, 2003). It has been speculated that geminiviruses do not replicate inside the whitefly since there is no transovarial step. Although recent reports of transmission in the case of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in a population of *B. tabaci* suggested otherwise (Ghanim *et al.*, 1997). Knowledge about the biology of acquisition and transmission of geminiviruses by whiteflies is needed in order to improve the control of geminivirus diseases. The goal of this work was to determine the effect of some factors in the single and simultaneous PHYVV and PepGMV transmission by whiteflies.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of a Whitefly (*B. tabaci* Genn.) Colony

A whitefly *B. tabaci* (biotype B) colony was established on Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) and was put into rearing boxes (60×35×30 cm). To ensure that whiteflies were virus-free, the insects were reared during five alternate generational steps using different host plants as following: potato, cotton, bean, tomato and finally tobacco. Detection of geminiviruses within the vectors and the host plants was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) as reported previously (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 1993). This study was carried out between March 2006 and August 2007.

Source of Geminivirus-Infected Plants

For the studies of virus acquisition and transmission, pepper plants (*Capsicum annuum* c.v. Sonora Anaheim) were inoculated by a biolistic procedure (750 psi and gap distance of 2 cm) using a concentration of 2.5 µg of each viral DNA component (Anaya-López *et al.*, 2003). These viral

components were cloned in the plasmid Blue Script (SK +) and digested with Eco RI for A component of both PHYVV and PepGMV; Bam HI for PHYVV B component and Hind III for PepGMV B component prior to inoculation of the plants. Plants were incubated under greenhouse conditions and used in transmission trials of 15 days after inoculation (dai).

Virus-Vector Transmission Relationships

The whiteflies were placed individually in contact with the virus-source plants or host plants. During the Acquisition Access Periods (AAP) or Inoculation Access Period (IAP), the whiteflies remained inside a structure that consisted of a plastic container measuring 11 cm in diameter and 15 cm height. The insects were withdrawn once the corresponding process was complete. The plants were then incubated in a growth chamber for 5 days. Conditions within the growth chamber were maintained at a temperature of 24°C and relative humidity of 70% during the transmission experiments. Four replicates of five plants (twenty plants per treatment) were evaluated. The number of vectors varied only in the test trials. All of the other trials were carried out with one whitefly per plant. Experimental plants were arranged inside the growth chambers in completely randomized positions. To determine the minimum number of *B. tabaci* adults required to transmit PHYVV and PepGMV, whiteflies were allowed to feed on virus-infected plants for a 48 h Acquisition Access Period (AAP) and then allocated in groups of 1 and 2 vectors/plant for a 48 h Inoculation Access Period (IAP). The AAP required for the transmission of PHYVV and PepGMV was determined by feeding *B. tabaci* adults on infected plants for periods of 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h. The tests were carried out with one whitefly by plant for a 48 h IAP. The IAP required for the transmission of PHYVV and PepGMV was determined by feeding *B. tabaci* adults on infected plants for 24 h AAP. The tests were carried out with one whitefly by healthy plant for a 12, 24 and 48 h IAP. Finally, in the mixed infection assays, the analysis consisted of five different kinds of virus source: (1) three plants inoculated only with PHYVV, (2) three plants inoculated only PepGMV, (3) three plants harbouring both geminiviruses, (4) three plants: one of them harbouring only PHYVV, the second harbouring only PepGMV and the third with the mixture and (5) two plants: One carrying only PHYVV and another with PepGMV only. The tests were carried out with one whitefly per plant.

Detection of PHYVV and PepGMV

Detection of PHYVV and PepGMV in the plant and in the insect was carried out using PCR with specific primers for each virus according to Anaya-López *et al.* (2003). The amplified DNA fragments were analyzed by electrophoresis in agarose gels (1%, 80 volts, 1 h). The measure of response in these trials was evaluated as the grade of the severity of the infection with the scale reported by Godínez-Hernández *et al.* (2001).

DNA Extractions

Plant DNA extractions were carried out according to Dellaporta *et al.* (1983) and for insect DNA extractions we utilized DNeasy Tissue kits (QIAGEN, Valencia C.A., USA). The whiteflies were collected from the plants and maintained at -70°C for subsequent individual DNA extraction. Disruption of the insect was carried out in an electric mixer with 180 µL of phosphates buffer pH 7.0 and then homogenized.

Statistical Analysis

Data were subjected to analysis of variance using the general linear models according to SAS methods. Statistical differences between treatments were analyzed by Tukey's method (Montgomery, 1991).

RESULTS

Detection of Virus-Free Whiteflies

The initial collection of adult whiteflies was carried out in a confined box containing 65-day-old potato plants. Thus, the whiteflies were then transferred successively to five plants each of the following crops: Bean, cotton, tomato and tobacco. Geminivirus detection was carried out in order to confirm the virus-free state of the whiteflies used in the transmission experiments. No geminivirus was detected in the first generation (Fig. 1). We did not detect geminiviruses in any of the successive host plants used in the different generations handled with the vector. In the case of potato, we detected geminivirus, but never within the vector.

Virus Transmission Studies

One or two whiteflies per plant were used to determine the minimum number of whiteflies to transmit PHYVV and PepGMV. The results suggested that one individual whitefly was sufficient to transmit geminiviruses and cause infection. In Fig. 2, the DNA amplification results indicated viral

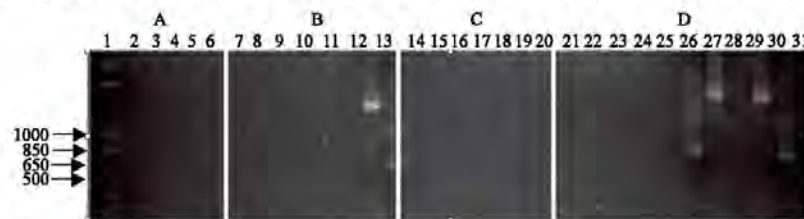


Fig. 1: Detection of Geminiviruses. Products of PCR obtained of extracts of DNA of Whitefly (WF) and of plants used through several generation transfers. Panel A, lane (1) Molecular marker 1 kb Leader, lanes (2-6) PCR of 1st-5th generation of WF with the primers of Rojas (≈ 1156 pb); Panel B, lanes (7-11) PCR of 1st-5th generation of WF with the primers of MOT-CP (≈ 650 pb); lane (12) PCR of the initial population of WF with the primers of Rojas; lane (13) PCR, of the initial population of WF with the primers of MOT-CP; Panel C, lanes (14-20) PCR using the primers of Rojas in plants used to produce the 1st one to the fifth generation of WF, bean, cotton, cotton, tomato and tobacco, respectively; Panel D, lanes (21-25) PCR using the primers of MOT-CP in plants used to produce the 1st one to the fifth generation of WF, bean, cotton, cotton, tomato and tobacco, respectively; lane 26 PCR with the primers MOT-CP of the potato plant of where was carried out the initial collection of WF, lane 27 PCR with the primers Rojas of the potato plant of where was carried out the initial collection of WF; lane (28) PCR with the primers of Rojas of a viral free pepper plant; lane (29) PCR with the primers of Rojas of viral source plant (positive control); lane (30) PCR with the primers of MOT-CP of a viral source plant (positive control) and lane (31) PCR with the primers of MOT-CP of a viral free pepper plant (negative control)



Fig. 2: Detection of PHYVV in plants infected with only one whitefly. PCR with the primers 240 and 241, lane (1) Molecular marker 1 kb Ladder; lane (2-3) Negative Control; not infective whitefly; lanes (4-7) plants inoculated with a single WF; lane (8-10) plants inoculated with two WF and lane (11) plant infected with PHYVV (positive control); lane (12) virus-free pepper plant (negative control)

Table 1: Effect of Acquisition Access Period (AAP) in the feeding on PHYVV-induced symptom severity and incidence of infection by a single whitefly

Acquisition Access Period (AAP) (h)	Symptom severity	Incidence*	PHYVV detection in plant**
48	4±0.30 ^a	18/20±1.0 ^a	Positive
24	3±0.17 ^{ab}	16/20±0.8 ^{ab}	Positive
12	3±0.19 ^{ab}	16/20±0.7 ^{ab}	Positive
6	3±0.27 ^{ab}	17/20±1.0 ^a	Positive
3	2±0.22 ^{bb}	18/20±0.7 ^a	Positive
1	2±0.17 ^{bb}	18/20±0.9 ^a	Positive

The values are medium±standard deviation; 4 repetitions by treatment (p>0.05), *: No. of the plants infected by treatment
 **: PHYVV detection was carried out using the primers 240 and 241 (1)

Table 2: Effect of the different Inoculation Access Periods (IAP) in the feeding on PHYVV-induced symptom severity and incidence of infection by a single whitefly

Inoculation Access Period (IAP) (h)	Symptom severity	Incidence*	PHYVV detection in plant**
48	4±0.02	18/20±0.89	Positive
24	0±0.00	0/20±0.00	Negative
12	0±0.00	0/20±0.00	Negative

The values are medium±standard deviation; 4 repetitions by treatment (p>0.05), *: No. of the plants infected by treatment
 **: PHYVV detection was carried out using the primers 240 and 241 (1)

Table 3: Effect of the different Acquisition Access Period (AAP) in the feeding on PepGMV-induced symptom severity and incidence of infection by a single whitefly

Acquisition Access Period (AAP) (h)	Symptom severity	Incidence*	PepGMV detection in plant**
48	7±0.06 ^a	19/20±a	Positive
24	6±0.09 ^{ab}	16/20±a	Positive
12	5±0.09 ^b	18/20±a	Positive
6	5±0.05 ^b	15/20±b	Positive
3	5±0.07 ^b	16/20±a	Positive
1	5±0.08 ^b	14/20±b	Positive

The values are medium±standard deviation; 4 repetitions by treatment (p>0.05), *: No. of the plants infected by treatment
 **: PepGMV detection was carried out using the primers JM23 and JM 24 (1)

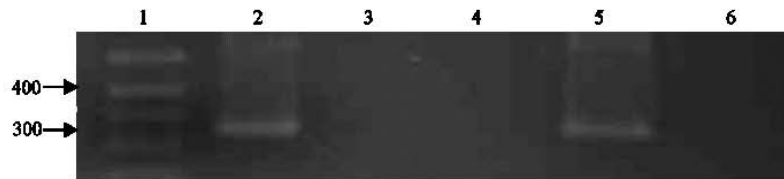


Fig. 3: Detection of PHYVV in plants exposed to different periods of transmission with the vector. Lane (1) Molecular marker 1 kb Ladder; transmission periods 2-4, (48, 24 and 12 h, respectively); 5, positive control and 6, negative control

presence when plants were inoculated with one virus-infested whitefly. The AAP required for the transmission of PHYVV indicated that 1 h was sufficient time for ingestion and PHYVV acquisition (Table 1). The longer the period of acquisition, the greater the severity of the disease. A lower incidence was observed for 12 and 24 h acquisition than for the rest of the trials.

Approximately 48 h was required for transmitting PHYVV after acquisition (Fig. 3). Inoculated plants had no viral symptoms and the virus was not detected in plants with 12 or 24 h of IAP (Table 2, Fig. 3). As in the case of PHYVV, PepGMV could also be ingested and acquired by the whitefly even in 1 h AAP. The previous result is inferred from the presence of the symptoms and the virus in the plant (Table 3). The longer the AAP, the greater the severity. Disease severity was greatest when the plants were inoculated with PepGMV. As for PHYVV, PepGMV could be transmitted after 48 h of IAP.

Table 4: Effect of different types of inoculum source plants on incidence* of mixed infection by whitefly

Treatments	PHYVV in plant	PepGMV in plant	PHYVV in whitefly	PepGMV in whitefly
1PHV (control)	18/20±2.34 ^a	0/20±0.00	18/20±1.56	0/20±0.00
1PepGMV (control)	0/20±0.00 ^c	17/20±1.67	0/20±0.00	20/20±0.00
3 PHV-PepGMV	19/20±2.17 ^b	18/20±1.78	19/20±2.24	19/20±1.00
1 PHV+1 PHV- PepGMV+1 PepGMV	12/20±1.98 ^b	0/20±0.05	20/20±0.00	11/20±1.28
1PHV+1 PepGMV ₂	13/20±2.10 ^b	2/20±0.07	20/20±0.00	4/20±2.10

The values are medium±standard deviation; 4 repetitions by treatment (p>0.05), *, No. of the plants infected by treatment
 **: PHYVV and PepGMV detection was carried out using the primers240 and 241 and JM23 and JM24, respectively (1)



Fig. 4: Detection of PHYVV and PepGMV within plant and vector with mixed infections. Even lanes PHYVV and odd lanes PepGMV, the minor number in each Panel corresponds to the detection in the plant and the major number corresponds to the vector. Lane 1, Molecular marker 1 kb Ladder. Panel A: Inoculation with PHYVV; Panel B: lane 6 positive control of PHYVV and lane 7 positive control of PepGMV; Panel C: inoculation with PepGMV; Panel D: inoculated plants with PHYVV plus PepGMV; Panel E: treatment including inoculated plants as following: 1 plant with PHYVV, 1 plant with PHYVV plus PepGMV and 1 plants with PepGMV; Panel F: treatment with two inoculated plants: 1 with PepGMV and other with PHYVV. Lane 24: negative control. Size of DNA amplified is PHYVV: 350 pb and PepGMV 288 pb

The goal of mixed infection assays was to determine if one whitefly was able to simultaneously ingest, acquire and transmit to PHYVV and PepGMV. The results suggest that simultaneous transmission was possible (Table 4, treatments 3 and 5; Fig. 4, panel D and F). In all cases, simultaneous infection by both geminiviruses was detected in the plants and vectors. In the case of treatments 4 and 5, it was observed that in the half of the vectors the presence of PepGMV was detected; however, it was not transmitted to any plant. In treatment 3, the same plant contained both viruses and both viruses were ingested, acquired and then transmitted in similar proportions. Whereas, in treatment 4 there was only one plant with both viruses and it was not able to infect any plants. Additionally, the virus was acquired by 50% of the vectors. In treatment 5, the proportion of insects was reduced even more than was detected in PepGMV. In this latter treatment there were no plants containing both geminiviruses.

DISCUSSION

The fact that no viruses were detected in the diverse host plants used from the first generation suggests that there was no transovarial transference of these geminiviruses. We found a single virulent whitefly was capable of causing the infection in the PHYVV-*C. annuum* c.v. Sonora Anaheim interaction. We cannot generalize this latter assertion because PHYVV differs from other geminiviruses in mechanic transmissibility (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) and perhaps it has developed an improved transmission mechanism mediated by the vector. The efficiency of geminivirus transmission has been previously illustrated in the whitefly-tomato-*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) interaction (Cubillo *et al.*, 1999). This data can be important for the management of the diseases that PHYVV causes in pepper crops. Previously, it had been reported that in tomato 0.3 geminivirus-infested whiteflies was sufficient to cause infection (Cubillo *et al.*, 1999). Present results suggested that a single vector is enough to cause the infection.

We observed that disease severity increased when the AAP was longer. This may be explained by longer acquisition times by the vector. A greater level of disease severity was observed here than previously reported (Anaya-López *et al.*, 2003). The fact that these viruses cannot be transmitted immediately supports the observation that PHYVV and PepGMV are persistent as other geminiviruses (Cohen *et al.*, 1983; Harrison, 1985). They are incorporated into the circulatory system of the insect where, perhaps, the virus undergoes some form of processing before it can be transmitted to the host plant.

The AAP treatments evaluated here contained either just one or both types of viruses in the source host plant with similar results observed for PHYVV and PepGMV. Nevertheless, when two host plants were used in the treatment, each one with only one virus reduced the efficiency of acquisition and transmission of PepGMV. It appears that preference in acquisition and transmission is given to PHYVV in pepper plants. Perhaps this is due to a greater affinity between PHYVV and pepper than PepGMV and the same host plant. Several reports indicated that in pepper, PHYVV was able to complement the functions of B component in PepGMV, but not vice versa (Torres-Pacheco, 1997; Mendez-Lozano *et al.*, 2003). Since the B component of the geminiviruses contributes to functions related to movement (Lazarowitz, 1992; Von Arnim and Stanley, 1992), it is conceivable that this component permits the greater ability of movement of PHYVV inside pepper plants than in the case of PepGMV. In fact, the vector injects the geminiviruses within the phloem when feeding (Cohen *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000). Thus, it is likely that a greater capacity of movement of PHYVV can also be observed in phloem tissue. According to our results, there is most likely a greater availability of factors that could interact with the movement of PHYVV in the different parts of the pepper plant. Thus, it could be explained, not only that it can be transmitted easier, but also that PHYVV could be acquired easier than PepGMV by the vector in pepper plants. In this manner, the mixed infection of PHYVV and PepGMV improves the acquisition and transmission of PepGMV and consequently, the dispersal of this virus in pepper crops and nature. Additionally, the coat protein of geminiviruses must play an important role in the transmission of both PHYVV and PepGMV as reported in other geminiviruses (Brown *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1983). This study is an initial effort to understand the biology in the mixed transmission of geminiviruses by whiteflies in nature.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledges to FOMIX-GTO (GTO-2003-CO2-1154, agreement 03-24-A-022) for financial support to this research. Gabriela Medina-Ramos also acknowledges to CONACyT and DGEP-UNAM for fellowship support.

