

## **LA CANTIDAD DE VIRUS Y LA ETAPA FONOLÓGICA; INFLUENCIA EN ALGUNAS VARIABLES DE RESPUESTA EN LA INTERACCIÓN TEV-CHILE.**

Guadalupe Valdez Bustos<sup>1,2</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>1\*</sup>, Dulce María Lugo Rodríguez<sup>1,2</sup>, Ramón Gerardo Guevara-González<sup>3</sup>, Mario Martín González Chavira<sup>1</sup>, Horacio Guzmán Maldonado<sup>1</sup>, Lorenzo Guevara Olvera<sup>3</sup> y Ruben Paredes Uribe<sup>2</sup>

Investigación apoyada por el CONCYTEG a ITP.

\*Autor Responsable: [torres.irineo@inifap.gob.mx](mailto:torres.irineo@inifap.gob.mx)

### **RESUMEN**

Para manejar mejor las enfermedades virales, particularmente en Chile, es necesario implementar estrategias racionales. Aun cuando en algunos casos se realizan monitoreos para orientar las aplicaciones no se tienen referencias de la edad en que la protección de la planta ya no es necesaria, tampoco de la carga viral crítica, ni de las condiciones de temperatura y humedad relativa que favorecen la enfermedad. Por ello, en este trabajo se tuvo como objetivo determinar el efecto de la cantidad de inóculo y la etapa fonológica de la planta en el proceso de infección. Como modelo de virus cuyo genoma es de RNA y por su importancia, se utilizó el virus jaspeado del Chile (TEV) el cual se inoculó con "frotación con carborundum".

Los factores evaluados fueron: la cantidad de virus inoculado y la edad de la planta. Paralelamente se analizó el efecto de la temperatura y la humedad relativa. Para la detección de la presencia y cuantificación viral se recurrió a la ELISA. Se incluyeron 4 materiales de Chile: Sonora Anaheim, Tecamachalco Puebla 10-1-2 frutos largos, Chilpaya y Yucatán SMH-22. Los resultados de este trabajo sugieren que en severidad y cantidad de virus en la planta, la dilución cuyo efecto fue mayor fue  $10^{-1}$  (D.O 0.091). Por otro lado a partir de la antesis se observó mayor severidad y en este caso correlacionada con una mayor concentración viral en la planta. Finalmente en general una humedad relativa mayor de 70% y una temperatura de 20°C. favorecen el desarrollo de la enfermedad.

**Palabras clave:** Fenología, cantidad de virus inoculada, TEV, severidad

### **INTRODUCCIÓN**

Entre las enfermedades de carácter infeccioso más importantes en Chile, solanácea cuyo centro de origen es México (Laborde y Pozo, 1984), están las de etiología viral y de acuerdo con estudios recientes, el virus jaspeado del tabaco (TEV) es uno de los virus que se encuentran más diseminados en las diferentes regiones donde se cultivan chiles (Vera, 2000).

<sup>1</sup> INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Bajío, Unidad de Biotecnología Instituto

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico Agropecuario No. 33

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Celaya

Las enfermedades causadas por este virus tienen gran importancia en México y otros países, por las pérdidas que van desde 20 hasta el 100% cuando el virus ya está completamente establecido en el cultivo (Morales-Batalla, 2001). Por ejemplo, en el estado de Guanajuato se estiman pérdidas de entre 36-120 millones de pesos cada año por el efecto del ataque de los virus entre los que destacan el geminivirus huasteco del chile (PHV) y el virus jaspeado del tabaco (TEV), y se estima que por intentos fallidos del manejo de la enfermedad se aplican en el ambiente un excedente de 50 ton. con costos de 3 millones de pesos, independientemente del daño al medio (Garzón-Tiznado et al., 1993; Torres-Pacheco et al., 1996).

Al TEV, además de conocerse con el nombre de Tobacco Etch Virus, se le denomina con otros sinónimos como Datura Virus Z y Tomato Etch Virus (Francki et al., 1985). El TEV es un Potyvirus y estos virus se caracterizan por tener varillas filamentosas flexibles de 680-900 nm de longitud x 11 nm de ancho, tienen un coeficiente de sedimentación de 150 Sv y una densidad de 1.31 g/cm<sup>3</sup> en CsCl, poseen un genoma de una sola cadena de RNA positivo con peso molecular de 3-3.5 x 10<sup>6</sup>, su cápside está formada por subunidades constituidas por un solo polipéptido de un peso molecular de 32-34 x 10<sup>3</sup> (Matthews, 1979; Hiebert et al., 1979).

