

DETECCIÓN DE GEMINIVIRUS ASOCIADOS A LA ALSTROEMERIA

(*Alstroemeria* L.) EN VILLA GUERRERO, ESTADO DE MÉXICO

Lourdes Cervantes-Díaz, Emma Zavaleta-Mejía, Reina Isabel Rojas-Martínez, Iobana Alanís-Martínez, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Ernestina Valadez-Moctezuma y Onécimo Grimaldo-Juárez

RESUMEN

En plantaciones de *alstroemeria* (*Alstroemeria* L.) de Villa Guerrero, Estado de México, se han detectado plantas con síntomas similares a los inducidos por geminivirus en otros cultivos hortícolas. En dichas plantaciones también se ha observado la presencia de la mosquita blanca, considerada como el vector más eficiente de estos virus. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de geminivirus en plantas de *alstroemeria*. Mediante PCR, usando los iniciadores MotCP2118/MotCP2123, se obtuvo un segmento de ~600pb, similar al del control positivo correspondiente a Chile infectado con el begomovirus pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV, antes pepper huasteco virus) en plantas sintomáticas, mientras que en las asintomáticas la detección fue negativa. Plantas de *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. *xanthi* y *Datura* stra-

monium inoculadas por biobalística con ADN total obtenido de *alstroemerias* con síntomas y positivas a PHYVV mediante PCR, mostraron mosaicos leves y deformación de hojas, mientras que en plantas de *Capsicum annuum* se observaron mosaicos, necrosis en nervaduras y abultamientos en hojas. Con el ADN de estas plantas también se obtuvieron bandas correspondientes al PHYVV, pero en las monocotiledóneas bombardeadas, incluyendo *alstroemeria*, no fue detectado el fragmento. La secuencia de oligonucleótidos de los productos de PCR mostró 98% de homología con el begomovirus PHYVV. Aunque no fue posible reproducir en *alstroemeria* los síntomas observados en campo, sí se evidenció mediante PCR la presencia de un geminivirus similar al PHYVV en tejido de plantas sintomáticas.

Introducción

La *alstroemeria* (*Alstroemeria* L.), planta ornamental monocotiledónea, comenzó a ser cultivada en México a principios de 1990 en Villa Guerrero, Estado de México. Las enfermedades inducidas por virus constituyen los problemas fitopatológicos más serios en la producción de esta ornamental (Bellardi y Bertaccini, 1996; Spence *et al.*, 2000). A la fecha en este cultivo se tienen consignados 13 virus pertenecientes a ocho géneros taxonómicos, pero no geminivirus. Daughtrey *et al.* (1997) señalan que especies de virus pertene-

cientes al género *Tospovirus* y la familia Geminiviridae (Damsteegt, 1999) han impactado de manera significativa a las principales especies florícolas desde la década pasada. En especies ornamentales, se han reportado nueve geminivirus: *abutilon mosaic virus* (AbMV), *acalypha yellow mosaic virus* (AYMV), *ageratum yellow vein virus* (AYVV), *croton yellow vein mosaic virus* (CYVMV), *eupatorium yellow vein virus* (EpYVV), *euphorbia mosaic virus* (EuMV), *honeysuckle yellow vein mosaic virus* (HYVMV), *tobacco leaf curl virus* (TLCV) y *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Al-

bou y Devergne, 2000). La familia Geminiviridae comprende cuatro géneros (*Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Begomovirus* y *Topocovirus*) que se diferencian en base a su genoma monopartita o bipartita, el tipo de hospedante (monocotiledónea o dicotiledónea) e insecto vector involucrado (de las familias Cicadellidae, Membracidae o Aleyrodidae) (Hanley *et al.*, 1999; Pringle, 1999; Hull, 2002). Respecto a esto último, la cápside viral es de fundamental importancia porque participa en el reconocimiento que determina la especificidad y adquisición del virus. La adquisición de los

geminivirus requiere del reconocimiento de las partículas víricas a nivel de diferentes dominios de la proteína de la cápside, situados en la extremidad N-terminal, por receptores específicos localizados en las glándulas salivales accesorias presentes en la mosquita blanca (Liu *et al.*, 1997a). La cápside también participa en el movimiento intra e intercelular, y en consecuencia influye en la especificidad para que un geminivirus pueda infectar a monocotiledóneas o dicotiledóneas (Soto y Gilbertson, 2003); sin embargo, se ha documentado que el género *Mastrevirus* infecta tanto monocotiledóneas

PALABRAS CLAVE / *Alstroemeria* / Biobalística / Detección / Geminivirus / Ornamentales / PCR /

Recibido: 11/03/2009. Modificado: 24/11/2009. Aceptado: 26/11/2009.

