

INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES EN LA INTERACCIÓN GEMINIVIRUS-CHILE.

Nadia Alejandra López-Martínez^{1,2}, Irineo Torres-Pacheco¹, Ramón Gerardo Guevara-González^{2*}, Mario Martín González Chavira¹, María Alejandra Mora-Avilés¹, Rosalía Reynoso-Camacho³, Garzón-Tiznado J. A ⁴ y Rafael Rivera-Bustamante⁵.

Investigación apoyada por el CONCYTEG a ITP.

*Autor Responsable: gerardo@itc.mx

RESUMEN

Para determinar el efecto la carga viral (cantidad de virus inoculado) e inoculación en edad fenológica en la manifestación del síndrome en Chile, se evaluaron cuatro niveles; 1, 2, 10 y 15 µg de DNA viral que corresponden a 1.565×10^{14} , 3.13×10^{14} , 1.565×10^{15} y 2.347×10^{15} genomas virales, respectivamente del primer factor y, los eventos de fenología para el segundo factor siguientes: 4-8 hojas verdaderas, 40 días después del trasplante, antesis (pre floración) y primera fructificación.

Se trabajó con el geminivirus huasteco de Chile (PHV) y se utilizaron diferentes poblaciones bajo selección individual avanzada de Chile Ancho, Pasilla, Habanero y el CV. Sonora Anaheim). La inoculación o infección de las plantas se realizó por la técnica de biobalística. El diseño experimental usado fue completamente al azar.

Las variables de respuesta que se evaluaron fueron: infectividad, severidad del síndrome y cantidad de DNA viral en la planta. La incubación y desarrollo de los síndromes se realizó en condiciones de invernadero.

Para el análisis molecular, se realizaron extracciones de ADN por el método de Dellaporta; para confirmar la presencia del virus se realizó la técnica de PCR; y para determinar concentración viral la técnica de ELISA. La mayor severidad en la expresión del síndrome se dio en estado de plántula y mayor concentración viral en la planta se tuvo con la carga viral de 2 µg (3.13×10^{14} genomas virales) en la etapa de antesis.

Palabras clave: Geminivirus, carga viral, Chile, epidemiología, etapa fenológica

¹ INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Bajío, Unidad de Biotecnología

² Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Bioquímica

³ Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, PROPAC

⁴ INIFAP, CIRNO, Campo Experimental Valle de Culiacán, Unidad de Biotecnología

⁵ CINVESTAV, Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética

INTRODUCCIÓN

Se tiene conciencia de que las solanáceas, son dañadas por enfermedades causadas por geminivirus transmitidos por mosquita blanca desde mediados de los 80s del siglo XX, (*Bemisia tabaci* Genn. o *B. argentifolii* Bellows and Perring) (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

Los geminivirus se caracterizan por tener genoma de ADN de cadena circular de uno o dos moléculas y un tamaño de cada una de entre 2.5 y 2.9 Kb. La partícula se ve como dos poliedros regulares idénticos fusionados por una de sus caras (Lazarowitz *et al.*, 1992). Los geminivirus se clasifican en cuatro géneros de acuerdo con el vector que los transmite, la planta hospedera a la que infectan y la organización de su genoma. Tales géneros son: Mastrevirus, Curtovirus, Begomovirus y Topocuvirus (Fauquet *et al.*, 2004). Se estima que en la altiplanicie mexicana las pérdidas por enfermedades de etiología geminiviral puede ser de hasta 40% en Chile (Garzón Tiznado *et al.*, 2002).

