

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.)

J. L. Anaya-López^{1,2}; Y. Godínez-Hernández^{1,2}; C. I. Muñoz-Sánchez²;
L. Guevara-Olvera²; R. G. Guevara-González²; R. F. Rivera-Bustamante³;
M. M. González-Chavira¹; I. Torres-Pacheco^{1¶}

¹Unidad de Biotecnología del Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Apartado Postal 112, Celaya, Guanajuato, México. (¶Autor responsable) Correo-e: itorresp@hotmail.com

²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Avenida Tecnológico y Antonio García Cubas s/n, Col. FOVISSSTE, Apartado postal 57, Celaya, Guanajuato, México.

³Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato, Carretera Irapuato-León km 9.6, Libramiento Norte, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó la resistencia de individuos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a infecciones simples por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV), así como a infecciones mixtas entre PepGMV y el virus huasteco del chile (PHV). La inoculación de las plantas fue realizada mediante biobalística e injertos. Veinte plantas de siete diferentes colectas de chile habanero fueron inoculadas (140 plantas en total) solamente con el PepGMV; 99 plantas (70.7 %) resultaron asintomáticas a la infección por PepGMV, aunque en ellas se detectó la presencia del virus mediante ELISA y PCR. Aunado a los estudios de resistencia a infecciones simples por PepGMV, se realizaron evaluaciones de la resistencia en estas colectas contra infecciones mixtas por PepGMV y PHV. Para estos estudios, se evaluaron 31 individuos provenientes de las colectas con menor incidencia de infección por PepGMV, resultando 15 individuos (48.4 %) con resistencia en diferente nivel a la infección. La resistencia encontrada en *C. chinense* Jacq. a infecciones mixtas, se agrupó en tres tipos: retraso de síntomas, remisión de síntomas y plantas asintomáticas. Los niveles de ADN viral y la severidad de los síntomas mostrados por las plantas correlacionaron positivamente.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: enfermedad, geminivirus, chile, resistencia natural, ELISA, PCR.

IDENTIFICATION OF RESISTANCE TO SINGLE AND MIXED INFECTIONS OF PEPPER GOLDEN MOSAIC VIRUS (PepGMV) AND THE HUASTECO PEPPER VIRUS IN CHILI PEPPERS (*Capsicum chinense* Jacq.).

SUMMARY

In this study, resistance to single and mixed infections to pepper golden mosaic virus (PepGMV) in *Capsicum chinense* Jacq. individuals were evaluated. Plant inoculation was carried out by biolistics and grafting. To 140 plants from seven accessions of *C. chinense* Jacq., inoculations were performed with PepGMV. Of these plants, 99 were asymptomatic, although the virus was detected by ELISA and PCR techniques. Additionally, resistance to geminivirus (PepGMV and Pepper huasteco virus or PHV) mixed infections, was evaluated in these accessions. Thirty-one plants from the accessions with the best characteristics of resistance to single infections by PepGMV were evaluated, and 15 individuals displayed resistance in different degrees. Resistance to geminivirus mixed infections was grouped as: delayed symptoms, symptom remission and asymptomatic plants. DNA levels of both geminiviruses correlated positively with symptom severity.