Lourdes Cervantes-Díaz. Doctora en Ciencias, Colegio de Postgraduados (COLPOS), Montecillo, México. Profesora-Investigadora, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), México. Dirección: Instituto de Ciencias Agrícolas, UABC. Carretera Blvd. Delta s/n. Ejido Nuevo León, Valle de Mexicali. C.P. 21705, Mexi-

cali, Baja California, México. e-mail: lourdescervantesdiaz@yahoo.com

Emma Zavaleta-Mejía. Ph.D en Fitopatología, Riverside University, EEUU. Profesora-Investigadora, COLPOS, México.

Reina Isabel Rojas-Martínez. Doctora en Ciencias, COLPOS, México. Profesora-Investigadora, COLPOS, México.

Iobana Alanís-Martínez. Ingeniera Agrónoma, Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México. Asistente Técnico, COLPOS, México.

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez. Doctor en Ciencias. COLPOS, México. Profesor-Investigador, COLPOS, México.

Ernestina Valadez-Moctezuma. Doctora en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesora-Investigadora, UACH, México.

Onécimo Grimaldo-Juárez. Doctor en Ciencias, COLPOS, México. Profesor-Investigador, UABC, México.

DETECTION OF GEMINIVIRUS ASSOCIATED TO ALSTROEMERIA (*Alstroemeria* L.) IN VILLA GUERRERO, STATE OF MEXICO

Lourdes Cervantes-Díaz, Emma Zavaleta-Mejía, Reina Isabel Rojas-Martínez, Iobana Alanís-Martínez, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Ernestina Valadez-Moctezuma and Onécimo Grimaldo-Juárez

SUMMARY

In *alstroemeria* (*Alstroemeria* L.) plantations located in Villa Guerrero, Mexico State, plants with symptoms similar to those induced by geminivirus in other horticultural crops have been detected. In addition, the presence of whiteflies, which are considered the most efficient vectors of these viruses, has been observed in these plantations. The goal of this work was to detect the presence of this geminivirus species in *alstroemeria* plants. By means of PCR analysis using primers MotCP2118/MotCP2123, a fragment of ~600pb similar to the amplicon obtained from PHYVV-infected positive control was amplified only from symptomatic plants. *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. *xanthi* and *Datura stramonium* plants were inoculated by bombardment with total DNA ob-

tained from symptomatic *alstroemerias* and positive to PHYVV by means of PCR. Inoculated plants showed mild mosaics and deformation of leaves, whereas in the leaves of *Capsicum annum* plants, mosaics, vein necrosis and blisters were observed. Using DNA from these plants as template in PCR, amplicons corresponded to PHYVV were also obtained; however, in bombarded monocotyledons, including *alstroemeria*, this fragment was not detected. The sequence of oligonucleotides from the PCR products showed 98% homology to PHYVV geminivirus. Even though symptoms presented by *alstroemeria* plants in the field were not reproduced, the presence of a geminivirus similar to PHYVV in tissue of symptomatic plants was evidenced through PCR.

DETECÇÃO DE GEMINIVÍRUS ASSOCIADOS A ALSTROEMERIA (*Alstroemeria* L.) EM VILLA GUERRERO, ESTADO DO MÉXICO

Lourdes Cervantes-Díaz, Emma Zavaleta-Mejía, Reina Isabel Rojas-Martínez, Iobana Alanís-Martínez, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Ernestina Valadez-Moctezuma e Onécimo Grimaldo-Juárez

RESUMO

Em plantações de *alstroemeria* (*Alstroemeria* L.) de Villa Guerrero, Estado do México, se tem detectado plantas com sintomas similares aos induzidos por geminivírus em outros cultivos hortícolas. Em ditas plantações também tem sido observada a presença da mosquinha branca, considerada como o vetor mais eficiente destes vírus. O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de geminivírus em plantas de *alstroemeria*. Mediante PCR, usando os iniciadores MotCP2118/MotCP2123, obteve-se um segmento de ~600pb, similar ao do controle positivo correspondente a chile infectado com o begomovírus *pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV, antes *pepper huasteco virus*) em plantas sintomáticas, enquanto que nas assintomáticas a detecção foi negativa. Plantas de *Nicotiana glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. *xanthi* e *Datura*

stramonium inoculadas por biobalística com DNA total obtido de *alstroemerias* com sintomas e positivas a PHYVV mediante PCR, mostraram mosaicos leves e deformação de folhas, enquanto que em plantas de *Capsicum annum* se observaram mosaicos, necrose em nervaduras e protuberâncias em folhas. Com o DNA destas plantas também se obtiveram bandas correspondentes ao PHYVV, mas nas monocotiledóneas bombardeadas, incluindo *alstroemeria*, não foi detectado o fragmento. A sequência de oligonucleotídeos dos produtos de PCR mostrou 98% de homologia com o begomovírus PHYVV. Embora não foi possível reproduzir em *alstroemeria* os sintomas observados em campo, sim foi evidenciada, mediante PCR, a presença de um geminivírus similar ao PHYVV em tecido de plantas sintomáticas.

como dicotiledóneas (Morris *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997b).