En México a las enfermedades asociadas a este tipo de virus, se les ha llamado “chino” del jitomate en Sinaloa y en Chile “planta atigrada” en Puebla (Garzón-Tiznado y Galindo-Alonso, 1985). Garzón-Tiznado *et al.*, (1993) y Torres-Pacheco *et al.*, (1993) establecieron a nivel molecular la etiología de una enfermedad geminiviral llamada “rizado amarillo” en el cultivo de Chile en el sur de Tamaulipas. En este tipo de enfermedades han estado involucrados geminivirus tales como el virus del Chino del tomate (CdTV), virus huasteco del Chile (PHV) y PepGMV (antes TPV) (Brown y Nelson, 1988; Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Con el fin de manejar racionalmente las enfermedades que causan estos patógenos en Chile, a los estudios de etiología, siguieron los esfuerzos encaminados al conocimiento epidemiológico (Vera 2000, Garzón-Tiznado *et al.*, 2003; Méndez-Lozano *et al.*, 2003).

Para establecer las bases para obtener variedades resistentes (Godínez-Hernández, *et al.*, 2001; López-Anaya *et al.*, 2003 López-Anaya *et al.*, 2003, Fabiola 2004). Resumiendo, los trabajos se han orientado a la determinación de la distribución de los geminivirus en las regiones productoras de México (Torres-Pacheco *et al.*, 1996), plantas hospederas alternativas (Garzón Tiznado *et al.*, 2002) e incluso a la interacción entre geminivirus (Torres, 1997; Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Si embargo, es necesario complementar la información de las condiciones en que se lleva el proceso de infección, la cantidad de virus con se realiza la inoculación o transmisión y la edad fenológica en la que las plantas son más susceptibles a la infección o la enfermedad se manifiesta con mayor severidad.

En los cultivos de Chile en México el geminivirus más conspicuo es el huasteco del Chile (PHV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1996), el cual fue por primera vez reportado en 1993 (Garzón Tiznado, *et al.*), pertenece al género Begomovirus los cuales son transmitidos por mosquita blanca, infectan a dicotiledóneas y su genoma está constituido por dos moléculas.

En cuanto a geminivirus y particularmente en el caso el virus huasteco del chile (PHV) no se tiene información sobre algunos factores que pueden ser críticos para determinar la severidad de los daños. Por ello este trabajo se enfocó a evaluar el efecto en la severidad y otras variables asociadas al síndrome de la carga viral de inoculación y de la edad de la planta al realizarse la infección.

La suposición de que las plantas es más resistentes a cualquier estrés a medida que va creciendo y desarrollándose es intuitiva (Balsubrahmanyam et al., 2000) y en cuanto a la carga viral, se ha reportado que en el jitomate, inoculado con el virus de la marchitez manchada (TSWV), fue afectado de manera diferente tanto en incidencia como en el rendimiento (Moriones et al., 1998), situación que se ha demostrado también con plantas transgénicas (Jan et al., 2000). Por lo antes citado en este trabajo se tiene como objetivo evaluar los efectos de carga viral, fenología de la planta, sobre el desarrollo del síndrome en colectas de chile inoculadas con el virus huasteco del chile (PHV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron los siguientes materiales genéticos: 30-15, el pasilla Sel 12, el cv. Sonora Anaheim y el habanero UX-SMH-55. Los factores considerados fueron: a) carga viral de inoculación (CVI), con los siguientes niveles: 1, 2, 10 y 15 μg de DNA viral que corresponden a 1.565×10^{14} , 3.13×10^{14} , 1.565×10^{15} y 2.347×10^{15} genomas virales respectivamente y b) la edad fenológica de las plantas al momento de la inoculación (EFI) y se incluyeron los siguientes eventos: plántula en estado de 4-8 hojas verdaderas, 30-40 días después de transplante, anthesis e inicio de primera fructificación. Las condiciones de temperatura en invernadero de 25-30°C, fueron constantes para todos los tratamientos.

El diseño de tratamientos ligó cada experimento de manera baconiana, es decir, cuando se evaluó el efecto de la carga viral, la etapa fenológica de plantas 4-8 hojas fue constante, en tanto que cuando se evaluó el efecto de la inoculación en diferentes etapas fenológicas, la carga viral con la que se inoculó fue constante (10 μg). El diseño experimental fue completamente al azar, cinco plántulas por unidad experimental y tres replicas. En el análisis de la varianza de la información se empleó el método ANOVA de Fisher. La prueba de separación media se realizó con la *t* de Tuckey.