REFERENCES

- Anaya-López, J.L., I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, A. Garzón-Tiznado, J.L. Pons-Hernández, R.G. Guevara- González, C.I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, R.F. Rivera-Bustamante and S. Hernández-Verdugo, 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *HortScience*, 38 (2): 251-255.
- Ascencio-Ibañez, J.T., G.R. Argüello-Astorga, J. Méndez-Lozano and R.F. Rivera- Bustamante, 2002. First report of *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Dis.*, 86 (6): 692.
- Avila-Valdez, J. and I. Hinojosa-Reyes, 2000. Integrated management of whiteflies. Folleto Técnico Num. 16. INIFAP-Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Sur de Tamaulipas, pp: 4-10 and 16-27.
- Brown, J.K., O.P. Campodonico and M.R. Nelson, 1989. A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tiger disease. *Plant Dis.*, 73 (7): 610 (Abstract).

- Cohen, S., R. Duffus, R.C. Larsen, H.Y. Liu and R.A. Flock, 1983. Purification, serology and, vector relationships of *Squash leaf curl virus*, a whitefly-transmitted geminivirus. *Am. Phytopathol. Soc.*, 73 (12): 1669-1673.
- Cohen, S., 1990. Epidemiology of Whitefly-Transmitted Viruses. En *Whiteflies: Their Bionomics, Pest, Status and Management*, Gerling, D. (Ed.). Intercept Ltd., UK., pp: 211-225.
- Cohen, A.C., C.C. Chu, T.J. Henneberry, T. Freeman, D. Nelson, J. Buckner, D. Margosan, P. Vali and L.H. Aung, 1998. Feeding biology of the whitefly (Homoptera:Aleyrodidae). *Chin. J. Entomol.*, 18 (2): 65-82.
- Cubillo, D., G. Sanabria and L. Hilje, 1999. Efficiency of live protection in whiteflies management in tomato. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 51: 10-20.
- Dellaporta, S. L., J. Woods and J.B. Hicks, 1983. A plant minipreparation, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1 (4): 19-21.
- Freeman, T.P., J.S. Buckner and D.R. Nelson, 2000. Stylet length of whitefly adults and nymphs and the mechanism of stylet insertion in to the leaves on host plants. *Microsc. Microanal.*, 6 (2): 876-877.
- Garzón-Tiznado, J.A., R.F. Rivera-Bustamante, L. Herrera-Estrella, F. Delgadillo-Sánchez and O. Pozo-Campodonico, 1989. Initial Study on rizado amarillo del chile (*Capsicum annuum* L.) in Southern Tamaulipas (*Capsicum annuum* L.). A geminivirus. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Edo. de México.
- Garzón-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella and R. Rivera Bustamante, 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biobalistic procedure. *Phytopathology*, 83 (5): 514-521.
- Garzón-Tiznado, J.A., 1998. Whitefly-transmitted geminiviruses. In: *Advances in whitefly management*. Memoria Científica Num. 6. INIFAP- Centro de Investigación Regional del Noreste, pp: 93-112.
- Ghanim, M., S. Morin, M. Zeidan and H. Czosnek, 1997. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240 (2): 295-303.
- Godínez-Hernández, Y., J.L. Anaya-López, R. Díaz-Plaza, M. González-Chavira, R.F. Rivera-Bustamante, I. Torres-Pacheco and R.G. Guevara-González, 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience*, 36 (1): 139-142.
- Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settlage, B.M. Orozco, S. Nagar and D. Robertson, 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18 (1): 71-106.
- Harrison, B.D., 1985. Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23: 55-82.
- Hunter, W.B., E. Hierbert, E. Webb, J.H. Tsai and J.E. Polston, 1998. Location of Geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). *Plant Dis.*, 82 (10): 1147-1151.
- Lazarowitz, S.G., 1992. Geminiviruses: Genome and structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 11 (4): 327-349.
- Méndez-Lozano, J., I. Torres-Pacheco, C.M. Fauquet and R.F. Rivera-Bustamante, 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology*, 93 (3): 270-277.
- Montgomery, D.C., 1991. *Design and Analysis of Experiments*. DF. México. Grupo Editorial Iberoamérica, pp: 589.
- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell and D.P. Maxwell, 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.*, 77 (4): 340-347.

- Rosell, C.R., I. Torres-Jerez and J.K. Brown, 1999. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph and honeydew. *Phytopathology*, 89 (3): 239-246.
- Rosell, C.R., W.E. Davidson, K.J. Jancovich, L.D. Hendrix and J.K. Brown, 2003. Size limitations in the filter chamber and digestive tract of nymphal and adult *Bemisia tabaci* whiteflies (Hemiptera:Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96 (4): 544-552.
- Soto, M.J. and R.L. Gilbertson, 2003. Distribution and rate of movement of the curtovirus *Beet mild curly top virus* (Family *Geminiviridae*) in the beet leafhopper. *Phytopathology*, 93: 478-484.
- Torres-Pacheco, I., J.A. Garzón-Tiznado, J.K. Brow, A. Becerra-Flora and R.F. Rivera-Bustamante, 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, 86 (11): 1186-1192.
- Torres-Pacheco, I., 1997. Geminiviruses involved in rizado amarillo del chile: Interactions between PHV and TPV. Ph.D Thesis, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México.
- Vera Aguado, M.G., 2000. Detection of viruses in tomato (*Lycopersicon lycopersicum*), pepper (*Capsicum annuum*) and weeds in México. B.Sc. Thesis, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Von Arnim, A. and J. Stanley, 1992. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology*, 186 (1): 286-293.



PRODUCCIÓN DE CHILE

16



Consejo de
Ciencia y
Tecnología



NOTA EDITORIAL

LA PRODUCCIÓN DE CHILE EN GUANAJUATO

Irineo Torres Pacheco

INIFAP

La Producción de Chile en Guanajuato Nota Editorial



Irineo Torres Pacheco

Director del Centro Regional de

Investigación del Centro del INIFAP

La importancia de la investigación en el cultivo de chile para el estado de Guanajuato radica esencialmente en la necesidad de disparar el potencial biológico de la especie que hizo que en el pasado se cultivaran hasta 15 mil hectáreas en la entidad. Por otro lado, en términos de oportunidad, el estado cuenta con el enorme potencial de tener la cercanía con la ciudad más grande del mundo: México Distrito Federal. Ligado a lo anterior está un mercado cada vez más demandante en los Estados Unidos de América, ya que este cultivo es de las hortalizas que tiene la tasa de crecimiento más alta en la exportación anual hacia ese país.

A pesar de ese escenario, la superficie de cultivo de chile en Guanajuato ha ido reduciéndose en los últimos años a causa de problemas fitosanitarios, principalmente. Esa ha sido la razón que ha motivado a la comunidad de investigadores de la



entidad a orientar sus esfuerzos hacia la solución de dicha problemática.

En tres de los artículos que se presentan en este número se abordan los avances que se han tenido en lo concerniente a dos de los principales tipos de patógenos involucrados en los problemas de sanidad del cultivo en el estado: virus y hongos.

En Chile a los hongos *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* se les ha involucrado en la pudrición de la raíz, lo cual genera eventualmente amarillamiento y marchitez. Dicha situación trae consigo la muerte de la planta o baja de producción significativa. En este tema el Dr. Mario Martín González Chavira del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y sus colaboradores han generado información valiosa relativa a los patógenos y a la búsqueda de la resistencia. Además han abordado el tema desde el punto de vista molecular y agronómico.

En el caso de virus, si bien la planta acusa de manera más tenue el impacto, lo cierto es que las pérdidas por virus se han estimado en un promedio de 20%; sin embargo, el riesgo es de que puedan presentarse pérdidas hasta del 100%. En esta publicación el Dr. Ramón Gerardo Guevara González menciona el trabajo que él y sus colaboradores han realizado; primero en la búsqueda de fuentes de resistencia y luego en la detección e identificación de los genes involucrados. Por su parte el equipo que codirigen el Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Dr. Irineo Torres Pacheco del INIFAP han estado trabajando en la generación de información que permita manejar de manera más eficiente el vector que transmite los virus más importantes del cultivo en México.

Un tema relevante es el abordado por el Dr. Salvador Horacio Guzmán y sus colaboradores. En efecto, el conocimiento y manejo de los ingredientes funcionales en el Chile podrán mejorar en un futuro próximo tanto las posibilidades de dar valor agregado al cultivo de Chile, como también impactar benéficamente la salud de los consumidores, es decir a un sector importante de la sociedad de México.

Cabe destacar dos aspectos más: uno es la colaboración interinstitucional, misma que aflora en los grupos de autores y, el otro es el buscar que estos resultados lleguen de manera clara y convincente a los productores y a otros grupos de interés.

En este último tema vale destacar el decidido y generoso apoyo que el Gobierno del Estado de Guanajuato a través del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) ha dado para que los diferentes actores de la cadena productiva del Chile se integren en una organización de carácter civil con el objeto de hacer más competitivas las actividades vinculadas a este cultivo.

Tal organización, el Centro de Innovación Tecnológica para el Cultivo de Chile en Guanajuato A.C. seguramente habrá de convertirse en un eje importante para lograr la interacción de la comunidad científica y los usuarios de la información.



CONCYTEG

CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

PRODUCCIÓN DE CHILE

16



PRODUCCIÓN DE CHILE

BUSQUEDA DE GENOTIPOS RESISTENTES A PATOGENOS DE RAIZ CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.).

M.M. González-Chavira, et al

INIFAP e ITC

BUSQUEDA DE GENOTIPOS RESISTENTES A PATOGENOS DE RAIZ CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.).

M.M. González-Chavira, E. Villordo-Pineda, I. Torres-Pacheco, F. Delgadillo-Sánchez, R. Rodríguez-Guerra, S.H. Guzmán-Maldonado, J.L. Pons -Hernández.

Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío, Centro de Investigación Regional del Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km. 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato,

R.G. Guevara-González y L. Guevara- Olvera, Departamento de Ingeniería Bioquímica-Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico esquina García Cubas S/N, Celaya, Guanajuato.

INTRODUCCIÓN

Como ha sido señalado en otro artículo de esta misma publicación, el chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en México. Entre los problemas fitosanitarios causados por hongos en este cultivo el más importante es la enfermedad conocida como "marchitez del chile" la cual provoca una muerte prematura de la planta. La primera noticia de la enfermedad fue dada por Leonian (1922) en Nuevo México estableciendo como agente que la causaba al *Phytophthora capsici*. En México, fue reportada su presencia por primera vez en 1944 por el Servicio de Cuarentenas de los EEUU, al detectar el patógeno en chiles procedentes de México. Galindo en 1960, confirmó la presencia de esta enfermedad y señaló que es causada por el hongo denominado *Phytophthora capsici*. La presencia de este hongo se ha reportado en los estados productores de chile donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo, particularmente en Guanajuato, Aguascalientes, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (Redondo, 1974; García y col., 2000; Guigon y González, 2001). En condiciones favorables puede causar



pérdidas del 60 al 100% de la superficie cultivada; en los estados de Guanajuato, Aguascalientes y San Luis Potosí la superficie de siembra de chile se ha reducido en un 60% por causa de este problema (SAGARPA, 2004). Desde el descubrimiento de esta enfermedad los trabajos para controlarla se han enfocado a interferir al hongo y del tema, se han reportado numerosos trabajos a nivel mundial sobre control químico (Pérez y col., 1990; Parra and Ristaino, 1998), biológico y cultural (Hoitink y Fahy, 1986; Casarrubias y Frías 1992; Chávez *et al.*, 1995; Nemeč *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 1996; Yáñez, 1997). Por otro lado, desde 1966 se han desarrollando en México variedades resistentes a *P. capsici* (Heredia, 1966). En la década de los 80's resurgió fuertemente esta estrategia de control con el descubrimiento de 19 criollos resistentes a *P. capsici* originarios del estado de Morelos. Entre ellos sobresalía el "Criollo de Morelos-334" (CM-334) debido a que exhibía consistentemente un alto grado de resistencia al patógeno (Guerrero-Moreno and Laborde, 1980; Gil Ortega *et al.*, 1991). Estos materiales junto con algunos introducidos de otros países fueron ampliamente usados en México y en el mundo para generar variedades resistentes (Smith *et al.* 1967; Redondo, 1974; Bosland and Lindsey, 1991; Mercado y Bustamante 1993; Lefebvre and Palloix, 1995, 1996; Tamietti *et al.* 1998; Walke and Bosland. 1999; Thabuis, 2001). Desafortunadamente, no se ha alcanzado el éxito esperado y la enfermedad sigue causando grandes pérdidas en el país.

ACTUALIDAD

Considerando la problemática que representa esta enfermedad para los productores de chile de Guanajuato, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), conjuntamente con el Instituto Tecnológico de Celaya (ITC) y con el apoyo de los fondos mixtos CONACYT -Gobierno del estado de Guanajuato, se están buscando soluciones desde dos perspectivas:

Resistencia Genética

La resistencia genética es la mejor alternativa y con más posibilidades de adopción para el control de ésta enfermedad. En ese sentido se realizó un proyecto en el que se determinó que los causantes de esta enfermedad era un complejo de cuatro patógenos: *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Se obtuvo un banco de cepas de estos patógenos provenientes de 9 estados de la región norte-centro de México y se evaluó la patogenicidad y diversidad genética de los aislados. Con base a estos datos se seleccionaron un grupo de cepas para la evaluación masiva de la resistencia genética en 300 materiales criollos y silvestres.

Los resultados logrados muestran que existe una variación de la respuesta al ataque de los patógenos durante el desarrollo



de la planta. Esto sugiere, la existencia de diversos mecanismos de defensa contra cada uno de los hongos presentes en el síndrome. La variación en las respuestas de resistencia a *P. capsici* está ampliamente discutida en la literatura, por ejemplo se reporta una resistencia de tipo poligénica (Pochard y Daubeze, 1980) y respuestas de resistencia a tizón foliar y pudrición de raíz transmitidas por genes dominantes diferentes (Walker y Bosland, 1999). En el caso de *Fusarium sp.* y *R. solani* la situación es diferente, ya que no existen fuentes de resistencia reportadas en el Chile (Muhyi y Bosland, 1992; Rivelli 1989).

En lo que concierne a este trabajo, la presencia de *Fusarium* fue clara, ocasionando en plantas infectadas resistencia al ataque de *Phytophthora* en etapas tempranas. Los síntomas característicos causados por este patógeno en Chile como son enanismo y amarillamiento de hojas (Sanogo, 2003). En contraste la presencia *Rhizoctonia* no fue muy evidente; sin embargo, se siguió aislando en las plantas enfermas.

Por otro lado, se detectó resistencia a las tres especies de patógenos en las colectas BG 102 y BG 107 provenientes del banco de germoplasma del INIFAP (Figura 1). El comportamiento de estas colectas fue sobresaliente ya que en el caso de BG 102, 18 de 20 plantas no presentaron síntomas y en el caso de BG 107, 20 de 20 plantas no presentaron síntomas de la enfermedad. Estos materiales son criollos originarios del estado de Morelos y fueron previamente evaluadas bajo condiciones de invernadero para resistencia contra *P. capsici* por Redondo en 1975, encontrando altos niveles de resistencia (Redondo, 1979). Es importante resaltar esto, ya que después de 30 años siguen mostrando un alto nivel de resistencia no sólo contra *P. capsici* sino también a *R. solani* y *Fusarium sp.*, lo cual los ubica como materiales con gran potencial actualmente.

Dentro del trabajo referido (Redondo 1979), se evaluaron otros criollos, los cuales al igual que los anteriores mostraron un alto nivel de resistencia a *P. capsici*, pero a diferencia de los anteriores en la evaluación realizada en este trabajo resultaron muy susceptibles ya que murieron todas las plantas, esto puede ser debido a la diversidad de cepas usadas en nuestro trabajo.



Figura 1. Colectas de chile resistentes a la mezcla de tres especies de patógenos de raíz.

Además, en esta evaluación se desprende que no existe resistencia genética a esta enfermedad en los criollos sembrados en la región muestreada en este trabajo. Trabajos posteriores demostraron de igual manera que no existe resistencia a estos patógenos en los criollos y variedades sembradas en Guanajuato. Por lo que el cultivo de chile se encuentra en gran peligro de desaparecer, a menos que sean desarrolladas variedades con resistencia genética a esta enfermedad, a partir de las fuentes detectadas.

Por ello la siguiente etapa del trabajo se enfocó al desarrollo de un sistema experimental para reproducir la interacción del hongo y las plantas de chile que se da entre los materiales resistentes BG-102, BG-107 y el patógeno. Para esto, se establecieron los genotipos resistentes en presencia (condición problema) y ausencia (condición control) de *P. capsici*, teniendo como control susceptible plantas de la variedad Sonora Anaheim. En este modelo se llevó a cabo el análisis del transcriptoma en cada tipo de interacción.

De esta manera se buscó identificar y aislar genes involucrados en la interacción entre *Capsicum annuum* y *P. capsici*, se analizó la expresión genética diferencial, mediante hibridaciones sustractivas bajo condiciones de supresión (SSH).