Rodríguez en 1971 presentó una amplia descripción del síndrome de este virus en Chile ancho que consistió en plantas con un desarrollo reducido que destaca a la vista por el color verde amarillento que contrasta con el verde normal de las plantas sanas, si la infección fue tardía, los brotes nuevos que crecieron posteriormente, son de menor tamaño y amarillentos, y se diferencian del resto porque conservan su apariencia y tamaño normal.

En hojas y frutos es posible observar el contraste entre áreas amarillentas que alternan con otras de color verde normal, lo que le da apariencia de un mosaico. Las hojas y frutos se deforman, los frutos no alcanzan su tamaño normal y son encorvados. El número de semillas se reduce y sólo algunas alcanzan a completar su desarrollo. La producción de flores es reducida. Este virus es especialmente frecuente en la región de la Huasteca, donde causa daños de importancia económica. También está presente en la región de Delicias, Chihuahua (Nuez et al., 1996).

Con la finalidad de aportar elementos al diagnóstico que permitan diseñar mejores estrategias de manejo de las enfermedades se estima que la información sobre algunos factores que pueden ser críticos para determinar la severidad de los daños puede ser útil. La suposición de que las plantas son más resistentes al estrés a medida que se desarrollan 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 con diferentes cantidades de inóculo, situación que se ha demostrado también con plantas transgénicas. 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.

Teniendo como referencia lo señalado, en este trabajo se tuvo como objetivo evaluar los efectos de carga viral, y la inoculación de la planta en diferentes etapas fonológicas sobre el desarrollo del síndrome en colectas de chile inoculadas con el virus jaspeado del tabaco (TEV), y de esta manera fue generar información para diseñar prácticas que permitan reducir la aplicación de pesticidas en el manejo de enfermedades de etiología en Chile.

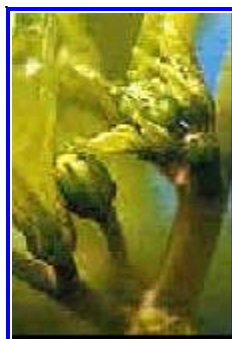
## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero y en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se usaron los siguientes materiales genéticos: Sonora Anaheim, Yucatán SMH-22, Tecamachalco Puebla y una selección de Chilpaya.

Los factores considerados fueron: a) carga viral de inoculación (CVI), con los siguientes niveles:  $10^1$  con una D.O. de 0.107,  $10^{-1}$  con una D.O. de 0.091 y  $10^{-2}$  con una D.O. de 0.072 y b) la edad fenológica de las plantas al momento de la inoculación (EFI) y se incluyeron los siguientes eventos: 4 hojas verdaderas (Figura 1), plantas en antesis (Figura 2) y primera fructificación (Figura 3). 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 fonológica de plantas 4 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 ( $10^1$ ). 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 medias se realizó con la *t* de Tuckey.



**Figura 1. Plántula con 4 hojas verdaderas**



**Figura 2. Planta en antesis**



**Figura 3. Planta en primera fructificación**

La planta movilizará las sustancias que forman parte de sus tejidos (hojas) hacia los frutos, iniciando por las hojas más viejas y luego las intermedias hasta llegar a las más jóvenes, y si esto aún no es suficiente la planta utilizará las reservas almacenadas en los tallos.

Las variables en las cuales se determinó el efecto fueron: 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).