ADDITIONAL KEY WORDS: geminivirus, resistance, mixed infection, ELISA, PCR.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del chile en México sufre pérdidas de entre un 20 y un 100 % debidas principalmente a enfermedades de etiología viral, entre las cuales destacan las causadas por geminivirus (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En la naturaleza un solo virus o mezclas de estos se pueden encontrar afectando cultivos; así, infecciones mixtas que involucran geminivirus en México se han encontrado en cultivos como chile, jitomate e incluso malezas (Vera-Aguado *et al.*, 1999). Los geminivirus son virus de plantas con morfología "geminada" al microscopio electrónico, estructura genómica monopartita o bipartita y son transmitidos por insectos del orden Homóptera (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Lazarowitz, 1992). Actualmente en México, 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, antes conocido como virus Texano del chile Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Estos dos geminivirus se han encontrado asociados afectando cultivos de chile en México (Vera-Aguado *et al.*, 1999). Por lo anterior, es necesaria la identificación de fuentes de resistencia en chile contra estos virus. Se han realizado diversos esfuerzos por identificar fuentes naturales de resistencia en chile al PHV con buenos resultados (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Hernández-Verdugo *et al.*, 1998, 2001); no obstante, se requiere también la identificación de fuentes de resistencia al PepGMV solo o en infecciones mixtas junto con el PHV. El objetivo de este trabajo fue la identificación de resistencia natural a PepGMV solo y en mezclas con PHV en colectas de *C. chinense* que en anteriores trabajos han mostrado buena resistencia contra infecciones simples por el geminivirus PHV (Godínez-Hernández *et al.*, 2001). Nuestros resultados, mostraron la identificación de varias fuentes de resistencia a infecciones simples y mixtas por PepGMV; asimismo, se encontró correlación positiva entre el nivel de ADN viral y la severidad de los síntomas en plantas con infección por la mezcla PepGMV-PHV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plantas de *C. chinense* Jacq. provenientes de siete colectas realizadas en el estado de Yucatán, México, fueron utilizadas en este estudio. Las colectas fueron previamente denominadas (Trujillo-Aguirre y Díaz-Plaza, 1995): UX-SMH-1, UX-SMH-5, UX-SMH-18, UX-SMH-22, UX-SMH-24, UX-SMH-26, y UX-SMH-55. Como unidad experimental para este trabajo se consideraron a los individuos y no a las colectas. En todos los experimentos realizados, *Cap-sicum annuum* cv. Sonora Anaheim, el cuál es altamente susceptible a la infección por PepGMV y PHV, fue utilizado como testigo (Torres-Pacheco, 1997). Las colectas que se evaluaron en este trabajo están disponibles en el Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Campo Experimental Bajío, ubicado en: Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, México.

Inoculación de virus

Las plantas fueron inoculadas primero por el método de biobalística utilizando un dispositivo de conducción de micropartículas (modelo PDS 1000; Dupont). Para la inoculación por biobalística, por cada seis plantas se emplearon 2.5 mg de ADN de cada componente (A y B) de los virus PepGMV o de PHV, según si la infección era simple o mixta, y se depositaron sobre la superficie de 3 mg de micropartículas de tungsteno (Sylvania No. 10). Los disparos se realizaron a una distancia en vacío de 1.2 cm y 56.4 kg·cm⁻² de presión (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993). La inoculación se realizó sobre la zona apical de plantas de cuatro-seis hojas verdaderas; las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a una temperatura entre 24 y 32 °C (Godínez-Hernández *et al.*, 2001). Plantas que no mostraron síntomas típicos a los 30 días post-inoculación (DPI), fueron inoculadas por injerto con varetas de plantas de cv. Sonora Anaheim con infección por PepGMV solo o PepGMV y PHV juntos. Cada varetas se verificó previamente mediante PCR (ver abajo) para la presencia de virus antes de realizar el injerto.

Evaluación de la resistencia y detección de geminivirus

Plantas inoculadas por biobalística y/o injerto, se incubaron durante tres meses en el invernadero. Muestras de hojas apicales y basales fueron colectadas a los 11, 21, 31, 45, 59 y 90 DPI. La severidad de la enfermedad fue evaluada cualitativamente utilizando una escala reportada por Torres-Pacheco (1997). En algunos casos, la detección de PepGMV fue mediante ELISA con un juego para detección de geminivirus (Agdia Inc. Elkhart, IN). También se hizo la detección tanto de PepGMV como de PHV mediante PCR, se realizó a partir de extracciones de ADN de muestras de hoja por el método indicado por Dellaporta *et al.* (1983). La detección de cada virus por PCR, con oligonucleótidos específicos siendo para PepGMV: (260) 5' TGG TGT AGG ACT CCA GCA GAG TC 3', y (261) 5' TAG GCC CAC ACC TTG GTG ACC AAG 3'. Para la detección de PHV los oligonucleótidos fueron: (240) 5' GGC TTA TTT GTA ATA AGA GAG GTG T 3' Y (241) 5' GAA TTA AAG GTA CAT GGA CCA CTT 3'. Para el caso de PepGMV se esperaba una banda amplificada de la región común del virus de 200 pb, mientras que para el PHV el tamaño de la banda de la región común del virus era de 350 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Perkin Elmer) y contenían los siguientes componentes: 0.75 µl de cada desoxinucleótidos (2.5 mM), 2 ml de oligonucleótidos (50 ng·µl⁻¹), 0.5 ml de Taq polimerasa (6 U·µl⁻¹), 1 ml de ADN de la planta (100 ng·µl⁻¹) en un volumen de reacción de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación por PCR fueron: para PepGMV 94 °C, 1 minuto; 55 °C, 2 minutos y 72 °C 2 minutos. Para PHV 94 °C, 1 minuto; 55 °C 1 minuto y 72 °C 2 minutos.