Con el uso de este modelo se han obtenido 150 fragmentos los cuales se secuenciaron. Hasta el momento se han encontrando genes muy interesantes, entre los que destacan un receptor de etileno detectado primero en pera, el cual de acuerdo a sus características es probable que este involucrado en el reconocimiento de patógenos. Otro de igual importancia es una proteína de resistencia del tipo CC-NBS-LRR la cual está relacionada con la respuesta de resistencia de la planta y muy probablemente se encuentre al inicio de la cascada de respuestas. Otro es un gen que codifica para una *ubiquitina* la cual es una proteína pequeña de 72 aminoácidos cuya función principal es respuesta al estrés.

Manejo agronómico.

La segunda perspectiva es la obtención de un paquete tecnológico para el manejo de patógenos de raíz en Chile. Para esto el INIFAP en asociación con el Consejo Estatal de Productores de Chile de Guanajuato (CEPROCH), apoyados con recursos de fondos mixtos CONACYT-Estado de Guanajuato, se dieron a la tarea de compilar todas las tecnologías de manejo de la enfermedad, generadas por el propio INIFAP o por cualquier otro centro de investigación en el mundo. Con esto se planteó un proyecto en el que se probaron tecnologías directamente en campos de agricultores. Se establecieron dos lotes de prueba en las regiones productoras más importantes de Guanajuato, un lote se ubico en el municipio de Silao y otro en el norte del estado en el municipio de Dolores Hidalgo.

Este proyecto se encuentra en la etapa de análisis de resultados de su primer año de prueba pero los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores. Entre los componentes tecnológicos que mejor perspectiva tiene destacan los siguientes:

- a) la sensibilización y saneamiento del suelo con un producto químico como el metam sodio. Hemos denominado sensibilización al riego del suelo tres días antes de la aplicación del metam sodio. Destaca el hecho de que se tienen buenos resultados en sistema de riego por goteo y acolchado hasta de con 100Kg./Ha., de producto.
- b) el acolchado ha sido una práctica que ha servido para mantener los niveles de humedad, impedir el crecimiento de maleza y hacer que el efecto del saneamiento se mantenga más tiempo.
- c) el uso de inoculantes a base de micorriza y rizobacterias, se estima que independientemente de que hayan ayudado a las plantas a interactuar mejor con el sustrato también se les supone involucradas en el disparo de señales de defensa de la planta.
- d) la aplicación de productos químicos tales como metalaxil y fosetil en rotación racional.



El avance logrado hasta ahora alienta la expectativa de tener en corto plazo un paquete tecnológico de manejo de esta enfermedad que reduzca las pérdidas haciendo, nuevamente, al cultivo de chile una opción para los productores de Guanajuato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed A.S., C. Pérez- Sanchez, C. Egea y M.E. Candela. (1996). Evaluación de la inducción de resistencia de pimientos a *Phytophthora capsici* mediante el tratamiento con *Trichoderma harzianum*. *Physiologia Plantarum* 98, 737-742
- Bosland, P.W. and D.L. Lindsey. (1991). A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Disease*. 75:1048-1050.
- Casarrubias, U. y G. Frías. (1992). Evaluación de la eficacia de *Bacillus subtilis* para el control de la marchitez del chile en condiciones de invernadero. pp. 165. In: Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Chávez, J.J., E. Zabaleta y D. Teliz. (1995). Control integrado de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L) ocasionado por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valseguillo, Puebla, México. *Fitopatología* 30, 47-55.
- Galindo, A.J. (1960). Estudio preliminar sobre la marchitez de las plantas de chile en México y su agente causal *Phytophthora capsici* L. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 44 p.
- García R. S., C. Juárez, J.A Carrillo., R. Allende I. Marqués y M.D. Muy-Rangel. (2000). Marchitez Bacteriana en Chile Bell Causada por *Erwinia carotovora* subspp. *Carotovora*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18, 120-124.
- Gil Ortega, R., C.P. Espanol, and J.C. Zueco. (1991). Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breeding* 107, 50-55.
- Guerrero-Moreno, A. and J.A. Laborde. (1980). Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth Meeting of the Capsicum Working Group of Eucarpia. I.V.T., Wageningen, The Netherlands. p 52-56.
- Heredia Z.A. (1966). Herencia de la Resistencia del Chile (*Capsicum annuum* L.) al Ataque del Hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Profesional E.N.A., Chapingo, Mex. pp.. 40
- Hoitink, H.A.J. and P. Fahy. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Ann. Rev. Phytopathology* 24, 93-114.
- Lefebvre, V. and A. Palloix. (1996). Both epistatic and additive effects of QLTs are involved in polygenic induced resistance to disease. A case study, the interaction pepper – *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and applied genetics* . 93, 503-511.
- Leonian, L.H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12, 401-408.
- Mercado, J. and E. Bustamante. (1993). Evaluación de resistencia de cultivares criollos de chile dulce (*Capsicum annuum*) a *Phytophthora capsici*. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 27, 5-10.
- Muhyi, R., and P.W. Bosland. (1992). Evaluation of *Capsicum* germplasm for sources of resistance to *Rhizoctonia solani*. *HortScience* 30, 341 – 342.
- Nemec, S., L.E. Datnoff and J. Strandberg. (1996). Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15, 735-742.
- Parra, G. and J. Ristaino. (1998). Insensitivity to Ridomil Gold (mefenoxam) among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on bell peppers in North Carolina and New Jersey. *Plant Disease*. 82, 711.
- Pérez, M. L., J. G. Salinas, y J.O. Medina. (1990). Control genético y químico de la marchitez del chile *Capsicum annuum* causada por el hongo *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8, 71-76.
- Pochard E., and A.M. Duabeze. (1980). Recherche et evaluation des compasantes d'une resistance polygenique : la resistance du piment a *Phytophthora capsici*. *Ann. Amelior. Plantes*, 30, 377-398.
- Redondo, E. (1974). Estudio preeliminar en la obtención de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas



del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. Redondo, J.E.. (1979). Búsqueda de genotipos de chile resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leonina. *Proc. Tropical Region A.S.H.S.* 23, 220 – 224. Redondo J. E., R. Rodríguez, M. L. Ortega, A. Larqué y E. Mark Engleman. (1990). Mecanismo de infección y patología de las plantas de chile susceptibles y resistentes al hongo (*Phytophthora capsici* Leo). *Agrociencia* 77, 123-127. Rivelli, V. C. (1989). A wilt of pepper incited by *Fusarium oxysporum* f. spp. capsici f. spp. nov. M.S. Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge. SAGARPA. (2004). Statistical yearbook. Sanogo, S. (2003). Chile pepper and the threat of wilt diseases. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-0430-01-RV. <http://www.apsnet.org/online/feature/chile/> Smith, P.G., R.G. Grogan and A.H. Millet. (1967). Resistace of strains of California Wonder Pepper to Phytophthora root rot. *Plant Dis. Rept.* 35, 509. Tamietti G., G. Nervo and D. Valentino, (1998). Genetic improvement of pepper for the resistance to *Phytophthora capsici* Leon.: Status and perspectives. *Journal of Plant Pathology*, 80, 264 (Abstract) Thabuis A., V. Lefebvre, A.M. Daubèze, P. Signoret, T. Phaly, G. Nemouchi, A. Blattes, A. Palloix. (2001). Introgression of a partial resistance to *Phytophthora capsici* leon. Into a pepper elite line by marker assisted backcrosses. *Acta Hort. (ISHS)* 546, 645-650. Walke S. J. and P.W. Bosland. (1999). Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124, 14-18.



CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA NATURAL A GEMINIVIRUS EN CHILE HABANERO

Ramón Gerardo Guevara González e Irineo Torres Pacheco

Departamento de Ingeniería Bioquímica-Instituto Tecnológico de Celaya

CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA NATURAL A GEMINIVIRUS EN CHILE HABANERO

Ramón Gerardo Guevara González

Departamento de Ingeniería Bioquímica-Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico esquina García Cubas S/N, Celaya, Guanajuato.

Irineo Torres Pacheco

Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío, Centro de Investigación Regional del Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Tecnológica esquina García Cubas S/N, Celaya, Guanajuato.

El chile (*Capsicum spp*) es uno de los cultivos con mayor tradición en mesoamérica, ya que entre otras cosas, constituye un elemento básico dentro de la dieta de la población. México es el segundo productor de chile a nivel mundial (FAOSTAT 2002, Bancomext, 2002). Sin embargo, los rendimientos en México son bajos, debido en gran parte al ataque por agentes fitopatógenos. Por ello, este cultivo sufre pérdidas entre un 20 y 100% debidas principalmente a enfermedades de origen viral entre las cuales destacan las causadas por geminivirus (Anaya-López *et al.*, 2003; Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Actualmente en México, entre las enfermedades causadas por virus, dos geminivirus son considerados los principales patógenos en cultivos de chile: el Virus Huasteco del Chile (PHV) y el Virus del Mosaico Dorado del Chile (PepGMV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Los síntomas generalmente asociados al PHV son: distorsión foliar (patrones de mosaico, amarillamiento, enchinamiento y arrugamiento de las hojas), enanismo de las plantas y una fuerte disminución en la producción.

En estudios previos se demostró la existencia de resistencia a geminivirus en plantas criollas de chile habanero colectadas



en el estado de Yucatán (Godínez- Hernández *et al.*, 2001; Anaya- López *et al.*, 2001, 2002).

Con base en los antecedentes mencionados arriba, durante los últimos 6 años se han venido trabajando en el Instituto Tecnológico de Celaya y en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, varios proyectos financiados por CONCYTEG, Fondos Mixtos-Guanajuato y CONACYT, en los que hemos venido caracterizando a nivel molecular la resistencia mencionada a geminivirus.

Dentro de las acciones realizadas para la caracterización molecular de la resistencia, se han empleado herramientas moleculares para los análisis de expresión diferencial en las plantas de chile habanero resistentes a geminivirus en presencia o ausencia del patógeno. Las metodologías de despliegue diferencial de genes (Liang y Pardee, 1992), y la hibridación sustractiva por supresión (SSH, Diatchenko y Campbell, 1996), han permitido aislar aproximadamente 800 ESTs, de los cuales algunos de ellos se están estudiando a mayor detalle para su participación en el fenómeno de resistencia en cuestión. Un resumen de la homología con algunos genes reportados se muestra en la tabla 1, en donde se puede que varios ESTs muestran similitud con genes que en otros sistemas se han relacionado con fenómenos de resistencia en plantas a patógenos. Así, dentro de los ESTs que elegimos para seguir caracterizando su participación en el proceso de resistencia a geminivirus están aquellos como R100, el cual tiene una alta homología con genes que codifican para proteínas tipo germina, que son importantes en fenómenos de resistencia en plantas a patógenos.

Tabla 1. Relación de homología de algunos ESTs encontrados en estudios de expresión diferencial en plantas de chile habanero resistentes a geminivirus.

CLONA

GEN PROBABLE

FUNCIÓN

I*

%

P*

%

R 21

Gen hm2



Confiere resistencia a hongos en *Zea mays*.

64

76

R 22

Proteína AtCaMBP25

Regulador negativo de tolerancia a stress osmótico y participa en la ruta de transducción de señales en *Arabidopsis thaliana*.

40

54

R 31

Defensinas

Defensinas encontradas en *Arabidopsis thaliana*.

84

97

R 35

Proteína CaGLP1 (*Capsicum annuum* GLP1)

Se inducen durante la HR (respuesta de hipersensibilidad) contra el TMV (Virus del Mosaico del Tabaco) en *Capsicum annuum*.

68

75

R 50

Proteína ADP

Inducción de apoptosis: requerida para matar células infectadas con adenovirus.



25

45

R 52

Proteína ABP y proteína Nectarin I

Pertencientes a la familia germin proteínas (GLP): Actividad súper óido dismutasa y expresadas en la germinación (*Phaseolus vulgaris*) respectivamente.

49

61

R 55

Proteína NDR1

Confiere resistencia a enfermedades bacterianas en *Arabidopsis thaliana*, está involucrada en transducción de señales.

83

90

R 60

Proteína 2b

Codificada por el Virus del Mosaico del Pepino (CMV), se asocia al núcleo de la célula huésped y está involucrada en el silenciamiento de genes.

57

71

R 81

Proteína PARP-1

Polimerasa que se une a las cadenas rotas, en respuesta al daño del ADN.

44

55

R 100

Proteína tipo germina

Actividad de Superóxido dismutasa y respuesta a estrés en plantas a factores bióticos y abióticos

53

64

Dentro de los estudios sobre la participación de R100 en la resistencia a geminivirus en chile habanero, hemos encontrado que el gen completo correspondiente a este gen se expresa solamente en interacciones de tipo incompatible pero no en interacciones compatibles, lo que indica una fuerte relación con su posible papel en la resistencia a geminivirus en la planta en cuestión (Figura 1).



Figura 1. Análisis de expresión transcripcional del EST correspondiente a R100 en plantas de chile habanero resistente a geminivirus. Carril 1, planta sin geminivirus; carril 2, planta con geminivirus.

Otro dato interesante sobre la inducción específica de este gen, es que fue inducido por patógenos de chile como *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* y *Fusarium oxysporum*, mientras que no por *Phytophthora capsici*. Es importante recalcar, que la planta de chile habanero mostró interacciones de tipo incompatible con los 2 primeros patógenos, pero no con el tercero, reforzando el comentario mencionado arriba sobre el tipo de interacciones en las que el gen R100 fue inducido. Así, en base a reportes de otros investigadores, genes como el R100, es candidato a ser considerado como un nuevo gen relacionado con patogenicidad (PR) (Park et al. 2004).

Finalmente, se ha logrado un avance sustancial en el aislamiento del gen completo correspondiente a R100, con la finalidad de realizar estudios más precisos para determinar la importancia de este gen en el fenómeno de resistencia a geminivirus en las plantas de chile habanero en cuestión. Dentro de estos estudios estamos iniciando trabajos relacionados con expresión del gen en estrés abiótico y por aplicación exógena de reguladores de crecimiento vegetal, silenciamiento de este gen inducido por virus (VIGS) y expresión de la proteína en forma heteróloga para su caracterización bioquímica. Con estos resultados estamos a la luz de un inicio en la caracterización molecular de la resistencia a geminivirus y quizá a otros patógenos en las plantas de chile habanero que empleamos como modelo de estudio. Estos resultados seguramente deberán contribuir al diseño de nuevas estrategias integrales para proteger a los cultivos como el chile de enfermedades diversas y



posiblemente por afectaciones de tipo abiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anaya-López, J.L.; Pérez-Mora, E; Torres-Pacheco, I; Muñoz-Sánchez, C.I; Guevara-Olvera, L; González-Chavira, M.M; Ochoa-Alejo, N; Rivera-Bustamante, R.F, and Guevara-González, R.G. 2005. Inducible gene expresión by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 276-282
2. Anaya-López, J.L; Godínez-Hernández, Y; Muñoz Sánchez, C.I; Guevara-Olvera, L; Guevara-González, R.G; Rivera-Bustamante, R.F; González-Chavira, M.M and Torres-Pacheco, I. 2003^a. Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el virus huasteco del chile en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9: 225-234.
3. Anaya-López, J.L; González-Chavira, M; Pons-Hernández, J.L; Garzón-Tiznado, J.A; Torres-Pacheco, I; Rivera-Bustamante, R.F; Hernández-Verdugo, S; Guevara-González, R.G; Muñoz-Sánchez, C.I, and Guevara-Olvera, L. 2003^b. Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *Hortscience* 38: 251-255.
4. Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6025-6030.
5. Godínez-Hernández, Y; Anaya-López, J.L; Díaz-Plaza, R; González-Chavira, M; Torres-Pacheco, I; Rivera-Bustamante, R.F, and Guevara-González, R.G. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *Hortscience* 36: 139-142.
6. Liang P., and Pardee A.B., 1992. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the Polymerase chain

reaction. Science 257: 967-971

7. Park, C.J; An, J.M; Shin, Y.C; Kim, K.J; Lee, B.J. and Paek, K.H. 2004. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. Planta 219: 797-806.



CONCYTEG

CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

PRODUCCIÓN DE CHILE

16



FACTORES DE IMPORTANCIA EN LA TRANSMISIÓN BIOLÓGICA DE LOS GEMINIVIRUS VIRUS HUASTECO DE LA VENA AMARILLA DEL CHILE Y VIRUS DEL MOSAICO DORADO DEL CHILE

Gabriela Medina Ramos, et al

FES-Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México

Factores de Importancia en la transmisión biológica de los geminivirus Virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile y Virus del Mosaico Dorado del Chile

Gabriela Medina Ramos

FES-Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío,

Centro de Investigación Regional del Centro. INIFAP

Irineo Torres Pacheco

Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío,

Centro de Investigación Regional del Centro. INIFAP

Rodolfo De La Torre Almaráz

FES-Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México

Rafael Bujanos Muñiz

Laboratorio de Entomología, Campo Experimental Bajío.