Las variables en las cuales se determinó el efecto fueron: Infectividad misma que se evaluó visualmente en términos de porcentaje. Severidad, evaluada acorde a la escala previamente reportada por Torres Pacheco (1997) y Godínez Hernández *et al.*, (2001). Presencia viral esta variable se infirió a partir de un análisis inmunoenzimático (ELISA con el protocolo de AGDIA) y se reforzó la detección de la presencia viral por medio de la PCR (Mullis *et al.*, 1986). Para este último caso, se amplificó la región común de PHV, que es de aproximadamente 200 pb, con la finalidad de confirmar presencia o ausencia del ADN viral del PHV.

Las condiciones utilizadas son las siguientes: Temperatura de desnaturalización: 94°C, 1 min. Temperatura de Alineamiento: 55° C, 1 min. Temperatura de extensión: 72 °C, 2 min. Los oligonucleótidos utilizados son el 240 y 241 (Torres Pacheco *et al.*, 1996). Se emplearon 35 ciclos para la amplificación. La inoculación se realizó por medio de biobalística (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993) y la extracción de ADN viral se realizó por medio del método de Dellaporta *et al.*, (1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la carga viral. La evaluación de los efectos de cada uno de los factores se realizó en las variables de infectividad, severidad en los síntomas y concentración viral en las plantas tratadas a) *En la infectividad.* En la Tabla 1, se presentan los resultados de infectividad, expresados en porcentaje de infección, se puede observar que con 307 billones de genomas virales o sea 2 µg indujeron el mayor porcentaje de infección, no se tuvo una alta infección cuando se inoculó con 15 µg, cantidad que lógicamente tenía un número mayor de virus (2 312 billones), ni con la carga viral de 1 µg que es el menor número de virus (154 billones).

Tabla 1. Efecto en la variable infectividad, en porcentaje, de la inoculación con diferentes cantidades de virus.

Carga viral en µg	Número de genomas virales	Porcentaje de infección %
1	1.541 x 10 ¹⁴	31.25
2	3.07x 10 ¹⁴	59.3
10	1.541 x 10 ¹⁵	29
15	2.312 x 10 ¹⁵	20

Los geminivirus se multiplican en el núcleo y esta función, la expresión y la regulación de sus genes es dependiente de factores de la célula hospedera (i.e. ADN y ARN polimerasa, factores transcripcionales, etc.). Lo anterior implica una alta dependencia a los procesos equivalentes de sus hospedero (Torres-Pacheco, *et al.*, 1996). Por ello, probablemente en este caso, el resultado observado se deba a una competencia por los sitios de la membrana nuclear y de los plasmodesmos. Como existe una competencia por dichos sitios, probablemente se llegan a estorbar teniendo como resultado una baja eficiencia de la interacción virus-célula. También se puede tratar de un fenómeno ligado más a la viscosidad de la muestra en la membrana para ejecutar la inoculación por biobalística.

b) *En la severidad de los síntomas de las plantas.* La mayor severidad del síndrome se encontró con la carga viral de 2 µg y el menor grado de severidad se encontró con una carga viral de 1 µg, con 10,15 µg no existe diferencia (Figura 1).

Como en cuanto a la severidad de los síntomas se tiene también que la carga de 2 µg fue la que indujo el mayor grado, probablemente ocurrió lo mismo que en el caso de la infectividad, debido tal vez a que efectivamente exista una competencia con las cargas más altas, y con la de 2 µg sea más fácil entrar a los sitios de reconocimientos para la interacción entre el geminivirus y la planta.

Con los resultados obtenidos en severidad se puede observar que para este virus y en las condiciones en que se inocularon las plantas; no existió una correlación entre la cantidad del virus y la severidad del síndrome. Se antoja especular que pocos vectores pueden ocasionar una manifestación importante de la enfermedad en una región en época determinada o muchos (vectores) pueden ser intrascendentes (Mann, *et al.*, 1997).