Análisis estadístico

Los análisis de varianza y correlación entre niveles de ADN viral en diferentes interacciones de resistencia y severidad de síntomas, fueron realizados mediante el paquete computacional SAS Proc GLM (SAS, Institute, 1990). Los datos fueron transformados a la raíz cuadrada de $x+1$ (x = cada valor de densitometría) para optimizar los análisis.

RESULTADOS

Respuesta fenotípica de colectas de chile habanero a infección simple por PepGMV

La infectividad por PepGMV varió desde un 15 hasta un 50 %. Además, la severidad fue elevada en las plantas que resultaron susceptibles a la infección simple por PepGMV (Cuadro 1). Las plantas que resultaron susceptibles a la infección por PepGMV, presentaron los síntomas en los primeros 5 DPI, estos síntomas se presentaron principalmente en la zona apical, aunque en un lapso de aproximadamente 25 DPI se podían observar perfectamente también en las zonas baja y media de las plantas. Además, se pudo constatar la presencia del virus mediante PCR a partir de muestras de ADN de hojas apicales y basales de las plantas susceptibles (Figura 1).

Por otro lado, aunado a la presencia de plantas susceptibles a PepGMV, se detectaron 99 individuos con ausencia de síntomas, los cuáles mediante la prueba de ELISA mostraron tener al virus (datos no mostrados). Estas plantas se consideraron como tolerantes a la infección por PepGMV; además, en algunos de los individuos tolerantes, los síntomas se visualizaron hasta cerca de los 70 DPI.

CUADRO 1. Porcentaje de plantas infectadas con el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y severidad de síntomas en cada colecta de *Capsicum chinense* Jacq. evaluada.

Colecta	Plantas Infectadas (%)	Severidad (escala 1-10) ²
UX-SMH-1	20	9
UX- SMH-5	50	8
UX- SMH-18	20	7
UX- SMH-22	38	8
UX- SMH-24	38	7
UX- SMH-26	15	8
UX- SMH-55	20	8

²Valores con base en la escala reportada por Torres-Pacheco (1997).

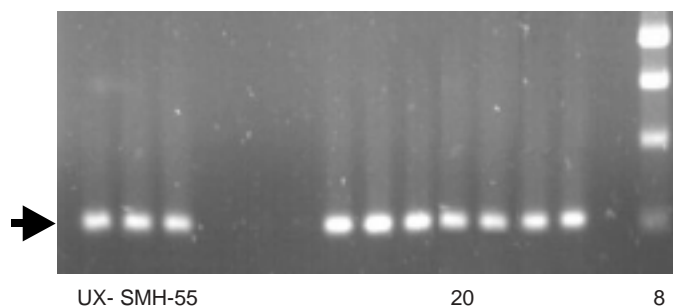


Figura 1. Detección por PCR de la presencia de virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en hojas apicales y basales de plantas de chile habanero. Carriles 1-6 y 7-12 corresponden a muestreos a los 25 y 44 días después de infección, respectivamente. Los carriles 1 al 3 y 7 al 9 son de hojas apicales, y los carriles 4 al 6 y 10 al 12 a hojas basales. Las amplificaciones se realizaron con los oligonucleótidos 260 y 261. La flecha indica la posición en 350 pb.