Centro de Investigación Regional del Centro. INIFAP



Ramón G. Guevara González

Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya

INTRODUCCIÓN

En los últimos 5 años la superficie cultivada de chile en México ha aumentado de 60 000 a 107 500 hectáreas, cifra estimada al 20 de julio del presente año para el ciclo primavera-verano 2006 (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>). Dicha cifra confiere una idea de la importancia que ha adquirido este cultivo en nuestro país. Por otro lado se ha posicionado como la con mayor proyección de consumo y exportación.

México es el país con mayor variedad genética de *Capsicum* pero no es el principal productor mundial ya que ocupa el segundo lugar en producción mundial después de China. Esto se debe, entre otras causas a los bajos rendimientos registrados, los cuales promedian 17 ton/ha; mientras que España, por ejemplo, se tienen rendimientos medios de 41 ton/ha (FAO, 2004)

Estos bajos rendimientos son debidos, independientemente de la baja tecnificación del cultivo, al ataque de diversos patógenos, tales como: nemátodos (*Meloidogyne incognita*), hongos (*Phytophthora capsici*, *Leveillula taurina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Verticilium*), fitoplasmas y virus.

Entre los virus destacan los pertenecientes a familia *Geminiviridae*, los cuales constituyen uno de los principales problemas fitopatológicos en el cultivo del chile en los últimos años con pérdidas en la producción que van desde un 20 a un 100%.

En cultivos de chile en México, la primera enfermedad asociada a geminivirus fue el "rizado amarillo del chile" (Sur de Tamaulipas, 1986) en donde se encontraron involucrados en el síndrome a los Begomovirus virus huasteco de chile (Brown



et al., 1989; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) (PHV, ahora denominado virus huasteco de la vena amarilla del chile; PHYVV) y al virus texano de chile (TPV, ahora llamado virus mosaico dorado del chile; PepGMV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

La sintomatología que presentan las plantas de chile por el ataque de estos patógenos, como se muestra en la figura 1, es una distorsión foliar, rizado de las hojas, encurvamiento de las nervaduras, disminución en el crecimiento y por tanto fuerte disminución en la producción.



Figura 1. Planta de chile infectada con la mezcla de geminivirus PHYVV y PepGMV.

En México, ambos virus han sido detectados de manera recurrente en infección mixta o separada en diferentes regiones productoras en chile y otras solanáceas (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Vera Aguado; 2000). Estos geminivirus tienen como



insecto vector a la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Genn.

La problemática relacionada con mosquita blanca como vector de geminivirus ha cobrado importancia debido a factores como el transporte de material infestado con estos insectos, el cambio en las condiciones climáticas, la intensificación de las prácticas agrícolas, el uso indiscriminado de insecticidas y el desarrollo de resistencia en éstos (Cohen, 1990).

Las infecciones mixtas en Chile que involucran al PHYVV y al PepGMV son las primeras que se detectaron en la naturaleza involucrando geminivirus; posiblemente tengan relevancia en las epidemias. Se han tenido avances en la comprensión de la interacción entre estos geminivirus en la planta (Méndez-Lozano et al., 2003). Sin embargo, nada se sabe sobre el proceso en que se da en la infección conjunta involucrando al vector y la transmisión al hospedero (Hunter y col., 1998).

El efecto de factores en la interacción patógeno-vector-hospedero es una información importante en el proceso de integración de prácticas de manejo de las enfermedades y hacer más racional el cultivo. En el caso de las enfermedades que involucran a los geminivirus huasteco de la vena amarilla del Chile (PHYVV) y al virus del mosaico dorado del Chile (PepGMV), no hay información al respecto.

Los resultados de trabajo pueden orientar los esfuerzos de control relacionados con la interferencia del vector de esta enfermedad viral. Por lo que la contribución de con información de los efectos de factores como: número de vectores (mosquita blanca *Bemisia tabaci*) por planta, tiempo de adquisición-alimentación, tiempo de transmisión-alimentación, temperatura de adquisición-transmisión y la capacidad del vector de adquirir y transmitir la mezcla de PHYVV y PepGMV son relevantes.

METODOLOGÍA

Obtención de plantas fuentes de PHV Y PepGMV. Para los estudios de adquisición y transmisión se inocularon de plantas de Chile *Capsicum annuum* variedad Sonora Anaheim por medio de biobalística usando una concentración de 2.5 µg de cada componente Viral (PHYVV componente A, PHYVV componente B, PepGMV componente A y PepGMV componente B). Las plantas después de ser inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero y fueron utilizadas en pruebas de transmisión a los 15 días posteriores a la fecha de inoculación.



Ensayos de carga viral. Para determinar la cantidad de mosquitas blancas necesarias para infectar una planta de chile se consideró como factor el número de mosquitas blancas virulentas portadoras de PHYVV por planta y se establecieron 2 niveles (1 y 2, vectores por planta).

Ensayos de adquisición. Para estudiar el efecto factor tiempo de adquisición del virus por el vector se evaluaron 6 niveles (48, 24, 12, 6, 3 y 1 horas).

Ensayos de transmisión. En cuanto al factor tiempo de transmisión del virus por el vector se consideraron los siguientes niveles (48, 36 y 24, horas).

Ensayos de adquisición y transmisión mixta. El factor evaluado consistió en diferentes características de la fuente de inóculo; se consideraron las 3 características siguientes: a) planta solo con PHYVV, b) planta solo con PepGMV y c) planta con ambos virus.

Diseño experimental. Por cada tratamiento se establecieron 4 repeticiones de 5 plantas cada una y, excepto del ensayo en que se probó con una o dos vectores, el resto se realizó con una mosquita blanca por planta. El arreglo dentro de las cámaras de crecimiento fue completamente al azar.

Las mosquitas fueron puestas en contacto con las plantas fuente de virus o plantas de chile hospederas, de manera individual, durante los periodos de adquisición o transmisión dentro de una estructura consistente de un recipiente redondo de plástico. Posterior al periodo de transmisión se retiraron las mosquitas de las plantas. Estas últimas fueron trasladadas a la cámara de crecimiento y mantenidas durante 5 días para permitir la incubación del virus. Las condiciones mantenidas durante el desarrollo de los experimentos fueron: temperatura 24°C y una humedad relativa de 70 %.

Medición de respuesta. La variable medida fue cualitativa; detección de presencia o ausencia de PHYVV y PepGMV en la planta y en el insecto por medio de la PCR. Para la detección de PHV se usaron los primer's 240 y 241 que amplifican una región de 350 pb. La detección de PepGMV se usaron los primer's JM23 y JM24 que amplifican una región de 288 pb. (Méndez Lozano *et al*, 2003).



La medición de severidad fue hecha con la escala reportada por Torres Pacheco (1997).

Extracción de ADN vegetal. Fue hecha con el método de sarcosina (modificada por De La Torre, 2003), usando 4 discos de hoja de 0.5 cm de diámetro por muestra.

Extracción de ADN de insecto. Después de ser retirados los insectos de las plantas fueron colectados y mantenidos a -70°C para su posterior extracción de ADN. Para esta se usó el Kit DNeasy Tissue (Qiagen). La extracción fue hecha de manera individual.

ESTADO ACTUAL

Ensayos de carga viral. Como previamente se había reportado que en jitomate bastaban dos mosquitas blancas virulentas para causar una infección en este trabajo se manejó esa referencia como un nivel y se contrastó con el uso de un solo vector. Los resultados sugieren que un solo vector es suficiente para causar la infección.

Ensayos de periodos de adquisición y transmisión.

Al igual que PHYVV, también PepGMV puede ser adquirido por la mosquita blanca hasta en un periodo de adquisición-alimentación de 1 hora. Lo anterior se infiere a partir de la presencia de los síntomas y del virus en la planta.

Interesantemente, también entre más tiempo se confiere para la adquisición, la severidad es de mayor magnitud. También es notorio que la severidad alcanza un valor mayor con PepGMV (severidad de 7) que cuando se inoculan las plantas con PHYVV.

Los resultados indican que se requieren como mínimo 48 horas para que tanto PHYVV como PepGMV puedan ser transmitidos después de la adquisición. Ya que con un tiempo de 12 o 24 horas de transmisión no se logra inocular las plantas de chile con estos virus, situación que se puede inferir por el hecho de la carencia de la sintomatología y de la falta de



detección del virus en la planta.

Ensayos de adquisición y transmisión mixta. El objetivo esencial de este ensayo fue determinar si un solo vector es capaz de adquirir y transmitir simultáneamente al PHV y PepGMV. Los resultados obtenidos sugieren que si es posible, la información es indicativa de que el vector es capaz de adquirir y transmitir de forma mixta estos geminivirus.

DISCUSIÓN

Aunque en el sistema PHYVV-Chile cv. Sonora Anaheim los resultados muestran que una sola mosquita blanca virulenta es capaz de realizar la infección, no se puede generalizar ya que el PHYVV difiere con otros geminivirus en que no es fácil su transmisión mecánica (Garzón-Tiznado et al., 1993) y quizá por eso se haya desarrollado una mayor eficiencia la transmisión mediada por el vector. De cualquier forma este dato puede ser relevante para el manejo de la virosis que ocasiona el PHYVV en Chile.

El hecho de que a periodos de adquisición más prolongados, tanto en PHYVV como en PepGMV, se observa una mayor severidad quizá se relacione con que la concentración del inoculo induzca un determinado nivel de severidad (López, 2003), y esto se va alcanzando en la medida que el vector tiene más tiempo para alimentarse y así adquirir una mayor cantidad de geminivirus. Es posible que bajo estas condiciones, un bajo nivel de severidad le de la posibilidad a la planta de alcanzar el estado fenológico de antesis y floración, y de esa manera planta se vea menos afectada (López, 2003).

Dado que este virus no se pudo transmitir de inmediato confirma que como otros geminivirus estos también son persistentes y se incorporan al sistema circulatorio del insecto en donde todo indica que es necesario que se lleve a cabo alguna forma de procesamiento para que se pueda realizar la transmisión al hospedero.

Curiosamente, en los procesos de adquisición y transmisión en los cuales la fuente de inóculo solo contenía uno de los virus, o bien cuando todas plantas fuente de inoculo contenían a los dos virus, se observó un comportamiento similar entre el PHYVV y el PepGMV. Existen reportes en los que se ha señalado que en Chile, el PHYVV es capaz de complementar las funciones que implican al componente B de PepGMV, pero no al revés (Torres 1997, Méndez-Lozano et al., 2003). Como el componente B de geminivirus aporta funciones relacionadas con el movimiento (Lazarowitz, 1992; von Arnim and Stanley, 1992), es posible que esto permita una mayor facilidad de movimiento al PHYVV en las plantas de Chile que al PepGMV. De aquí que nuestros resultados indican que la infección mixta de PHV y PepGMV estaría favoreciendo la adquisición y transmisión de este último y consecuentemente la dispersión de este virus en las plantas de Chile.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brown, J.K., Campodiónico, O.P. & Nelson, M. R. 1989.** A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tigre disease.(Abstract). *Plant Disease* 73, 610.

Cohen S. 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En "Whiteflies: their bionomics, pest, status and management". Pags. 211-225. Ed. Gerling, D. Intercept Ltd, U.K. **Garzón-Tiznado, J.A., I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella and R. Rivera Bustamante. 1993.** Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biobalistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521. **Hunter, W.B., Hierbert, E., Webb, E., Tsai, J. H. and Polston, J. E. 1998.** Location of Geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease*, 82: 1147-1151. **Lazarowitz, S. G. 1992.** Geminiviruses: genome and structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Science* 11: 327-349. **López-Anaya, J.L., I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, J.A. Garzón-Tiznado and J. L. Pons-Hernández. 2003.** Resistente to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience* 38 (2): 251-255. **Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. and Rivera-Bustamante, R.F. 2003.** Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huastec virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 20-277. 8. **Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brow, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamante, R. F. 1996.** Detection and Distribution of geminiviruses in Mexico and the southern Unites States. *Phytopatology* 86: 1186-1192.

9. **Torres-Pacheco, I. 1997.** Geminivirus involucrados en el "rizado amarillo" del chile: Interacciones entre PHV y TPV. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato.

10. **Vera Aguado, M. G. 2002.** Detección de virus en jitomate (*Lycopersicon lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*) y maleza, en los diferentes ambientes de cultivo en México. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya.

11. **Von Arnim, A. & Stanley, J. 1992.** Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* 186: 286-293.

www.siap.sagarpa.gob.mx www.faostat.org



PRESENCIA DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA SALUD EN DOS ESPECIES DE CHILE

Ma. Guadalupe Herrera Hernández, et al
INIFAP

PRESENCIA DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA SALUD EN DOS ESPECIES DE CHILE

Ma. Guadalupe Herrera Hernández

Irineo Torres Pacheco

Mario González Chavira

Alejandra Mora Avilés

Salvador Horacio Guzmán Maldonado (1)

Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío,

Centro de Investigación Regional del Centro. INIFAP

(1) Autor de correspondencia: Campo Experimental Bajío (CEBAJ-INIFAP).

Km 6 Carretera Celaya-San Miguel Allende. Apartado Postal 112,

Celaya, Guanajuato. C. P. 38010, México.

Teléfono (461) 611-5323 Ext. 128. Fax (461) 611-5431.

E-mail: guzman.horacio@inifap.gob.mx

INTRODUCCIÓN

El consumo de chile está ligado a la historia de América y en particular a la de México. Colón descubrió que en este continente no existía la pimienta pero encontró otras especies de plantas con propiedades interesantes, entre las que



destacaba el chile al que bautizó con el nombre de pimiento por su capacidad pungente (picor o pungencia). Los antiguos pobladores de América llevaron a cabo un proceso de domesticación que dio como resultado una gran variedad de tipos de chile (MacNeish 1964). Una vez que este cultivo llegó a España, su uso encontró una rápida difusión a nivel mundial que dio como resultado que el chile sea conocido actualmente.

Además de su importancia económica, el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas y minerales (Guzmán-Maldonado y col., 2002). También, se ha demostrado que contiene otros compuestos, conocidos como fitoquímicos. Un fitoquímico es aquel que tiene un efecto benéfico sobre la salud humana (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998). Dentro del grupo de fitoquímicos existe una gama muy amplia de compuestos químicos presentes en los alimentos. Los compuestos fenólicos, que reducen el riesgo de contraer cáncer, problemas cardiovasculares y otras enfermedades crónico degenerativas, son un buen ejemplo (Dillard y German, 2000). Otro grupo de fitoquímicos son los compuestos pungentes (que confieren picor) como los capsaicinoides. Estos han sido utilizados para el tratamiento del lumbago, neuralgias y desordenes reumáticos. Además, se ha sugerido que pueden actuar como protectores químicos al reducir la actividad cancerosa de ciertos cancerígenos (Surh, S. 1995; Chanda y col., 2004).

Por lo anterior, es importante generar variedades que sean buena fuente de nutrientes y fitoquímicos y que presenten características que favorezcan su consumo. Al respecto, se sabe que cierto tipo de chile presenta sustancias que provocan irritación al tracto digestivo (Pozo-Campodónico, comunicación personal). A pesar de que los compuestos irritantes del chile no han sido identificados, se cree que los compuestos capsaicinoides, que confieren el picor, son responsables de la irritación (Paredes-López y col., 1999).

Los chiles jalapeño y habanero son ejemplo de chiles con y sin capacidad para irritar el sistema digestivo, respectivamente. El chile jalapeño, de fruto verde oscuro y rojo, es considerado un chile muy picante que provoca una severa irritación al tracto digestivo. Por otro lado, el chile habanero, de color amarillo, rojo y anaranjado, se le considera extremadamente picante pero no provoca irritación (Laborde y Pozo, 1982; Pozo-Camponodico, comunicación personal). Es importante, por lo tanto, caracterizar bioquímicamente todos tipo de chile para conocer las diferencias entre ellos y en su momento, identificar estas sustancias con fines de mejoramiento. En este sentido, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIFAP) ha involucrado desde hace muchos años al programa de chile en actividades de recolecta y conservación del chile. Además, ha mantenido acciones para generar nuevas variedades con mayor rendimiento o resistentes a enfermedades. Aunado a lo anterior, en años recientes también se ha indicado que se lleven actividades para caracterizar bioquímicamente los diferentes tipos de chile. Esta información será de vital importancia para generar nuevas variedades con características atractivas al consumidor.

El presente escrito se reporta la caracterización parcial de compuestos fenólicos y los responsables del picor (capsaicinoides) del chile jalapeño y habanero. El propósito fue únicamente detectar que compuestos están presentes, no su concentración; sin embargo, se están realizando acciones para seguir caracterizando y definiendo los niveles de concentración.



ACTUALIDAD

Se ha encontrado que el chile jalapeño de la especie *Capsicum annuum* y el chile habanero de especie *C. chinensis*, presentan diferencias en los compuestos fenólicos identificados. Por ejemplo, el ácido clorogénico y el ácido caféico se encuentran en el fruto de ambas especies. El ácido 4, hidroxí-3, metoxibenzoico se encuentra en el fruto y en la semilla de chile jalapeño pero no en el chile habanero (Cuadro 1). La presencia de estos compuestos en chile es importante para la salud. Por ejemplo, se ha reportado que el ácido caféico y su derivado, el ácido clorogénico, inhiben el crecimiento de células de cáncer de colon (Jayaprakasam y col., 2006), reduce el daño por oxidación en glóbulos rojos (Gokalp y col., 2006) e inhibe células de cáncer colorectal (He y col., 2006), entre otras acciones benéficas. Con respecto al ácido 4, hidroxí-3, metoxi benzoico se sabe que tiene un efecto positivo sobre el cáncer de próstata (Kumar , y col., 2003), es antioxidante (Iwahashi, 2000), evita la aglutinación de plaquetas en la sangre (Huh y col., 1998) y es un inhibidor potente de cancerígenos (Borchardt y col., 1982), entre otros efectos.