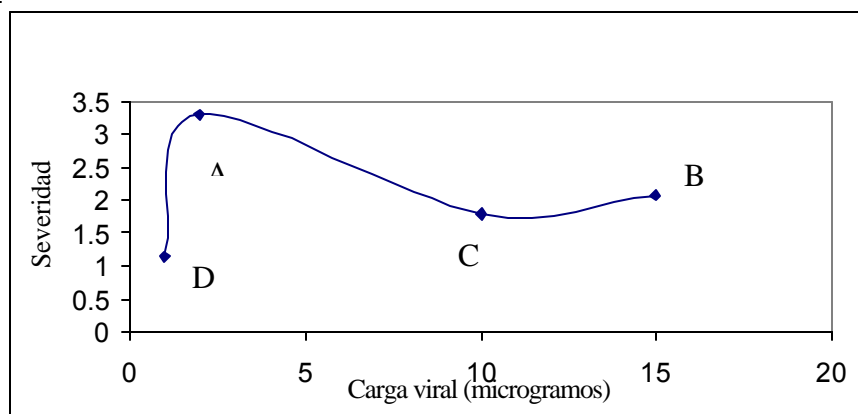


Figura 1. Efecto en la severidad en varias poblaciones de Chile con diferentes cantidades de inóculo viral. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa a un $\alpha=0.01$, C.V.=20.03%

c) *En la concentración viral dentro de las plantas inoculadas.* Cuando se inoculó con una carga viral de 15 µg se indujo mayor concentración de virus en la planta; en tanto que con 10 µg se propició una menor concentración viral en la planta (Figura 2). Un dato que hay que resaltar es que la carga viral de 10 µg es la que se ha utilizado en varios estudios anteriores (Grazón-Tiznado, *et al.*, 1993; Godínez Hernández *et al.*, 2001., Anaya López *et al.*, 2003). Nótese que después de 15µg la carga que indujo mayor concentración viral fue la de 2µg.. Interesantemente, estos datos ponen en un plano paradójico el efecto observado en el caso de la severidad. No obstante, si bien con la inoculación con 2µg de genomas virales se tuvo mayor eficiencia en la severidad, puede notarse que el siguiente en esa misma dirección fue el tratamiento con 15µg.

Una explicación factible puede estar en el hecho de que la inoculación con 2µg puede ser eficiente en términos mecánicos por evento y que la inoculación con 15µg puede ser más eficiente en número de eventos de inoculación. De cualquier forma también en esta variable el segundo mejor tratamiento en fu cuando se inoculó con 2µg.

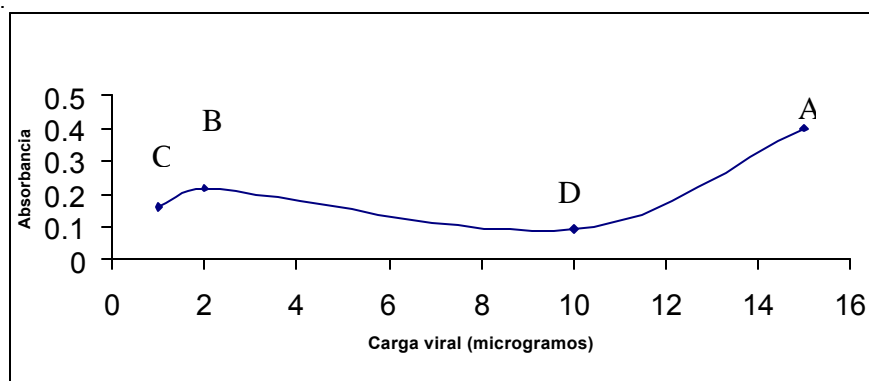


Figura 2. Efecto de la cantidad de virus con que se inocula en la cantidad de virus en la planta. Letras diferentes indican diferencia significativa. $\alpha = 0.01$ y C.V = 18.17%.