Respuesta fenotípica en chile habanero a infección mixta por PepGMV y PHV

Se inocularon 31 individuos de diferentes colectas con una mezcla 1:1 de ambos geminivirus. De los 31 individuos inoculados, 16 fueron susceptibles, 12 presentaron remisión de síntomas, dos fueron asintomáticos y una presentó retraso en la aparición de síntomas (Cuadro 2). Asimismo, se evaluó durante 90 DPI la severidad de los síntomas en un individuo tipo de cada interacción observada cuya cinética de severidad fue alta en la planta susceptible y nula en la planta asintomática durante prácticamente todo el período de incubación (Cuadro 2). Asimismo, en la planta con retraso en la aparición de síntomas, éstos se presentaron hasta los 45 DPI; mientras que en la planta con remisión de síntomas, éstos alcanzaron su máximo a los 21 DPI y posteriormente fueron disminuyendo durante el experimento (Cuadro 2).

CUADRO 2. Respuesta fenotípica de colectas de *Capsicum chinense* Jacq. a la infección mixta por virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y virus huasteco del chile PHV así como cinética de la severidad² de síntomas en un individuo tipo de cada interacción encontrada.

Fenotipo	Días Post-inoculación					
	11	21	31	45	59	90
Susceptible ²	2	5	5	5	6	5
Retraso ³ síntomas	0	0	0	3	3	2
Remisión ⁴ síntomas	0	4	2	2	2	1
Asintomática ⁵	0	0	0	0	0	0

²16 plantas susceptibles.

³Una planta con retraso en síntomas.

⁴12 plantas con remisión de síntomas.

⁵Dos plantas asintomáticas.

²Severidad según Torres-Pacheco (1997).

Relación entre niveles de ADN viral y severidad de síntomas

Para determinar si había correlación entre severidad de síntomas y presencia de ADN viral en las plantas inoculadas con la mezcla de PepGMV y PHV, éstas fueron analizadas en cuanto a sus niveles de ADN para PepGMV y PHV en hojas apicales y basales. Con respecto a PepGMV, se encontraron dos grupos estadísticos tanto en hojas superiores como inferiores, siendo el grupo a= plantas susceptibles y el grupo b= plantas asintomáticas, con remisión y retardo en síntomas. El análisis de correlación indicó relación positiva entre severidad de síntomas y niveles de PepGMV en hojas apicales y basales ($r=0.68$ y 0.66 , respectivamente; $P\leq 0.01$) (Cuadro 3).

Para PHV se identificaron tres grupos estadísticos para hojas apicales, siendo estos el grupo a= plantas susceptibles, ab= remisión y retardo en la aparición de síntomas, y b= plantas asintomáticas. Por otro lado, para hojas basales se identificaron 2 grupos estadísticos siendo estos, a= plantas susceptibles y b= remisión, retardo y asintomáticas. Como en el caso de PepGMV, con PHV se presentó correlación positiva entre severidad de síntomas y niveles de ADN en hojas apicales y basales ($r=0.70$ y 0.78 , respectivamente; $P\leq 0.01$).

CUADRO 3. Promedio de los niveles de ADN viral, y severidad de síntomas en plantas de chile habanero expresando cuatro respuestas fenotípicas a infecciones mixtas por virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y virus huasteco del chile (PHV).

Fenotipo	Promedio ² de Niveles de ADN Viral				Total ³	Severidad ⁴
	Apical		Basal			
	PHV	PepGMV	PHV	PepGMV		
Susceptible	28.02 a ^w	13.31 a	7.79 a	15.44 a	26.04 a	2.36 a
Retraso en Síntomas	5.69 ab	2.93 b	2.17 b	4.70 b	7.38 b	1.62 b
Remisión de Síntomas	5.91 ab	3.47 b	3.77 b	3.58 b	9.57 b	1.46 b
Plantas Asintomáticas	1.90 b	1.33 b	2.31 b	2.64 b	3.69 b	1.0 c

²Promedio de seis observaciones.

³ADN total de PepGMV y PHV (suma de PepGMV+PHV).

⁴Promedio de seis observaciones. Valores de acuerdo a Torres-Pacheco (1997).

^wValores en cada columna seguidos por letras diferentes (a, b or c), indican que son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P\leq 0.01$.

^vLos niveles de ADN viral están expresados en unidades de densitometría integradas.