Cuadro 1. Compuestos fenólicos identificados en semilla y fruto de chile jalapeño y habanero

Jalapeño

Habanero

Compuesto fenólico

Semilla

Fruto

Semilla

Fruto

Ácido clorogénico

XXX



XXX

Ácido caféico

XXX

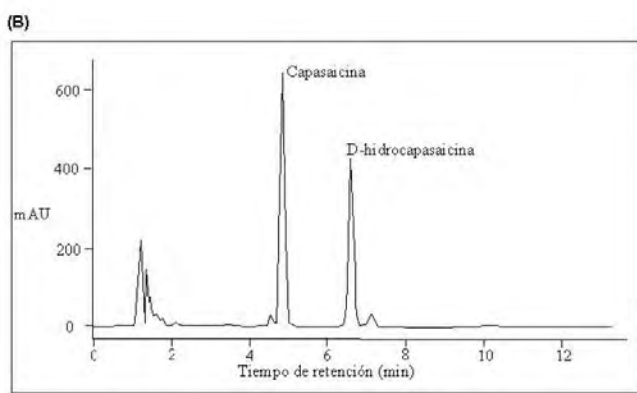
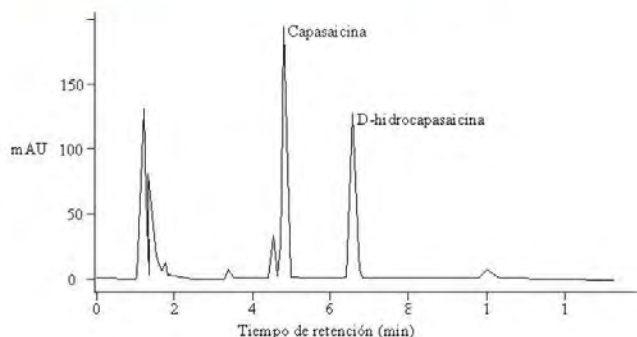
XXX

Ácido 4, hidroxí-3, metoxi benzoico

XXX

XXX

Con respecto a los compuestos que confieren el picor, la capsaicina y la D-hidrocapsaicina, se encuentran en la semilla del chile jalapeño y del chile habanero (Figura 1). Como puede verse en la Figura 1, el contenido de estos compuestos es mayor en la semilla del chile habanero que en el jalapeño. Este resultado concuerda con lo reportado por Kurian y Starks (2002) que indicó que la capsaicina y D-hidrocapsaicina es mucho mayor en chile habanero en comparación con la mayoría de los otros tipos de chiles consumidos.



• enzyme, and lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 54:5375-81

Figura 1. Detección de compuestos responsables de la pungencia en semilla de chile: (A) jalapeño y (B) habanero. (La concentración es dada en unidades de absorbancia (mAU) y es directamente proporcional a la concentración del compuesto en la muestra)

Es importante resaltar que la posible relación entre la capsaicina o la D-hidrocapsaicina con la capacidad irritante (Paredes-López y col., 1999) debe descartarse ya que este compuesto está presente tanto en chile jalapeño como en habanero. Debe recordarse como ya se indicó que el chile habanero no irrita el sistema digestivo.

Estos resultados abren una enorme posibilidad en la perspectiva de de conferir valor agregado a las cosechas de chile y ese ha de ser uno de los caminos que habrán de transitarse próximamente lo cual se dará seguramente en lo inmediato bajo los auspicios del Centro de Innovación Tecnológica para el Cultivo de Chile en Guanajuato A.C.



- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
1. Borchardt, R. T., Huber, J. A. y Houston, M. (1982). Catechol O-methyltransferase. 10. 5-Substituted 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acids (isovanillic acids) and 5-substituted 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehydes (isovanillins) as potential inhibitors. *J Med Chem.* 25:258-63.
 2. Chanda, S. Erexson, G., Riach, C., Inés, D. Stevenson, F. Murli, H. y Bley, K. (2004). Genotoxicity studies with pure trans-capsaicin. *Mutat. Res.* 557:85-97.
 3. Dillard, C. J. y German, J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci. Food Agric.* 80:1744-1756.
 4. Gokalp, O., Uz, E., Cicek, E., Yilmaz, H. R., Ozer, M. K., Altunbas, A. y Ozcelik, N. (2006). Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem.* 290:55-59.
 5. Guzmán-Maldonado, S. H., Torres-Pacheco, I y González-Chavira, M. (2002). Genetic Variability and Processing effect on Nutraceutical Factors of Jalapeño Pepper. 16 th. International Pepper Conference. Pozo-Camponodico, O. Ed. Tampico, Tamaulipas, 10-12 Noviembre, 2002. Page 18.
 6. Guzmán-Maldonado, S. H. y Paredes-López, O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. En *Functional Foods- Biochemical & Processing Aspects.* Mazza, G. (ed.). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. p. 293-328.
 7. He, Y. J., Liu, B. H., Xiang, D. B., Qiao, Z. Y., Fu, T. y He, Y. H. (2006). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J Gastroenterol.* 12:4981-4985.
 8. Huh, H., Kim, H. K. y Lee, H. K. (1998). PAF antagonistic activity of 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid glucose ester from *Gentiana scabra*. *Arch. Pharm. Res.* 21:436-439.
 9. Iwahashi H. (2000). Some polyphenols inhibit the formation of pentyl radical and octanoic acid radical in the reaction mixture of linoleic acid hydroperoxide with ferrous ions. *Biochem J.* 2:265-73.
 10. Kumar, A. P., Garcia, G. E., Ghosh, R., Rajnarayanan, R. V., Alworth, W. L. y Slaga, T. J. (2003). 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid methyl ester: a curcumin derivative targets Akt/NF kappa B cell survival signaling pathway: potential for prostate cancer management. *Neoplasia.* 5:255-266.
 11. Kurian, A. L. y Starks, A. N. (2002). HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chile peppers. *J. Food Sci.* 67:956-962.
 12. Laborde, J. A. C. y Pozo, O. (1982). Presente y futuro del chile en México. Centro de Investigaciones Agrícolas de la Península de Yucatán. Campo Experimental de Unxmal, Mérida, Yucatán. *Desplegable Técnico.* Pag. 32-39.



13. McNeish, R. S. (1964). Ancient Mesoamerican Civilization. *Science* 143:531-537.
 14. Paredes-López, O, Guzmán-Maldonado, S. H., Reyes-Moreno, C., Ordorica-Falomir, C. y Delgado-Vargas, F. (1999). Alimentos Nutracéuticos. Realidad y Ficción. *Revista de la Universidad Autónoma de Sinaloa* 6:20-34.
 15. Surh, S. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism and chemopreventive potential. *Life Sci.* 56:1845-1855.
- Jayaprakasam, B., Vanisree, M., Zhang, Y., Dewitt, D. L. y Nair, M. G. (2006). Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 54:5375-



CREDITOS

CRÉDITOS

Coordinación Editorial

Dra. Adriana Martínez M.

Comité Editorial

Dr. Pedro Luis López de Alba

Dra. Ernestina Torres Reyes

Diseño y Actualización de la Gaceta

L.C.C. Erick Adrián Sevilla

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE UN GEMINIVIRUS ASOCIADO CON EL MOSAICO AMARILLO DEL ABUTILON (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) EN MÉXICO

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A GEMINIVIRUS ASSOCIATED WITH ABUTILON (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) YELLOW MOSAIC VIRUS IN MÉXICO

Rodolfo De la Torre-Almaráz¹, Adrián Romero-Rodríguez¹, Alejandro Cruz Monsalvo-Reyes¹, Gabriela Medina-Ramos², Irineo Torres-Pacheco² y Roberto Ruiz-Medrano³

¹FES-IZTACALA-UNAM. Unidad de Biotecnología y prototipos (UBIPRO). Avenida de los Barrios 1. 54090. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México (drodolfo@servidor.unam.mx).

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Agrícola Experimental Celaya. ³Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional. Avenida Politécnico Nacional. Número 2508.

RESUMEN

Se observaron plantas de abutilón (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) cultivadas en jardines públicos en el sur de la Ciudad de México, con una enfermedad de origen desconocido que induce síntomas de mosaico de color amarillo brillante, deformación y reducción de la lámina foliar, con pérdida severa de la coloración de las flores. Por la carencia de información sobre esta enfermedad en el abutilón y por el posible riesgo que representa para otras especies de plantas ornamentales en México, los objetivos fueron determinar la etiología y las características biológicas del patógeno asociado con el mosaico amarillo del abutilón. Se separó a un virus en plantas de abutilón con los síntomas descritos, que se transmitió experimentalmente por injerto, biobalística y por mosca blanca (*Bemisia tabaci* G.), pero no mecánicamente, a plantas indicadoras. La caracterización molecular demostró que éste virus era el *Abutilon mosaic virus* (AbMV), geminivirus perteneciente al género *Begomovirus* (Familia Geminiviridae). El análisis comparativo de las secuencias parciales de los componentes (Número de acceso AY311783) y B (Número de acceso AY311784) del AbMV de México con las disponibles en el Genbank, indicó una similitud de 92% con una variante del AbMV de Hawaii para el componente A y una similitud de 100% con el *Sida yellow vein virus* de Honduras para el componente B. El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos del gen de la proteína de la cápside permitió reconocer sólo dos mutaciones en el AbMV de México, de las cinco presentes en la variante de AbMV-Hawaii, relacionada con la no transmisión por mosca blanca de este geminivirus, lo que sugiere que el AbMV-México podría ser una variante del virus mosaico del abutilón no reportada previamente. Este parece ser el primer reporte de un geminivirus en abutilón en México.

Palabras clave: Plantas ornamentales, Malvaceae, virus ADN

Recibido: Marzo, 2005. Aprobado: Marzo, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 40: 335-347. 2006.

ABSTRACT

Abutilon (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvacea) plants cultivated in public gardens in southern México City were observed with a disease of unknown origin, which induces bright yellow mosaic, deformation and reduction of the leaf lamina, with severe loss of coloring in the flowers. Because of the lack of information of this disease on abutilon and the possible risk that may pose for other ornamentals, this study was conducted to determine the etiology and biological characteristics of the pathogen associated with abutilon yellow mosaic. A virus was separated in abutilon plants with the described symptoms and transmitted experimentally by grafting, biobalistics and white flies (*Bemisia Tabaci* G.), but not mechanically, to indicator plants. The molecular characterization showed that this virus was the *Abutilon mosaic virus* (AbMV), geminivirus belonging to the genus *Begomovirus* (Family Geminiviridae). The comparative analysis of the partial sequences of the components (Access number AY311783) and B (Access number AY311784) of Mexican AbMV with those available in the Genbank, indicated a 92% similarity to the Hawaiian AbMV for the A component, and a 100% similarity with the *Sida yellow vein virus* of Honduras for the B component. The comparative analysis of the amino acid sequence of the capsid protein gene allowed recognition of only two mutations in the Mexican AbMV, of the five occurring in the variants of AbMV-Hawaii, related to non-transmission of this geminivirus by white fly, suggesting that AbMV-México could be a variant of the *Abutilon mosaic virus* not previously reported. This is apparently the first report of a geminivirus in abutilon in México.

Key words: Ornamental plants, Malvaceae, virus DNA.

INTRODUCTION

Abutilon (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvaceae) is an ornamental plant native to the tropical regions of Central and North

INTRODUCCIÓN

El Abutilón (*Abutilon x hybridum* Hort. Ex. Voss. Malvaceae) es una planta ornamental nativa de las regiones tropicales de Centro y Norteamérica, que se ha distribuido en todo el mundo y ha tenido un proceso de mejoramiento intenso para incrementar su valor estético, por lo que en la actualidad se encuentran disponibles una gran cantidad de variedades para siembra en maceta o en jardines (Moggi y Giugnolini, 1983; Albouy y Devergne, 2000).

En recorridos realizados durante 2004 en los jardines del campus de Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el sur de la Ciudad de México, se observaron en algunos sitios plantas de abutilón con un moteado y mosaico foliar de color amarillo intenso y la reducción de la talla de la planta, así como la pérdida del color rojo característico de las flores, adquiriendo éstas una tonalidad rosa pálido (Figura 1). Por el tipo de síntomas observados y algunos ensayos de diagnóstico en el laboratorio, se estableció que el agente causal de esta enfermedad era probablemente un geminivirus. El análisis de la información bibliográfica disponible indicó que no se ha descrito alguna enfermedad de origen viral en esta planta en México (Brunt, 1997), por lo que se plantearon como objetivos del presente trabajo determinar la identidad y las características biológicas del agente causal del mosaico amarillo del abutilón en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de muestras

Se localizaron cuatro sitios dentro de los jardines de la Ciudad Universitaria de la UNAM, Ciudad de México, con colonias conformadas por cinco a diez plantas de abutilón de uno a dos metros de alto, de donde se recolectaron al azar 15 ramas de tres plantas por sitio, de 30 cm de largo por dos cm de grueso, con síntomas de mosaico, moteado, deformación y reducción del tamaño de hojas. También se recolectaron 10 ramas de dos plantas de abutilón por sitio, de las mismas dimensiones, pero sin síntomas de mosaico amarillo. De todas las ramas se seleccionaron al azar y pesaron 20 g de hojas de plantas con y sin síntomas, que se almacenaron en bolsas de plástico a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se utilizaron para los análisis fitopatológicos.

El extremo basal cortado de 10 ramas de plantas con síntomas y 10 sin síntomas, de 15 a 20 cm de alto, fue cubierto con un enraizador comercial Radix 1500 (Acido Indol Acético, AIA) y se sembraron en macetas de plástico con suelo húmedo y estéril, cubriéndolas con bolsas de plástico durante 40 d, aproximadamente hasta la formación de raíces. Las plantas desarrolladas se mantuvieron en el invernadero como fuente de inóculo de posibles virus, para observar el desarrollo de síntomas en condiciones de invernadero y para determinar posibles



Figura 1. Síntomas de mosaico en hojas de Abutilón (*Abutilon x hybridum*).

Figure 1. Mosaic symptoms in Abutilon leaves (*Abutilon x hybridum*).

America, which has been distributed worldwide and has undergone an intense process of breeding to increment its aesthetic value. Currently, many varieties are available for pot planting or gardens (Moggi and Giugnolini, 1983; Albouy and Devergne, 2000).

In 2004, in the gardens of the Ciudad Universitaria campus, National Autonomous University of México (UNAM) in the southern part of México City, abutilon was observed with intense yellow leaf mottle and mosaic and reduced height, as well as loss of the characteristic red color of the flowers, which had turned pale pink (Figure 1). By the type of symptoms observed and some diagnostic laboratory tests, it was established that the causal agent of this disease was probably a geminivirus. The analysis of available bibliographic information indicated that no disease of viral origin has been described in this plant in México (Brunt, 1997). Thus, the objective of this study was to determine the identity and biological characteristics of the causal agent of Abutilon yellow mosaic in México.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples

Four sites were located in the gardens of Ciudad Universitaria, UNAM, México City, with colonies composed of five to ten abutilon plants one to two meters high. Fifteen branches 30 cm long and two cm thick with mosaic and mottle symptoms and small deformed leaves were collected at random from three plants per site. Also, ten branches of the same dimensions, but without yellow mosaic symptoms, were collected from two abutilon plants per site. From

infecciones virales en el material sin síntomas (Moggi y Giugnolini, 1983).

No fue posible producir plantas de abutilón por semilla en condiciones de invernadero para los ensayos de transmisión mecánica, injerto, biobalística y por mosca blanca, ya que esta planta no produce semilla viable y su propagación comercial es a través de esquejes, por lo que se adquirieron cinco plantas de abutilón de 20 a 30 cm de alto, sin síntomas virales aparentes, adquiridas en viveros comerciales de Xochimilco, D. F., seleccionando dos ramas de 15 cm de alto de estas plantas para enraizarlos en condiciones de invernadero, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

Pruebas de transmisión y separación de virus

Transmisión mecánica

Se maceraron hojas frescas de las muestras colectadas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo en solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M pH 7.0 (1g/10 mL). El macerado de cada muestra se utilizó en forma independiente para frotar, con un hisopo de algodón, hojas de plántulas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) var. Rendidora, tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) var. Rio Grande, chile (*Capsicum annum* L.) var. Ancho, tabaco (*Nicotiana benthamiana* Domin., *N. tabacum* L., *N. rustica* L.) y toloache (*Datura stramonium* L.). Se utilizaron seis plantas por especie y el ensayo se repitió tres veces. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (25-30 °C/12 h luz) hasta la posible aparición de síntomas (May, 1985; Walkey, 1991).