El inóculo fue preparado triturando 1 gr de tejido enfermo en un mortero previamente esterilizado con 10 ml de Buffer de extracción general. Se tomaron 10 ml de la molienda y se colocó en un tubo de ensayo de 15 ml, esto fue para la dilución  $10^1$ . Para la dilución  $10^{-1}$ , se tomó de la dilución  $10^1$  1ml y se aforo a 10 ml con Buffer de extracción General. Para la dilución  $10^{-2}$ , se tomó de la dilución  $10^{-1}$  1ml y se aforo a 10 ml con Buffer de extracción General. La inoculación se realizó de manera mecánica. La temperatura y humedad relativa. Se tomaron con un censor para su análisis posterior por medio de la computadora.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la cantidad de virus inoculada en la severidad. En este caso al parecer se evaluó el espectro posible de respuesta ya que se define una curva de respuesta de manera muy clara. En el Cuadro 1 y la Figura 4, se muestra e ilustra las diferencias entre las medias de la variable severidad. Se puede observar que la dilución de  $10^{-1}$  fue la que causó un mayor grado de severidad. Estrictamente la diferencia de la respuesta con los otros niveles fue igual estadísticamente, por lo que las diferencias percibidas son producto del error experimental.

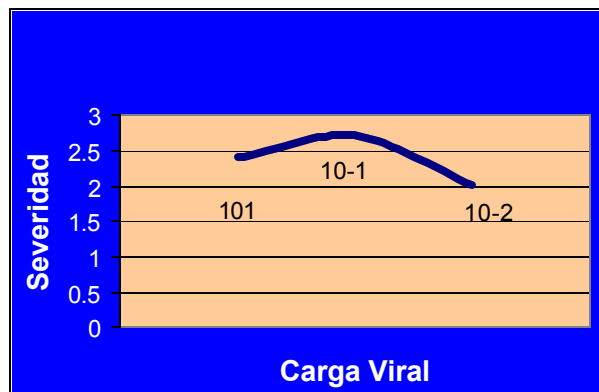
En el presente trabajo se registró que la dilución viral cuyos efectos fueron mayores en las plantas fue la de  $10^{-1}$ (D.O.0.091) y la de menor efecto fue  $10^{-2}$  (D.O.0.072), tanto en la variable de severidad como en la de concentración viral se tuvieron los mismos resultados. Una explicación al fenómeno puede ser que cuando se inocula con pocos virus este no alcanza una concentración necesaria para causar un síndrome importante. Por otro lado cuando hay exceso pudiera haber inhibición alosterica en los sitios de interacción a nivel celular con la planta que pudiera ser el caso de la carga viral  $10^1$  (Torres-Pacheco, I. 1997).

**Cuadro 1. Comportamiento en severidad en plantas de Chile cuando se inoculó con diferentes cargas virales.**

CARGA VIRAL	SEVERIDAD	SEPARACIÓN DE MEDIAS TUKEY
$10^{-1}$ (D.O.0.091)	2.7200	A
$10^1$ (D.O.0.107)	2.4100	AB
$10^{-2}$ (D.O.0.072)	2.0100	B

\*Las letras diferentes indican diferencia estadística

**Figura 4. Efecto de la inoculación con TEV en diferentes cantidades.**



*Efecto en la cantidad de virus en la planta.* En el Cuadro 2 y la Figura 5, se observa que la carga viral que repercutió en una mayor concentración viral en la planta fue la de 10<sup>-1</sup> y la que menor efecto tuvo fue la de 10<sup>-2</sup>.

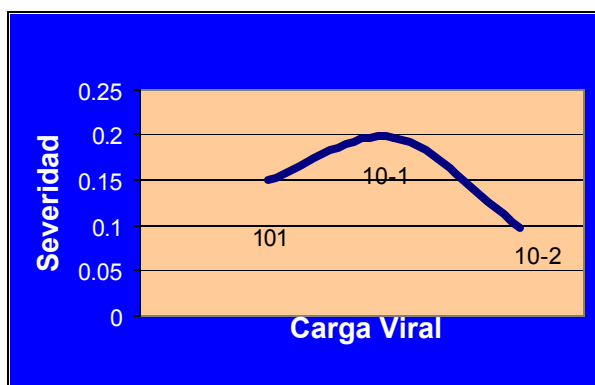
**Cuadro 2. Comportamiento de la concentración viral en plantas de Chile cuando se inoculó con diferentes cargas virales de TEV.**

CARGA VIRAL	CONCENTRACIÓN VIRAL	SEPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY
10 <sup>-1</sup> (D.O.0.091)	0.19746	A
10 <sup>1</sup> (D.O.0.107)	0.14956	AB
10 <sup>-2</sup> (D.O.0.072)	0.09779	B

\*Las letras diferentes indican diferencia estadística significativa

Con respecto al factor de carga viral, prácticamente no hay estudios consistentes. Hilije en 1996, reporta una experiencia con geminivirus en jitomate, al parecer con el virus de la cuchara (TYLCV), dice que dos mosquitas blancas (vector) por planta son necesarias para ocasionar la enfermedad en la planta causando a su vez daños significativos.