Finalmente, considerando la suma del ADN de PepGMV y PHV tanto en hojas apicales como basales, se identificaron 2 grupos estadísticos, siendo estos a= plantas susceptibles y b= plantas asintomáticas, así como con remisión y retraso en síntomas. El análisis de correlación para este último caso indicó una mayor relación entre los niveles de ADN viral y la severidad de los síntomas ($r=0.84$, $P\leq 0.01$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron la presencia de individuos de *C. chinense* Jacq. con características de resistencia a infecciones simples por PepGMV o mixtas por PepGMV y PHV (Cuadros 1 y 3). El número de respuestas fenotípicas encontradas en las plantas analizadas, fue mayor para infecciones mixtas por PepGMV y PHV que para infecciones simples por PepGMV. Estos resultados podrían sugerir que mientras más partículas virales se tienen en la infección de plantas como las analizadas en este estudio, se obtienen mayor número de respuestas fenotípicas. Por otro lado, resultó evidente en todos los casos evaluados en infecciones mixtas por geminivirus, que la severidad de los síntomas estaba estrechamente asociada con los niveles de ADN viral. Estos resultados están en concordancia con los datos encontrados por otros autores en la identificación de fuentes de resistencia natural en Chile contra PHV (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998, 2001).

Los individuos con resistencia encontrados son excelentes recursos genéticos con los cuales se realizan estudios sobre la genética de la resistencia y su futura incorporación en programas de mejoramiento del cultivo de Chile.

CONCLUSIONES

Se identificaron individuos de Chile habanero con características de resistencia a infecciones simples por PepGMV y mixtas por PepGMV y PHV.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por financiamiento del Sistema de Investigación Miguel Hidalgo (SIHGO) (1998-0201018), CONCYTEG (98-09-01-049), International Foundation for Science (AC/11325) y CONACYT (K325-P9702 y J31638-B) a I. Torres-Pacheco y R.G. Guevara-González. J.L. Anaya-López y Y. Godínez-Hernández, agradecen por las becas obtenidas a COSNET, SIHGO e International Foundation for Science (AC/11325).

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 1990. SAS/STAT user's guide. Version 6. 4 th ed. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21.
- 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 53: 514-521.

- GODÍNEZ-HERNÁNDEZ, Y.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; DÍAZ-PLAZA, R.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F.; TORRES-PACHECO, I.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers (*Capsicum chinense*) from Yucatán, México. *HortScience* 36(1): 139-142.
- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. 1999. Geminiviruses: Models for plant replication, transcription, and cell regulation. *Critical Review Plant Sciences* 18: 71-106.
- HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F.; OYAMA, K. 1998. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Boletín Sociedad Botánica de México* 62: 171-181.
- HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F.; OYAMA, K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31-36.
- LAZAROWITZ, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Review of Plant Sciences* 11: 327-349.
- LOAIZA-FIGUEROA, F.; RITLAND, K.; LABORDE-CANSINO, J. A.; TANKSLEY, S.D. 1989. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in México. *Plant Systematics and Evolution* 165:159-188.
- PICKERSGILL, B. 1984. Migration of chili peppers, *Capsicum* spp. in the Americas, pp. 105-123. *In: Papers of the Peabody Museum of Archeology and Ethnology*. D. Stone (ed.). Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA.
- TORRES-PACHECO, I. 1997. Geminivirus involucrados en el rizado amarillo del chile: Interacciones entre PHV y TPV. Tesis doctoral; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato. México.
- TORRES-PACHECO, I.; GARZÓN-TIZNADO, J. A.; BROWN, J. K.; BECERRA-FLORA, A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.
- TRUJILLO-AGUIRRE, J.; DÍAZ-PLAZA, R. 1995. Obtención de cultivares de chile habanero con resistencia a virosis transmitida por mosca blanca IV. Taller latinoamericano sobre moscas blancas y geminivirus. Zamorano, Honduras.
- VERA-AGUADO, M. G.; DÍAZ-PLAZA, R.; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.; GARZÓN-TIZNADO, J. A.; RIVERA-BUSTAMANTE, R. F.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; TORRES-PACHECO, I. 1999. Detección de virus en tomate (*Lycopersicon esculentum*), chile (*Capsicum annuum*), y malezas en diferentes ambientes en México: Avances. VIII Congreso Nacional de Horticultura, Manzanillo, Colima, México. p. 132.