Transmisión por injerto

Se injertaron cinco plantas de abutilón de 20 a 30 cm de alto, obtenidas en el invernadero por enraizamiento de ramas y sin síntomas virales aparentes, con púas procedentes de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo.

Por la dificultad de obtener plántulas de abutilón con semilla, se injertaron 10 plantas de 15 a 20 cm de alto de Okra (*Abelmoschus esculentum* L.), producidas en el invernadero por semilla, para obtener la transmisión de virus del abutilón en otra especie perteneciente a la misma familia (Malvaceae). Plantas de tomate, chile y toloache con cinco a seis hojas verdaderas y 20 cm de altura (cinco plantas por especie, todas producidas por semilla en invernadero), se injertaron lateralmente con púas procedentes de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo. El injerto se fijó al portainjerto con cinta parafilm, las plantas se cubrieron con bolsas de plástico por 10 d y se mantuvieron en condiciones de invernadero (25-30 °C/12 h luz) hasta la aparición de síntomas (Walkey, 1991; Dijkstra y De Jager, 1998).

Transmisión por biobalística

Se inocularon plántulas de chile (*C. annum* L. var Anaheim) por biobalística, utilizando micropartículas de tungsteno (50 µL), impregnadas con ADN viral (100 µg L⁻¹) procedente de plantas de

all the branches, 20 g of leaves were randomly selected, both from plants with and without symptoms, weighed and stored in plastic bags at -70 °C, and used for phytopathological analyses.

The base ends of 10 branches cut from plants with symptoms and 10 from plant without symptoms, 15 to 20 cm tall, were covered with a commercial rooting product Radix 1500 (Acetic Indol Acid, AIA) and planted in plastic pots with moist, sterile soil, covering them with plastic bags for approximately 40 d until roots formed. The developed plants were kept in a greenhouse as source of inoculum of possible viruses, to observe development of the symptoms under greenhouse conditions, and to determine possible viral infections in material without symptoms (Moggi and Giugnolini, 1983).

It was not possible to produce abutilon plants from seed in the greenhouse for the mechanical transmission, grafting, biobalistic and white fly assays since this plant does not produce viable seed and is propagated commercially by cuttings. For this reason, five abutilon plants 20 to 30 cm tall, without apparent viral symptoms, were acquired from commercial nurseries in Xochimilco, D.F. Two 15 cm branches from these plants were selected for rooting under greenhouse conditions, following the method described above.

Transmission tests and separation of virus

Mechanical transmission

Fresh leaves of the collected samples of abutilon with yellow mosaic symptoms were macerated in a buffer solution of phosphates 0.02 M pH 7.0 (1g/10 mL). The macerate of each sample was rubbed independently onto leaves of seedlings of husk tomato (*Physalis ixocarpa* B.) var Rendidora, tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) var. Rio Grande, pepper (*Capsicum annum* L.) var. Ancho, tobacco (*Nicotiana benthamiana* Domin., *N. tabacum* L., *N. rustica* L.) and datura (*Datura stramonium* L.). Six plants per species were used and the test was replicated three times. The plants were kept in a greenhouse (25-30 °C/12 h light) until the possible appearance of symptoms (May, 1985; Walkey, 1991).

Transmission by grafting

Five abutilon plants (20 to 30 cm tall), obtained in the greenhouse by rooted cuttings and without apparent viral symptoms, were grafted with thorns from abutilon plants with yellow mosaic symptoms.

Because of the difficulty of obtaining abutilon seedlings, ten 15 to 20 cm tall okra plants (*Abelmoschus esculentum* L.), produced from seed in a greenhouse were grafted to transmit the virus from abutilon to another species belonging to the same family (Malvaceae). Twenty cm tall tomato, pepper and datura plants with five to six true leaves (five plants per species, all produced by seed in a greenhouse), were grafted with thorns from abutilon plants exhibiting yellow mosaic symptoms. The graft was fixed to the rootstock with parafilm tape, the plants were covered with plastic bags for 10 d and kept under greenhouse conditions (25-30 °C /12 h light) until symptoms appeared (Walkely, 1991; Dijkstra and De Jager, 1998).

abutilón con síntomas de mosaico amarillo. Las partículas de tungsteno impregnadas de ADN viral fueron proyectadas hacia la parte superior de las plántulas con presión de Helio a 800 o 1200 psi usando un acelerador Du Pont (PDS-1000). Las plantas bombardeadas se mantuvieron 24 h en condiciones de laboratorio (25 °C/12 h luz) y después se transfirieron al invernadero hasta la aparición de síntomas (Garzón-Tiznado, *et al.*, 1993).

Transmisión con insectos vectores

Una población de mosca blanca (*Bemisia tabaci* G.), recolectada inicialmente en un cultivo de papa en el estado de Guanajuato, se incrementó en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) por varias generaciones en una jaula de vidrio (30×50×30 cm), a temperatura de laboratorio y luz blanca continua. Se verificó que las plantas y las moscas blancas estuvieran libres de virus mediante diversos ensayos de PCR e hibridación Southern (Lotrakul *et al.*, 1998).

Fueron transferidas 30 moscas blancas a una planta de abutilón con síntomas de moteado amarillo, para un periodo de alimentación-adquisición de 48 horas. Después de este periodo fueron transferidas las 30 moscas blancas a tres plántulas de chile var. Anaheim (10 moscas por plántula) de 10 cm de altura y con cuatro hojas verdaderas, y cubiertas inmediatamente con un vaso de plástico transparente de la misma altura que la planta. Las moscas fueron mantenidas en las plántulas para un periodo de alimentación-transmisión de 48 horas, después del cual las moscas fueron eliminadas manualmente. Las plántulas se transfirieron y mantuvieron en una cámara bioclimática por 15 días, a 25 °C y luz blanca 12 hrs Lux. Este experimento se realizó en una sola ocasión considerando resultados en donde se ha demostrado que con una sola mosca es suficiente para obtener una transmisión efectiva de ciertos virus (Lotrakul *et al.*, 1998).

Detección mediante ensayo serológico (ELISA)

Se analizaron hojas y flores de abutilón recolectadas en campo con síntomas de mosaico amarillo se analizaron con el ensayo serológico ligado a enzimas en doble sándwich (DAS-ELISA) en dos días, para la detección de geminivirus. Las plantas utilizadas en la separación de virus en invernadero que manifestaron alguna clase de síntoma de probable origen viral también fueron analizadas por ELISA. Se utilizaron diferentes antiseros policlonales para la detección de diversos virus. Los antiseros y conjugados enzimáticos AP, así como los testigos positivos y el procedimiento de uso fueron adquiridos en Agdia Co (USA). Las posibles reacciones antígeno-anticuerpo se registraron visualmente. La reacción fue considerada positiva cuando se presentó un color amarillo en los pozos de la placa (Clark y Adams, 1977).

Caracterización molecular

Amplificación de ADN viral por PCR

Se realizó la prueba de la PCR para detectar la presencia de geminivirus con el ADN total extraído, según el método propuesto

Transmission by biobalistics

Pepper seedlings (*C. annuum* L. var Anaheim) were inoculated by biobalistics, using tungsten microparticles (50 µL) impregnated with viral DNA (100 µg L⁻¹) from abutilon plants with yellow mosaic symptoms. The impregnated tungsten particles were projected toward the upper part of the seedlings with helium pressure at 800 or 1200 psi using a Du Pont accelerator (PDS-1000). The bombarded plants were kept for 24 h under laboratory conditions (25 °C/12 h light) and later transferred to the greenhouse until symptoms appeared (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993).

Transmission with insect vectors

A population of white flies (*Bemisia tabaci* G.), collected initially in a potato field in the state of Guanajuato, was increased on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants for several generations in a glass cage (30×50×30 cm) at laboratory temperature and continuous white light. Several PCR tests and Southern hybridization were used to verify that the plants and white flies were free of virus (Lotrakul *et al.*, 1998).

Thirty white flies were transferred to an abutilon plant with yellow mosaic symptoms for a period of 48 h of feeding-acquisition. After this period, the 30 white flies (10 flies per seedling) were transferred to three pepper seedlings, var. Anaheim, 10 cm tall with four true leaves, and covered immediately with a transparent plastic cup of the same height as the seedling. The flies were kept on the seedlings for a feeding-transmission period of 48 h, after which the flies were eliminated manually. The seedlings were transferred to and kept in a bioclimatic chamber for 15 days at 25 °C and 12 h Lux white light. This experiment was conducted once, considering that it has been demonstrated that a single fly is sufficient to obtain effective transmission of certain viruses (Lotrakul *et al.*, 1998).

Detection with serological assay (ELISA)

Abutilon leaves and flowers with yellow mosaic symptoms collected in the field were analyzed with the double sandwich enzyme-linked serological assay (DAS-ELISA) on two days to detect geminivirus. The plants used in the separation of virus in the greenhouse which exhibited some type of symptom of likely viral origin were also analyzed by ELISA. Different polyclonal antisera were used to detect several viruses. The antisera and AP enzymatic conjugates, as well as the positive controls and the use procedure, were acquired from Agdia Co (USA). The possible antigen-antibody reactions were recorded visually. The reaction was considered positive when yellow was exhibited in the plate wells (Clark and Adams, 1977).

Molecular characterization

Amplification of viral DNA by PCR

The PCR test was conducted with total DNA extracted from the samples of abutilon with yellow mosaic symptoms, as well as from

por Dellaporta *et al.* (1983), de las muestras de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, así como en las plantas inoculadas por transmisión mecánica, injerto, biobalística y por mosca blanca. Los testigos negativos utilizados en todos los ensayos de caracterización molecular fueron el ADN extraído de plantas sanas de chile, tomate o toloache cultivadas en el invernadero y el testigo positivo fue el ADN de plantas de okra infectadas con un geminivirus previamente identificado en México (De La Torre *et al.*, 2004).

La amplificación del ADN viral por PCR se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos PALv 1978 y PARc496 que amplifican un fragmento de 1.1 kb correspondiente a una parte de la proteína Rep AC1, toda la región común e intergenética y parte de la proteína de la cápside (AVI) del componente A de geminivirus pertenecientes al género *Begomovirus*. También se usaron los oligonucleótidos PBLv 2040 y PCRC 1, que amplifican un fragmento de 0.600 Kb localizado en una parte del gen de la proteína del movimiento (BLI) y hasta el inicio de la región común contenido en el componente B (Rojas *et al.*, 1993).

La mezcla final de reacción de la PCR (50 μ L volumen total) consistió en 2.5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 5 μ L de solución amortiguadora de reacción 10x, 1 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 μ L de cada oligonucleótido (10 mM), 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Amplitaq DNA polimerasa, Invitrogen), y 1 μ L de DNA (100 ng) de las muestras de abutilón. La mezcla de reacción fue incubada en un termociclador GeneAmp PCR System 2400, iniciando con una preincubación a 95 °C por 3 minutos y consumiendo 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 1 min, 55 °C por 1.5 min y 2 min a 72 °C; además de un tiempo de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron analizados directamente por electroforesis en geles de agarosa al 1.0%, a 80 Volts /1 h (Rojas *et al.* 1993; Mehta *et al.*, 1994; Surzycki, 1999).

Ensayo de hibridación del tipo Southern

Se realizaron ensayos de hibridación del tipo Southern para verificar infecciones por posibles geminivirus en el material vegetativo utilizado, confirmar el origen viral de los productos en los ensayos de la PCR y precisar el tamaño molecular del virus involucrado en los síntomas de mosaico y moteado amarillo del Abutilon (Sambrook *et al.*, 1989; Surzycki 1999).

Como sonda se utilizó el gen clonado de la cápside (CP) del virus mosaico dorado del chile (*Pepper Golden Mosaic Virus*, Familia Geminiviridae, Género *Begomoviridae*), marcada radiactivamente por amplificación por PCR usando (Alfa-³²P) dCTP. Las muestras de ADN se transfirieron por capilaridad, después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, directamente a membranas de Nylon Hybond (+) (Amersham). Posteriormente fueron prehibridadas e hibridadas a 65 °C, en condiciones de alta astringencia, usando en la sonda respectiva. Los filtros fueron expuestos con película Kodak X-Omat a 80 °C y a temperatura ambiente por 2 h (Surzycki, 1999; De La Torre *et al.*, 2004).

those inoculated by mechanical transmission, grafting, biobalistics and white flies, to detect the presence of geminivirus following the method proposed by Dellaporta *et al.* (1983). The negative controls used in all of the molecular characterization tests were DNA extracted from healthy pepper, tomato or datura plants cultivated in a greenhouse, while the positive check was the DNA from okra plants infected with a geminivirus previously identified in México (De la Torre *et al.*, 2004).

Amplification of viral DNA by PCR was conducted using the oligonucleotides PALv 1978 and PARc496, which amplify a fragment of 1.1 kb corresponding to a part of the Rep AC1 protein, all the common and intergenetic region and part of the capsid protein (AVI) of the A component of geminiviruses belonging to the genus *Begomovirus*. Also were used the oligonucleotides PBLv 2040 and PCRC 1, which amplify a fragment of 0.600 Kb located in a part of the protein movement gene (BLI) and up to the initial common region contained in component B (Rojas *et al.*, 1993).

The final reaction mixture of the PCR (50 μ L total volume) was composed of 2.5 μ g $MgCl_2$ (50 mM), 5 μ L buffer 10x reaction, 1 μ g/L dNTPs mixture (10 mM), 1 μ g/L of each oligonucleotide (10 mM), 2 units of *Taq* DNA polymerase (Amplitaq DNA polymerase, Invitrogen), and 1 μ L DNA (100 ng) of abutilon samples. The reaction mixture was incubated in a (GeneAmp PCR System 2400 thermocycler, initializing with preincubation at 95 °C for 3 min and consuming 35 cycles under the following conditions: 94 °C for 1 min, 55 °C for 1.5 min and 2 min at 72 °C; in addition to an extension time of 7 min at 72 °C. The amplified products were analyzed directly by electrophoresis in agarose gels at 1.0%, 80 Volts/1 h (Rojas *et al.*, 1003; Mehta *et al.*, 1994; Surzycki, 1999).

Southern-type hybridization test

Southern-type hybridization tests were conducted to verify whether infections in the plant material were from a geminivirus, to confirm the viral origin of the products of the PCR tests, and to determine the precise molecular size of the virus involved in yellow mosaic and mottle symptoms in Abutilon (Sambrook *et al.*, 1989; Surzycki, 1999).

As a probe, the cloned capsid gene (CP) of the pepper golden mosaic virus (Family Geminiviridae, Genus *Begomoviridae*) was used; this was marked radioactively by PCR amplification using (Alfa-³²P) dCTP. The DNA samples were transferred by capillarity after electrophoresis in agarose gel at 1%, directly to Nylon Hybond (+) (Amersham) membranes. Later, they were prehybridized and hybridized at 65 °C, under high astringency conditions using the respective probe. The filters were exposed with Kodak X-Omat film at 80 °C and at room temperature for 2 h (Surzycki, 1999; De la Torre *et al.*, 2004).

Cloning and sequencing

The products of PCR amplification corresponding to components A and B of the geminivirus separated from abutilon plants with

Clonación y secuenciación

Los productos de amplificación de la PCR correspondientes a los componentes A y B del geminivirus separado de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, se separaron de la matriz de agarosa a 1.0% utilizando el kit Wizar DNA easy (Promega, USA). Posteriormente, los productos fueron ligados a PCR II Topo e introducidos en *E. coli* cepa alfa-DH5 (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Sambrook *et al.*, 1989). Los insertos obtenidos de clonas sospechosas de estar transformadas se analizaron en un secuenciador automático (Applied Biosystem Genetic Analyzer 3100) de 16 capilares. Las secuencias nucleotídicas obtenidas de los insertos se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI, 2002). Para su alineamiento se utilizó el método Clustal W y para la construcción de dendrogramas se utilizó el programa MegAlign (Padidam *et al.*, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de transmisión y separación de virus

Transmisión mecánica

No se observaron síntomas de origen viral en las plantas indicadoras o de abutilón inoculadas por transmisión mecánica utilizando el macerado de hojas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, en ninguno de los experimentos realizados por este método. Aunque la mayoría de los virus que infectan plantas son transmisibles mecánicamente, hay especies que no lo son, ya sea por la alta especificidad hacia su hospedante o su vector, o por la baja concentración o inestabilidad de los viriones infectivos al momento de su extracción y transmisión. Es el caso de los Luteovirus, algunos Closterovirus y de la mayoría de los Geminivirus conocidos (Kurstak, 1981; Walkey, 1991). Por otro lado, los síntomas típicos de mosaico amarillo, acompañado del arrugamiento de hojas y la no transmisión mecánica, similares a los causados por geminivirus (Brown y Bird, 1992) indicaron que era probable que algún virus de este grupo pudiera estar involucrado en la enfermedad del abutilón, tal como se demostró en los ensayos de la PCR y de hibridación del tipo Southern (descritos más adelante).