**Figura 5. Efecto de la inoculación con TEV en diferentes cantidades la concentración viral en la planta.**



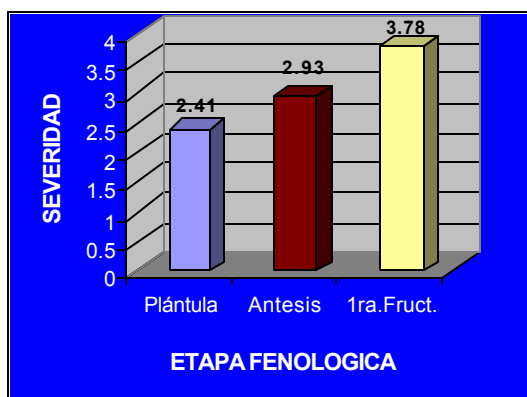
No obstante, no siempre la cantidad de vectores correlaciona directamente con la magnitud de la epidemia. Pocos vectores pueden ocasionar una manifestación importante de la enfermedad en una región en época determinada o muchos (vectores) pueden ser intrascendentes (Mann et al., 1997). Una de las situaciones que ha dificultado la realización de este tipo de trabajos ha sido la carencia de metodologías precisas para medir esta variable (Forrest, 1997).

Efecto de la inoculación en diferentes estados fenológicos. a) en la severidad; En el Cuadro 3 y la Figura 6 se muestra que las plantas que fueron inoculadas en la etapa fenológica de primera fructificación presentaron síntomas más severos. Interesantemente las plantas que se inocularon en estado de plántula fueron las que mostraron síntomas menos severos.

**Cuadro 3. Comportamiento en severidad en plantas de Chile cuando se inoculó en diferentes etapas fenológicas.**

ETAPAFENOLOGICA	SEVERIDAD	SEPARACIÓN DEMEDIAS DE TUKEY
Fructificación	3.7800	A
Ántesis	2.9300	B
Plántula	2.4100	C

\*Las letras diferentes indican diferencia estadística



**Figura 6. Efecto en los síntomas cuando se inocula al inocula en diferentes etapas fenológicas con TEV**

Si se tiene en cuenta que muchos metabolitos que se han involucrado en mecanismos de defensa contra diferentes tipos de estrés y la producción de tales metabolitos, por ejemplo antivirales, cambia en calidad y cantidad a medida que se da el crecimiento de la planta (Balasubrahmanyam et. al., 2000), en este sentido los resultados nuestros sugieren un comportamiento diferente, que coinciden más con (López-Martínez 2003).

Al inicio de la etapa de fructificación es más importante la traslocación de las reservas almacenadas en las raíces, tallos y hojas hacia los nuevos órganos en crecimiento: semillas y frutos.

La planta movilizará las sustancias que forman parte de sus tejidos (hojas) hacia los frutos, iniciando por las hojas más viejas y luego las intermedias hasta llegar a las más jóvenes, y si esto aún no es suficiente la planta utilizará las reservas almacenadas en los tallos. La orden metabólica es tan fuerte, que la planta puede llegar a perder todo su follaje, pero no sus frutos; aunque sean pequeños estos permanecerán con algunas semillas viables que aseguren la preservación de la especie. Por ello quizá se debilitan algunas defensas como el caso que aquí se comenta. En la concentración viral en las plantas. En cuanto a esta variable no hubo diferencia significativa a. Por lo que las diferencias observadas estrictamente pueden ser producto del azar o error experimental.

Influencia de la temperatura y la H.R. en las diferentes poblaciones de Chile. En general se observó que a una H.R. mayor del 70% y temperaturas entre 17 y 20°C, producen un alto índice de severidad en todas las poblaciones de Chile estudiadas. En Sonora Anaheim se obtuvo un mayor índice de severidad cuando se presentó una temperatura alrededor de los 20°C, y una H.R. relativa mayor del 70%.