Efecto de la etapa fenológica. a) *En la infectividad.* Como se observa en la Tabla 2 en la etapa fenológica de antesis fue donde se presento una mayor cantidad de plantas infectadas con una inoculación constante de 10 μg de genoma viral. Lo anterior quizá se deba a que en esta etapa existe una mayor cantidad de meristemos; por las yemas florales y vegetativas en donde hay grupos de células de los que se originan nuevas estructuras a partir de los que se originan nuevas estructuras.

Es decir que en ese estado la planta al tener un mayor número de células en fase S, y como las etapas de antesis y fructificación son donde existen más puntos meristemáticos por la proliferación de yemas, florales el ADN viral tiene una mayor oportunidad de entrar a los sitios específicos de la división celular y así incrementar la probabilidad de infección de la planta.

Tabla 2. Efecto en la infectividad de la inoculación en diferentes etapas fenológicas.

<i>Etapa fonológica</i>	<i>Porcentaje de infección</i>
4-8 hojas verdaderas	37.5
30-40 días después del transplante	25
Antesis	71.4
Primera fructificación	44.8

b) *En la severidad de los síntomas de las plantas.* En cuanto al efecto en esta variable se detectó que en la etapa de 4-8 hojas verdaderas es en donde se induce un mayor grado de severidad aunque en este sentido con el caso de la antesis no hay diferencias significativas (Figura 3).

De acuerdo con Torres Pacheco *et al.*, (1996), estos resultados permiten recrear la inferencia de que las células infectadas de las plantas en 4-8 hojas verdaderas serían llevadas a la fase S y probablemente la inducción de células en fase S en tejidos donde no deben de existir este tipo de células produce trastornos de forma y función.

En el caso de la anthesis la explicación pudiera orientarse a aceptar el hecho de que al haber mas puntos de crecimiento (células actualmente en fase S), la infección en la planta se da en un número mayor de puntos y consecuentemente la cantidad de replicación causa trastornos por abatimiento de fotosintatos, por ejemplo, tal como lo sugiere Godínez Hernández *et al.*, (2001).

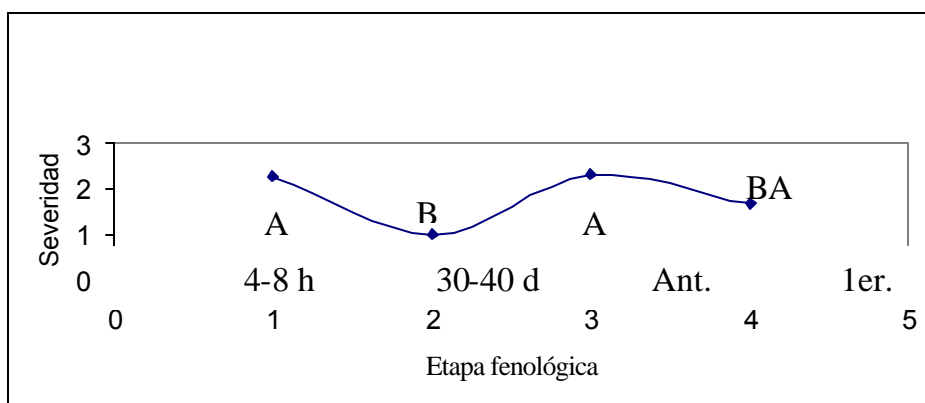


Figura 3. Efecto en la severidad del síntoma cuando se inocula en diferentes etapas fenológicas. Letras diferentes indican diferencia significativa. $\alpha=0.01$ y C.V.= 20.03%

c) *En la concentración viral dentro de las plantas inoculadas.* Con relación a esta variable, se tiene que a partir de la anthesis se favoreció de manera significativa la cantidad de virus dentro de la planta (Figura 4).