Transmisión por injerto

El injerto de ramas con hojas de abutilón recolectadas en el campo causó deformación foliar leve en chile y tomate, pero en toloache se observaron síntomas de moteado y mosaico amarillo, con severa deformación y reducción de la lámina foliar (Figura 2). Los ensayos de la PCR confirmaron la presencia de infecciones por geminivirus en las plantas de chile, tomate y toloache,

yellow mosaic symptoms were separated from the 1% agarose matrix using the Wizar DNA easy kit (Promega, USA). Later, the products were linked to PCR II Topo and introduced into an *E. coli* strain, alfa-DH5 (Invitrogen), following the instructions of the manufacturer (Sambrook *et al.*, 1989). The inserts obtained from clones suspicious of being transformed were analyzed in an automatic sequencer (Applied Biosystem Genetic Analyzer 3100) with 16 capillaries. The nucleotide sequences obtained from the inserts were compared with available sequences in the GenBank database (NCBI, 2002). For alignment, the Clustal W method was used, and for dendrogram construction, the software Meg Align (Padidam *et al.*, 1995) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Transmission tests and virus separation

Mechanical transmission

No viral symptoms were observed in the indicator or abutilon plants inoculated by mechanical transmission, in any of the experiments conducted with macerate of leaves from abutilon with yellow mosaic symptoms. Although most viruses that infect plants are mechanically transmissible, there are species that are not, because they are highly specific in terms of host or vector, or because of the low concentration or instability of the infective virions when they are extracted and transmitted. This is the case of Luteoviruses, some Closteroviruses and most of the known Geminiviruses known (Kurstak, 1981; Walkey, 1991). Moreover, the typical yellow mosaic symptoms, accompanied by leaf wrinkle and mechanical non-transmission, similar to those caused by geminiviruses (Brown and Bird, 1992) indicate that it was likely that a virus of this group could be involved in the abutilon disease, as was demonstrated in the PCR and Southern-type hybridization tests (described below).

Transmission by grafting

Grafting of branches with abutilon leaves collected in the field caused slight leaf deformation in pepper and tomato, but in datura yellow mottle and mosaic symptoms were observed with severe leaf deformation and reduction of leaf lamina (Figure 2). The PCR tests confirmed infections caused by geminivirus in pepper, tomato and datura plants, but not in abutilon and okra plants, in which the grafts never fused with the rootstock.

Transmission by grafting virus from abutilon plants did not cause severe symptoms in pepper, tomato and datura plants, as could be expected for infections caused by grafted virus, which is very efficient for these pathogens (Walkey, 1991).

no así en las plantas de abutilón y de okra, donde los injertos nunca se fusionaron con el portainjerto.

La transmisión por injerto de virus de plantas de abutilón no causó síntomas severos en las plantas de chile, tomate y toloache, como podría esperarse para infecciones causadas por virus por injerto, que es muy eficiente para estos patógenos (Walkey, 1991).

Transmisión por biobalística

Las plantas de chile inoculadas por biobalística mostraron síntomas severos de mosaico y moteado amarillo en hojas, así como deformación de ramas y reducción del tamaño de la planta 30 d después de la inoculación (Figura 3). Se detectó la presencia de geminivirus por PCR y ensayos del tipo Southern en todas las plantas de chile, demostrando que la inoculación de geminivirus por biobalística es muy eficiente al romper las barreras de resistencia del hospedante al ataque de este tipo de virus (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993).

Transmisión por mosca blanca

La transmisión de virus por mosca blanca causó un leve moteado amarillento en algunas de las plántulas de chile var. Anaheim. El ensayo por PCR detectó la infección por geminivirus en la mayoría de las plantas utilizadas (Figura 8). Este virus no provocó síntomas severos por transmisión con mosca blanca en el hospedante donde se realizó el experimento. Es probable que alguna alteración en el genoma de este virus



Figura 2. Deformación, enrollamiento y amarillamiento foliar en toloache (*Datura stramonium*) injertado con ramas de Abutilón con síntomas de mosaico amarillo, en invernadero.

Figure 2. Leaf deformation, curl and yellowing in datura (*Datura stramonium*) grafted with abutilon branches with yellow mosaic symptoms, in a greenhouse.

Transmission by biobalistics

Pepper plants inoculated by biobalistics exhibited severe symptoms of yellow mottle and mosaic on leaves, as well as deformation of branches and reduction in size of the plant 30 d after inoculation (Figure 3). Geminivirus was detected by PCR and Southern-type tests in all of the pepper plants, demonstrating that inoculation of geminivirus by biobalistics is very efficient as it breaks the host's barriers of resistance to attack from this type of virus (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993).

Transmission by white fly

Transmission by white flies caused a slight yellowish mottle in some of the pepper var. Anaheim seedlings. The PCR assay, however, detected infection by geminivirus in most of the plants (Figure 8). This virus did not provoke severe symptoms by transmission by white flies in the host in which the experiment was conducted. It is likely that some alteration in the virus genome affects some unknown event in the process of transmission and replication with its insect vector, which also changes its virulence, as Wu *et al.* (1996) pointed out for an isolate of the Abutilon mosaic virus in Hawaii, which reduces virulence by mutations in the gene of the capsid protein.

Serological detection (DAS-ELISA)

Direct detection of different viruses using the DAS-ELISA technique in abutilon plants with yellow mosaic



Figura 3. A) Arrugamiento, mosaico y enanismo en plantas de chile inoculadas, por biobalística, con ADN procedente de hojas de Abutilón con síntomas de mosaico amarillo. B) Planta sana.

Figure 3. A) Wrinkling, mosaic and dwarfism in pepper plants inoculated, by biobalistics, with DNA from abutilon leaves with yellow mosaic symptoms. B) Healthy plant.

afecte algún evento desconocido en el proceso de transmisión y replicación con su insecto vector, que además cambie su virulencia, como lo señalaron Wu *et al.* (1996) para un aislamiento del *Abutilon mosaic virus* en Hawaii, que reduce su virulencia por mutaciones en el gen de la proteína de la cápside.

Detección serológica (DAS-ELISA)

La detección directa de diferentes virus, utilizando la técnica de DAS-ELISA en plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo fue negativa en todas las muestras analizadas, así como para las plantas de tomate, toloache y chile inoculadas por transmisión mecánica o por injerto de ramas de abutilón con mosaico amarillo. Otros resultados han mostrado que la presencia de sustancias mucilaginosas en especies de Malváceas impide la detección serológica de diversos virus, incluidos los geminivirus. En el caso de las plantas de chile, tomate y toloache infectadas experimentalmente con el geminivirus separado de abutilón, es posible que los anticuerpos no hubiesen sido suficientemente específicos para este tipo de virus (De la Torre *et al.*, 2004).

Caracterización molecular

Se amplificaron, en plantas de abutilón colectadas en el campo con síntomas de mosaico amarillo, bandas de aproximadamente 1100 pb., correspondientes al componente A (Figura 4, carril B) y de 650 pb del componente B (Figura 4, carril C), utilizando los oligonucleótidos específicos para geminivirus bipartitas (Rojas *et al.*, 1993).

También hubo productos del mismo tamaño para el componente A (Figura 5, carriles A a C) y para el B (Figura 6, carriles D a F) del ADN procedente de las plantas de chile, tomate y toloache que tuvieron síntomas de probable origen viral y que fueron injertadas previamente con esquejes de abutilón enfermos o inoculados por biobalística con ADN procedente de plantas abutilón con síntomas.

Los ensayos de hibridación del tipo Southern confirmaron la presencia de un geminivirus en plantas de abutilón con síntomas de moteado amarillo, así como en plantas de chile, tomate y toloache injertadas con ramas de abutilón enfermas. El ensayo de hibridación tipo Southern indicó que el tamaño del genoma del geminivirus que infecta al abutilón cultivado en México es de aproximadamente 2.6 Kb por componente (Figura 7, carril 3).

Clonación y secuenciación

Se obtuvieron varias colonias que contenían el plásmido con insertos, que se identificaron, por PCR y

symptoms was negative in all of the samples analyzed, as well as for tomato, datura and pepper plants inoculated by mechanical transmission or by grafting branches of abutilon with yellow mosaic. Other results have shown that the presence of mucilaginous substances in species of Malvaceae impedes serological detection of several viruses, including geminiviruses. In the case of pepper, tomato and datura plants infected experimentally with geminivirus separated from abutilon, it is possible that the antibodies would not had been sufficiently specific for this type of virus (De la Torre *et al.*, 2004).

Molecular characterization

In abutilon plants with yellow mosaic symptoms collected in the field, bands of approximately 1100 pb, corresponding to component A (Figure 4, track B) and 650 pb of component B (Figure 4, track C) were amplified using specific oligonucleotides for bipartite geminiviruses (Rojas *et al.*, 1993).

There were also products of the same size for component A (figure 5, tracks A to C) and for component B (Figure 6, tracks D to F) of DNA from pepper, tomato and datura plants that had symptoms of probable viral origin and that were grafted previously with cuttings of diseased plants or plants biobalistically

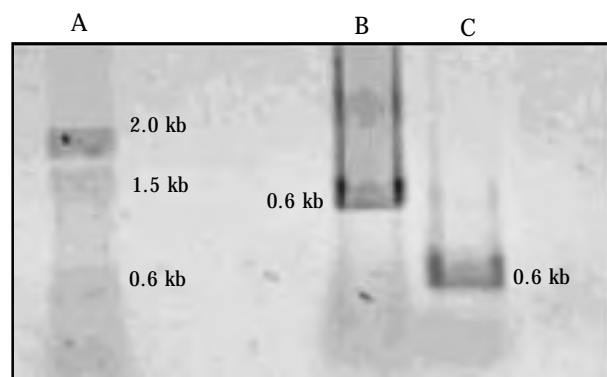


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1.0%/80 V/1 h. de productos de la PCR obtenidos del ADN total obtenido de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo: carril A) Marcador de peso molecular 1 Kb; carril B) Producto de la PCR de 1.1 Kb (oligonucleótidos PALv 1978 y PARc496 del componente A; carril C) Producto de la PCR de 0.6 Kb (oligonucleótidos PBLv 2040 y PCRc 1, del componente B).

Figure 4. Electrophoresis in agarose gel 1.0%/80 V/1 h of PCR products obtained from total DNA from abutilon plants with yellow mosaic symptoms: track A) molecular weight marker 1 Kb; track B) PCR product from 3.1 Kb (oligonucleotides PALv 1978 and PARc496 of component A; track C) PCR product from 0.6 Kb (oligonucleotides PBLv 2040 and PCRc 1 of component B).

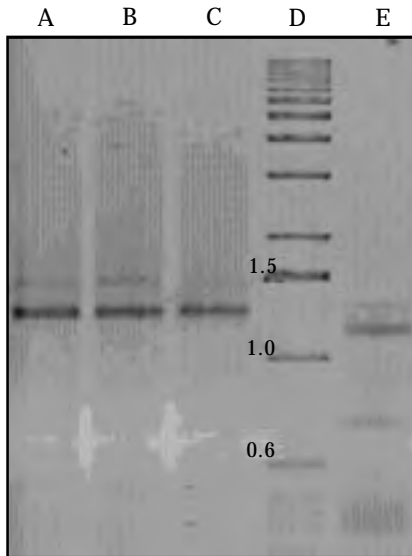


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1.0%/80 V/1 h de productos de la PCR obtenidos del ADN total obtenido de plantas indicadoras injertadas con púas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, para el componente A de geminivirus: carril A) toloache; carril B) chile; carril C) tomate; carril D) marcador de peso molecular 1 Kb; carril E) testigo positivo. ADN de un geminivirus identificado previamente en okra.

Figure 5. Electrophoresis in agarose gel 1.0%/80 V/1 h of PCR products obtained from total DNA from indicator plants grafted with thorns from abutilon with yellow mosaic symptoms, for geminivirus component A: track A) datura; track B) pepper; track C) tomato; track D) molecular weight marker 1 Kb; track E) positive control. Geminivirus DNA previously identified in okra.

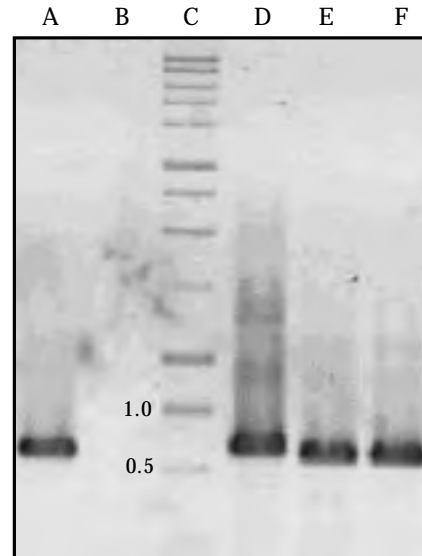


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.0%/80 V/1 h de productos de la PCR obtenidos del ADN total obtenido de plantas indicadoras injertadas con púas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, para el componente B: carril A) testigo positivo. ADN de un geminivirus identificado previamente en okra; carril B) testigo negativo; carril C) marcador de peso molecular 1 Kb; carril D) toloache; carril E) tomate; carril F) chile.

Figure 6. Electrophoresis in agarose gel 1.0%/80 V/1 h of PCR products obtained from total DNA from indicator plants grafted with thorns from abutilon with yellow mosaic symptoms, for geminivirus component B: track A) positive control. Geminivirus DNA previously identified in okra; track B) negative control; track C) molecular weight marker 1 Kb; track D) datura; track E) tomato; track F) pepper.

secuenciación, como fragmentos del genoma de un geminivirus (Lotrakul *et al.*, 1998). Se secuenciaron dos fragmentos, cuyas secuencias se depositaron en el Genbank (NCIB, 2002), una perteneciente al componente A (Número de acceso AY311783. aislamiento AbMV-PUMA) y otra perteneciente al componente B (Número de acceso AY311784. aislamiento AbMV-PUMA) de un geminivirus. La comparación con secuencias similares disponibles en la base de datos del Genbank sugiere que el virus separado de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo, es un aislamiento de un geminivirus relacionado con la especie *Abutilón mosaic virus* (AbMV. *Begomovirus*. Geminiviridae) (Jeske y Morales, 1988).

El análisis de la comparación de la secuencia parcial del componente A del geminivirus aislado del Abutilón de México, designado como AbMV-México (aislamiento AbMV-PUMA), indicó que tiene una similitud de 92% (527/571) con el componente A (Figura 9, gráfica A) de un aislamiento del virus mosaico del Abutilón reportado en Hawaii (AbMV-HW. Número de acceso U51137). La comparación utilizando

inoculated with DNA from abutilon plants with symptoms.

Southern-type hybridization tests confirmed the presence of a geminivirus in abutilon plants with yellow mottle symptoms, as well as in pepper, tomato and datura plants grafted with diseased abutilon branches. The Southern-type hybridization test indicated that the genome size of the geminivirus that infects cultivated abutilon in México is approximately 2.6 Kb per component (Figure 7, track 3).

Cloning and sequencing

Several colonies containing plasmid with inserts were obtained and identified, by PCR and sequencing, as fragments of the genome of a geminivirus (Lotrakul *et al.*, 1998). Two fragments were sequenced, and their sequences were deposited in the Genbank (NCIB, 2002), one belonging to component A (Access number AY311783, isolate AbMV-PUMA) and another belonging to component B (Access number AY311784,

la secuencia obtenida del componente B del AbMV-México (Figura 9, gráfica B), sugiere una similitud de 95% (71/74) con el aislamiento procedente de Hawaii (No. de acceso U51138); 96% (72/75) con la secuencia de un aislamiento del AbMV de Alemania (Número de acceso X15983) y una similitud de 100% (60/60) con un aislamiento del *Sida yellow vein virus* de Honduras (SYVV-Hon. Número de acceso Y11101) (Padidam *et al.*, 1995; Regenmortel *et al.*, 1997; NCBI, 2002).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AbMV- México, con las correspondientes de otros aislamientos del abutilón, permitió detectar dos sustituciones en la secuencia de aminoácidos de esta proteína en las posiciones 12 y 28 (aminoácidos P y R), que fueron idénticas y ubicadas en la misma posición en un aislamiento común procedente de Hawaii, que contiene además otras tres sustituciones en las posiciones 34, 41 y 57 (aminoácidos D, H y A), que al parecer están relacionados con la no transmisibilidad por mosca blanca de ese aislamiento, a diferencia del aislamiento de México que sí se transmitió por mosca blanca (Wu *et al.* 1996).

Aunque se desconoce el efecto de estas dos mutaciones en la patogenia del aislamiento mexicano del AbMV, es posible que también estén relacionadas, en forma aún no determinada, con la reducción en la virulencia en las transmisiones por injerto y por mosca blanca, no así en la transmisión por biobalística, en la cual el virus indujo síntomas severos de mosaico y reducción del crecimiento de las plantas de chile inoculadas por este método.

La semejanza encontrada en el virus del mosaico del abutilón de México indica que éste es una variante diferente del AbMV- Hawaii, con algunas sustituciones nucleotídicas que le confieren la capacidad de ser transmisible por mosca blanca.

CONCLUSIONES

Los síntomas de mosaico amarillo brillante, deformación y reducción de la lámina foliar, con pérdida severa de la coloración de las flores en plantas de abutilón cultivadas en algunos jardines del campus de Ciudad Universitaria de la UNAM, en la Ciudad de México, se relacionaron con la infección de un geminivirus que se transmitió con cierta dificultad por injerto, biobalística y mosca blanca a hospedantes indicadoras, pero que no se transmitió mecánicamente en ninguno de los hospedantes utilizados en el presente estudio.