En cuanto a la población de Tecamachalco Puebla se mostró insensible a la temperatura y a la humedad relativa. En la población de Yucatán, cuando se presentó una temperatura alrededor de los 18 y 19°C, y una H.R. mayor del 70% se obtuvo un mayor índice de severidad sobre todo cuando la planta se inoculó en la etapa de primera fructificación. En Chilpaya se obtuvo un mayor índice de severidad cuando se presentó una temperatura alrededor de los 17 y 19°C, y una H.R. relativa mayor del 70%. La temperatura tiene efecto sobre el metabolismo de la planta, en el vector y en el virus (Judd et. Al., 1991). Hay casos de inactivación con los cambios de temperatura, tanto en condiciones in vitro como in vivo en virus como el de la marchitez manchada del tomate (TSWV) (Roggero y Pennazio 1996.) Es importante también tener en cuenta que la temperatura puede ser un factor que determine la interacción virus-variedades en un sentido o en otro, es decir, una variedad puede ser resistente a una temperatura pero no a otra (De Jagger, 1977).

## CONCLUSIONES

La dilución viral que más efecto tuvo en las plantas fue la de  $10^{-1}$  (D.O.0.091), y la de menor efecto fue  $10^{-2}$  (D.O.0.072). Las plantas se vieron más afectadas en severidad y concentración viral cuando se inocularon en la etapa de primera fructificación y mostraron una alta severidad cuando se inocularon en etapa de antesis. A una temperatura entre 17 y 20°C y una H.R. mayor de 70% aumenta la severidad en todas las poblaciones excepto en Tecamachalco Puebla.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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 cristata*. *Plant Science* 154:13-21.

2. Francki R., B. Milne R., G., and Hatta T. 1985. Atlas of Plant Viruses. CRC Press. Ratón, Florida, EEUU.
3. Garzón-Tiznado, J. A. Torres-Pacheco, I. Ascencio-Ibáñez J. T. Herrera-Estrella, L., and Rivera-Bustamante, R. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.
4. 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.
5. Hiebert E., Tremaine, J.H. y Ronald, W. 1979. *Phytopathology* 69:1031. [en línea] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/57010067.htm> .
6. Hillje, L. 1996. Dos moscas blancas son suficientes para causar la enfermedad en geminiral en tomate. Simposio Internacional de Mosquita Blanca. Acapulco Gro. México.
7. Jud G.J.R. Whitefield, G.H. and Maw, H.E.L. 1991. Temperature-dependent development and phenology of pepper maggots (Diptera: Tephritidae) associated with pepper and hornshenettle. *Environmental Entomology* 20:1, 22-29
8. Laborde J., A. y Pozo C. 1984. Presente y pasado del chile en México. edit. SARH. México.
9. López-Martínez Nadia A. 2003. Epidemiología de la carga viral y etapa fenológica en la expresión del síndrome ocasionado por el PHV en Chile. Tesis en preparación.
10. 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.
11. Morales Batalla Martha Eugenia. 2001. Búsqueda de resistencia natural contra el virus Jaspeado de tabaco (TEV) en diferentes colectas de Chile. Instituto Tecnológico de Celaya.
12. Nuez F. Gil-Ortega, R. y Costa J. 1996. El cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes. edit. Mundi-Prensa. pp. 133-135, 252 y 276-278.
13. Rodríguez M., R. 1971. Estudio preliminar sobre el mosaico del Chile en la región del Bajío. Tesis. C.P. Chapingo, México. p. 51.
14. Roggero P. Lisa V. Nervo G., and Pennazio. 1996. Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* PI 15225 to tomato spotted wilt tospovirus (TSVW). *Phytopathologia Mediterranea* 35(2):117-120.
15. Shaw J., G. Reichmann M., E., and Hatt D., L. 1962. *Virology* 18:79-88.
16. 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.
17. Torres-Pacheco, I. 1997. Geminivirus involucrados en el rizado amarillo del Chile: interacción entre el PHV y TPV. Tesis Doctoral. Centro de investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato.
18. Vera A., G. 2000. Detección de virus en jitomate (*Lycopersicon lycopersicum*), Chile (*Capsicum annum* L.) y maleza, en los diferentes ambientes de cultivo en México. Tesis de licenciatura. Departamento de Bioquímica. ITC. Celaya Gto.