Lo anterior luce consistente con la idea de bajo esas condiciones existe un número considerable de células meristemáticas, como se mencionó anteriormente dada la proliferación de yemas tanto florales como vegetativas; teniendo así las condiciones para que el virus se replique, cuando hay más células en fase S (Accotto *et al.*, 1993), y éstas son más cuando las plantas tienen muchos puntos meristemáticos.

Cabe destacar que para las tres variables estudiadas en el factor de carga viral, se tiene a la etapa de anthesis como la mejor edad de la planta para generar el desarrollo del síndrome del virus.

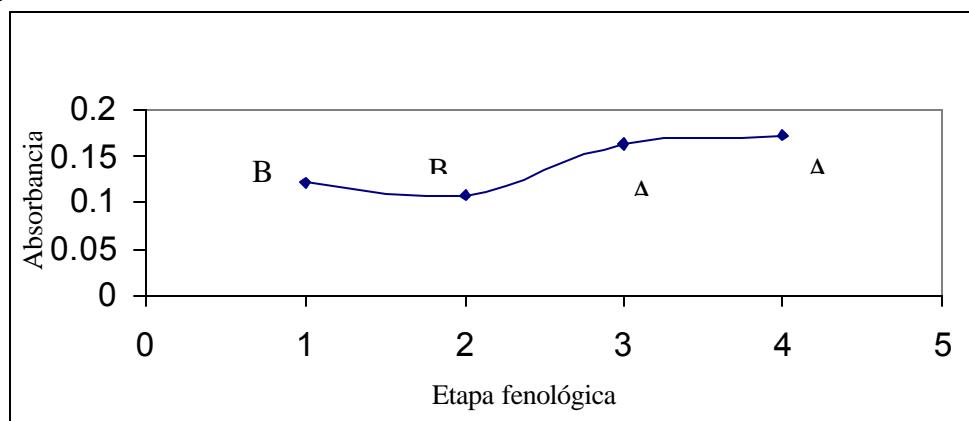


Figura 4. Efecto en la cantidad de inoculo en la planta cuando se inocula en diferentes etapas fenológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas. $\alpha=0.01$ y C.V=35%.

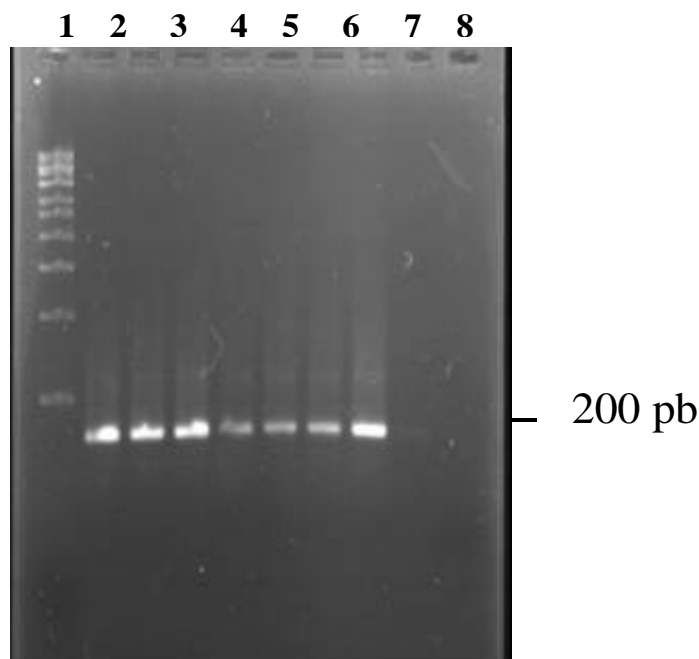


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % que muestra los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR efectuada en muestras de ADN de hojas apicales, que presentaron síntomas posteriores a la inoculación por biobalística con el PHV. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control Positivo, Carril 3: planta con severidad 5, Carril 4: planta con severidad 4, Carril 5 y 6: planta con severidad 3, Carril 7 y 8 planta con severidad 2, Carril 9: planta con severidad 1, Carril 10 Control Negativo. Carril 6 y 8: *C. chinense*. Carril: 3,4,5,7,9: *C. annuum*.