El análisis y comparación de secuencias parciales clonadas de los componentes A y B del geminivirus

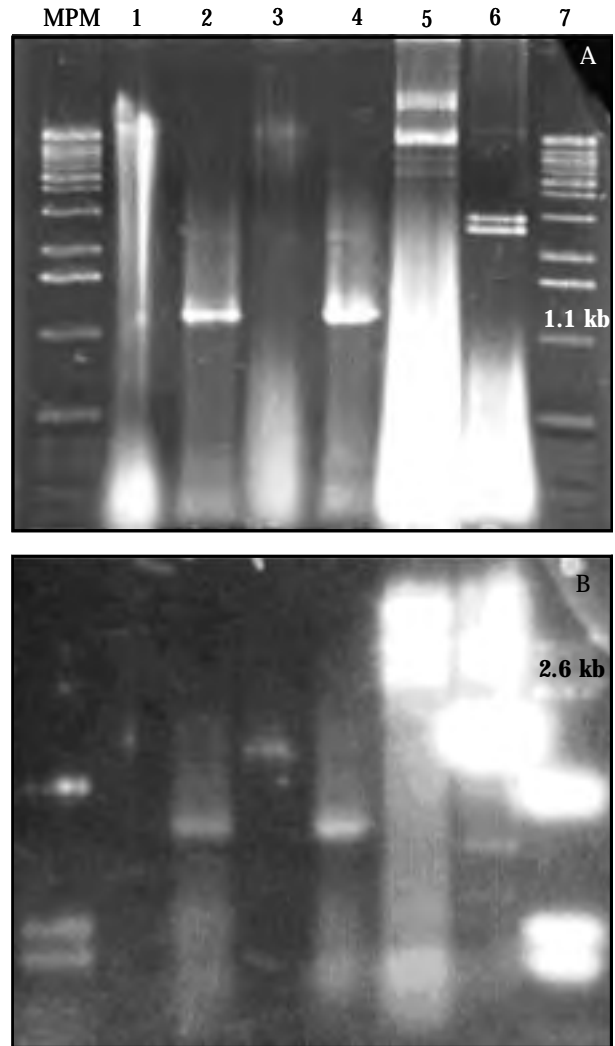


Figura 7. A) Electroforesis en gel de agarosa (1.0%) de ADN total de plantas de abutilón y productos de la PCR, y **B)** Ensayo de hibridación del tipo Southern, utilizando como sonda el gen clonado de la CP de *Pepper golden mosaic virus* (PeGMV): carril 1) ADN total de planta sana de abutilón; carril 2) producto de la PCR de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo; carril 3) ADN total procedente de plantas de abutilón con síntomas de mosaico amarillo; carril 4) producto de la PCR de un geminivirus que infecta a okra; carril 5) monómero clonado de la CP del PeGMV; carril 6) monómero clonado de PeGMV tratado con la enzima *EcoRI*.

Figure 7. Electrophoresis in agarose gel 1.0%/80 V/1 h of PCR products obtained from total DNA from abutilon plants and PCR products, and B) Southern-type hybridization test, using as probe the cloned CP gene from *Pepper golden mosaic virus* (PeGMV); track 1) total DNA from healthy abutilon plant; track 2) PCR product from abutilon plants with yellow mosaic symptoms; track 3) total DNA from abutilon plants with yellow mosaic symptoms; track 4) PCR product of a geminivirus that infects okra; track 5) cloned monomer from PeGMV CP; track 6) cloned monomer of PeGMV treated with the *EcoRI* enzyme.

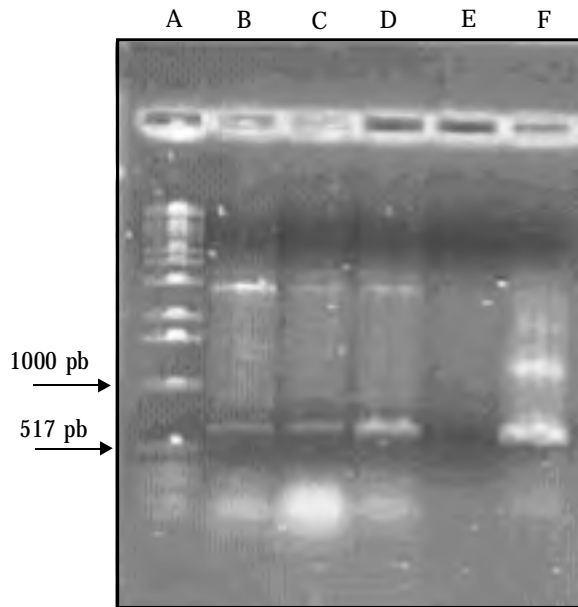


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1.0%/80 V/1 h. de productos de la PCR obtenidos del ADN de plantas de chile var. Anaheim inoculadas con AbMV-México por mosca blanca (*B. tabaci*): carril A) marcador de peso molecular 1 Kb; carriles B) a D) plantas de chile inoculadas por mosca blanca; carril E) testigo negativo (ADN de planta de chile sana); carril F) testigo positivo (ADN de planta de Okra infectada con un geminivirus).

Figure 8. Electrophoresis in agarose gel 1.0%/80 V/1 h of PCR products obtained from total DNA from pepper plants, var. Anaheim, inoculated with AbMV-México by white fly (*B. tabaci*): track A) molecular weight marker 1 Kb; tracks B) to D) pepper plants inoculated by white fly; track E) positive check (DNA of okra plant infected with a geminivirus).

separado de plantas de abutilón de México con las disponibles en el Genbank, indicó que es una variante de la especie *Abutilon mosaic virus* (AbMV), a la que se le denominó AbMV-México, con una similitud de 92% con el componente A de un aislamiento del AbMV de Hawai y de 100% con el componente B de un aislamiento del *Sida yellow vein virus* procedente de Honduras.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del AbMV de México permitió detectar dos sustituciones que son idénticas y que comparten la misma posición en el AbMV-Hawaii, que en ese caso y con otras tres mutaciones adicionales, se sospecha que pudieran estar relacionadas con la no transmisión por mosca blanca. En el caso del AbMV-México se desconoce el posible efecto de estas dos mutaciones en la patogenia general de este geminivirus, que sin embargo no alteran su transmisibilidad por mosquita blanca, su vector natural.

isolate AbMV-PUMA) of a geminivirus. The comparison with similar available sequences in the Genbank data base suggests that the virus separated from abutilon plants with yellow mosaic symptoms is an isolate of a geminivirus related to the species *Abutilon mosaic virus* (AbMV. *Begomovirus*. Geminiviridae) (Jeske and Morales, 1988).

Analysis of the comparison of the partial sequence of component A of the isolated abutilon geminivirus of México, designated as AbMV-México (isolate AbMV-PUMA) indicated that there is a 92% similarity (527/571) to component A (Figure 9, graph A) of the isolate of the *Abutilon mosaic virus* reported in Hawaii (AbMV-HW. Access number U51137). The comparison using the sequence obtained of component B of AbMV-México (Figure 9, graph B) suggests a 95% (71/74) similarity to the isolate from Hawaii (Access number U51138), 96% to the sequence of the AbMV isolate from Germany (Access number X15983) and 100% similarity (60/60) to an isolate of *Sida yellow vein virus* from Honduras (SYVV-Hon. Access number Y11101) (Padidam *et al.*, 1995; Regenmortel *et al.*, 1997; NCBI, 2002).

The analysis of the amino acid sequence of the AbMV-México capsid protein, compared with those corresponding to other abutilon isolates, allowed detection of two substitutions in the amino acid sequence of this protein in positions 12 and 28 (amino acids P and R), which were identical and located in the same position in a common isolate from Hawaii, which also contains another three substitutions in positions 34, 41 and 57 (amino acids D, H and A), which are seemingly related to non-transmission by white flies of this isolate, unlike the one from México, which was transmitted by white flies (Wu *et al.*, 1996).

Although the effect of these two mutations in the pathogenesis of the Mexican AbMV isolate is unknown, it is possible that they are also related, in a way still not determined, with reduction in virulence in transmissions by grafting and by white flies. This did not occur in transmission by biobalistics, in which the virus induced severe mosaic symptoms and reduced growth in pepper plants inoculated by this method.

The similarity found in the abutilon mosaic virus of México indicates that this is a different variant of AbMV-Hawaii, with some nucleotide substitutions that confer it the capacity of being transmissible by white flies.

CONCLUSIONS

The symptoms of bright yellow mosaic, deformation and reduction of leaf lamina, with severe loss of color in the flowers of abutilon plants cultivated in gardens

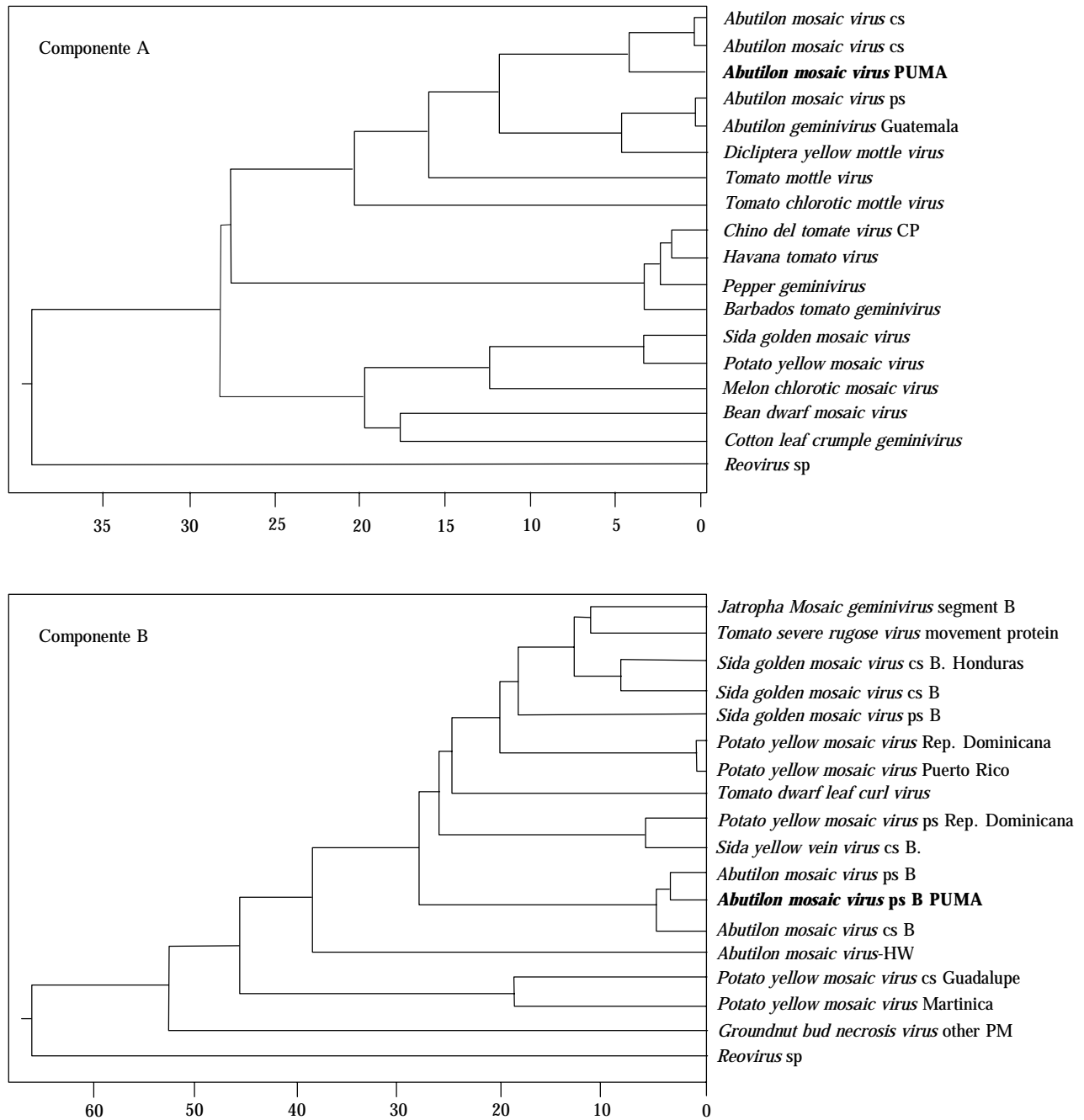


Figura 9. Dendrogramas del alineamiento y comparación de las secuencias parciales nucleotídicas para los componentes A (Número de acceso AY311783) y B (Número de acceso AY311784) de un geminivirus separado de abutilón cultivado en México (AbMV-aislamiento PUMA), con las secuencias de otros geminivirus disponibles en el GenBank (NCBI, 2002), por medio de Clustal W y MegAlign del programa DNA star.

Figure 9. Dendrograms of alignment and comparison of the partial nucleotide sequences for components A (Access Number AY311783) and B (Access number AY311784) of a geminivirus separated from abutilon cultivated in México (AbMV-PUMA isolate), with the sequences of other geminiviruses available in the Gen Bank (NCBI, 2002), using Clustal W and Megalign of the DNA star software.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto SAGARPA-CONACYT-MÉXICO No 077-2004. Se contó también con el apoyo

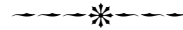
of Ciudad Universitaria campus of UNAM, México City, were related to the infection by a geminivirus that is transmitted with certain difficulty by grafting, biobalistics and white flies to indicator hosts, but was

logístico del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- Albouy, J., and J. C. Devergne. 2000. Enfermedades Producidas por Virus de las Plantas Ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp: 204-208.
- Brown, J. K. and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76: 220-225.
- Brunt, A. A. 1997. Known susceptibilities of Malvaceae. *In*: Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Dellaporta, S. L., J. Woods, and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- De La Torre, A. R., A. C. Monsalvo R., J. Méndez L., y R. F. Rivera Bustamante. 2004. Caracterización de un nuevo geminivirus asociado con los síntomas de moteado amarillo de la okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. *Agrociencia* 38: 227-238.
- Dijkstra, J., and C. P. De Jager. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and exercises.* Springer, Berlin. pp: 116-123.
- Garzón-Tiznado, J. A., I. Torres-Pacheco., J. T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella, and R. Rivera-Bustamante. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.
- Jeske, H., and F. J. Morales. 1988. Abutilon Mosaic Bigeminivirus. *In*: Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher, (eds) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version:20th August 1996.' URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Kurstak, E. 1981. *Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp: 879-910.
- Lotrakul, P., R. A. Valverde, C. A., J. Sim, and R. De La Torre. 1998. Detection of a Geminivirus Infecting Sweet Potato in the United States. *Plant Dis.* 82: 1253-1257.
- May, B. W. 1985. *Virology. A Practical Approach.* Oxford University Press. NY. pp: 5-7.
- Mehta, P., J. A. Wyman, M. K. Nakhla, and D. P. Maxwell. 1994. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* with 2 tomato infecting geminiviruses. *Journal of Economic Entomology* 87: 1285-1290.
- Moggi, G., and L. Giugnolini. 1983. *Simon & Schuster's Guide to Garden Flowers.* Fireside Book, New York. pp: 61-94.
- NCBI. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Enero 10, 2005.
- not transmitted mechanically to any of the hosts used in this study.
- The analysis and comparison of partial cloned sequences of components A and B of the geminivirus separated from abutilon plants from México with those available in the Genbank indicate that it is a variant of the species *Abutilon mosaic virus* (AbMV), which was denominated AbMV-México, with 92% similarity to component A of an AbMV isolate from Hawaii and 100% similarity to component B of a *Sida yellow vein virus* isolate from Honduras.
- Comparison of the amino acid sequence of the Mexican AbMV capsid protein allowed detection of two substitutions that are identical and that have the same position as in AbMV-Hawaii. In this case, and with another three additional mutations, they are suspected to be related to non-transmission by white flies. In the case of AbMV-México, it is unknown what the possible effect these two mutations have in the general pathogenesis of the geminivirus, which otherwise does not alter transmissibility by whitefly, its natural vector.

—End of the English version—



- Padidam, M., R. N. Beachy, and C. M. Fauquet. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263.
- Regenmortel, M. H. V., D. H. Bishop, C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, and C. H. Calisher. 1997. Guidelines to the demarcation of virus species [news]. *Archives of Virology* 142: 1505-1518.
- Rojas, M. R., R. L. Gilberston, D. R. Russell, and D. P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the Polymerase Chain Reaction to detect whitefly-transmitted Geminiviruses. *Plant Dis.* 77: 340-347.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Surzycki, S. 1999. *Basic Techniques in Molecular Biology.* Springer Verlag. Berlin. pp: 233-262.
- Walkey, D. G. A. 1991. *Applied Plant Virology.* J. Wiley & Sons. New York. pp: 93-198.
- Wu, Z. C., J. S. Hu, J. E. Polston, D. E. Ullman, and E. Hiebert. 1996. Complete Nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of Abutilon mosaic Geminivirus in Hawaii. *Phytopathology* 86: 608-613.