Cabe señalar que en todos los casos la inferencia que se hace de la cantidad de virus a partir de la detección por ELISA, en cuanto presencia del genoma viral, se confirmó por medio de la reacción de PCR.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones experimentales descritas los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que:

- La cantidad de inóculo viral influye la infectividad, la severidad del síntoma y la cantidad de virus en la planta. Para fines prácticos en ese sentido se induce la expresión de estas **variables a niveles más altos cuando se inocula con 2⁹g de virus (3.13x10¹⁰ genomas virales)**.
- Las etapas más sensibles a la infección en términos de severidad es cuando la infección ocurre cuando se tiene estado de Plántula o bien se inicia la floración.
- El riesgo mayor de infección y de propagación del inóculo ocurre a partir de que la planta entra a la etapa de antesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Accotto, G.P., Mullineaux, P.M., Brown, S.C., and Marie, D. 1993. Digitaria streak virus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* 195:257-259.
2. Anaya López J.L., I. Torres Pacheco, M. González Chavira, and J.L. Pons-Hernández. R.G. Guevara-González, C.I. Muñoz-Sánchez, and L. Guevara-Olvera, R.F. Rivera-Bustamante, S. Hernández-Verdugo. 2003. Resistence to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience* 38 (2):251-255.
3. Anaya López José Luis; Yolanda Godínez Hernández; Claudia Ivonne Muñoz Sánchez; Lorenzo Guevara Olvera; Ramón Gerardo Guevara González; Rafael Francisco Rivera Bustamante; Mario Martín González Chavira; Irineo Torres Pacheco. 2003. Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.). Aceptado, Revista Chapingo Serie Horticultura.
4. Balasubrahmanyam A., Baranwal V. K., Lodha M: L: Varma A., Kapoor H.C. 2000. Purification and properties of growth stage-dependent antiviral proteins from the leaves of *Celosia cristta*. *Plant Science* 154 13-21.
5. Garzón Tiznado, J.A., Acosta García, G., Torres Pacheco, I., González Chavira, M., Rivera Bustamante, R.F., Maya Hernández, V. y Guevara González, R.G. 2002. Presencia de los geminivirus, Huasteco del chile (PHV), Texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T) y Chino del tomate (VCdT), en los estado de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Volúmen 20 (1): 45-52.
6. Garzón-Tiznado, J.A.; Torres-Pacheco, I.; Ascencio-Ibanez, 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(5): 514-521.

7. Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J. L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M. and I. Torres-Pacheco. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience* 36 (1):139-142.
8. Lazarowitz, S.G., Wu, L. C., Rogers, S. G. and Elmer, J. S. 1992. Sequence specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4: 799-801.
9. Mann J. A., Harrington R., Carter N., Plumb R. T. 1997. Control of aphids and barley yellow dwarf virus in spring-sown cereals. *Crop protection* 16(1): 81-87.
10. Mullis, K. B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzimol.* 155: 335-350.
11. Torres-Pacheco, I.; Garzón-Tiznado, J. A., Herrera-Estrella, L. And Rivera-Bustamante, R 1993. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 86: 1186-1192.
12. Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R.G, Ruíz-Medrano, R. Y Rivera-Bustamante, R.F. 1996a. Los Geminivirus como Modelos de Estudio del Ciclo Celular y de la Apoptosis en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14(2): 88-96.
13. Torres-Pacheco, I.; Garzón-Tiznado, A.; Brown, J.K.; Becerra-Flora, A.; Rivera-Bustamante, F.R. 1996b. *Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States.* *Phytopathology*, 86: 1186-1192.
14. Torres-Pacheco, I; 1997, Geminivirus involucrados en el "rizado amarillo" del chile: Interacciones entre PHV y TPV. Tesis de Doctorado. Cinvestav-Irapuato, Gto.