Hasta 1992 no se había detectado en América la presencia de geminivirus en monocotiledóneas (Brown y Bird, 1992), pero en 2002 se consignó a la monocotiledónea *Sorghum halepense* (zacate johnson), como un hospedante alternativo de los geminivirus *pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV, antes conocido como *pepper huasteco geminivirus*) y *texas pepper tamaulipas strain* (texano del chile variante tamaulipas ahora denominado *pepper golden mosaic virus*)

en la región centro de México (Garzón *et al.*, 2002).

Síntomas foliares como abultamientos, enchinamientos y enrollamientos, reducción del área foliar, enanismo, epinastia, mosaico amarillo brillante, moteado clorótico y clorosis foliar interna o de los márgenes, son síntomas frecuentemente asociados con la infección por geminivirus en diferentes plantas hospedantes (Brown y Bird, 1992; Torres *et al.*, 1996). En México, distintos geminivirus transmitidos por mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn. o *B.*

argentifolli Bellows y Perring) son reportados como agentes causales de estos síntomas en diferentes zonas productoras de chile, frijol, jitomate, okra, tomatillo, tabaco y calabaza (Torres *et al.*, 1996; Anaya *et al.*, 2003). Actualmente no se tienen registros de geminivirus infectando *alstroemeria* en México y en el mundo; no obstante, no se descarta la posibilidad de que alguno de ellos esté presente en plantas sintomáticas de *alstroemeria* en la región de Villa Guerrero, Estado de México. Los síntomas observados desde

1999 en este cultivo consisten en deformación (enrollamientos) y clorosis en los márgenes o en la parte interna de las hojas y mosaicos amarillos brillantes. Asimismo, la presencia de mosca blanca, siendo las especies *Bemisia tabaci* y *B. argentifolli* consideradas como vectores eficientes de estos virus (Brown y Bird, 1992; Wisler *et al.*, 1998), es común en el cultivo. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de geminivirus en ejemplares de esta planta ornamental con los síntomas mencionados.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se recolectaron muestras de tejido (~100g de hojas y tallos obtenidos de los estratos inferior, medio y superior) de plantas de alstroemeria, tanto asintomáticas como con síntomas, en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México. Las recolecciones se realizaron en enero, marzo, abril, junio, septiembre, noviembre y diciembre de 2002 y mensualmente de enero a mayo 2003 y de enero a noviembre 2004. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Transmisión por injerto

En los meses de marzo, abril y mayo de 2004, 15 plántulas de alstroemeria y chile (*Capsicum annum* L.), de dos meses de edad y provenientes de semilla, fueron injertadas con ápices de tallos (3-5cm de longitud) de alstroemeria con síntomas. Las plántulas se mantuvieron aisladas dentro de una jaula entomológica en invernadero, a 27 ±3°C. Como testigos negativos se tuvieron cinco plantas de cada especie sin injertar. Las plantas injertadas que mostraron síntomas de origen viral se utilizaron para injertar a un segundo grupo de 15 plantas de alstroemeria provenientes de semilla y de cuatro meses de edad. A los 45 días después de realizado este injerto las plantas fueron analizadas mediante PCR para confirmar la presencia de geminivirus.

Identificación de mosquitos blancos y reproducción de síntomas en invernadero

En los meses de marzo y agosto de 2002 a 2004 se colectaron hojas e inflorescencias de alstroemeria con síntomas y que tenían ninfas de mosquitos blancos. La identificación de las especies de mosquito blanca se realizó con las claves de Martín (1987) y su identidad fue confirmada por Laura Delia Ortega Arenas,

del Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, México. Para las pruebas de transmisión, en 15 plantas de alstroemeria y chile obtenidas a partir de semillas, se colocaron 10 adultos de mosquitos blancos de las colectadas en campo, y cada plántula se colocó individualmente en una jaula. Un total de 300 insectos, confinados en grupos de 10 por jaula, se alimentaron por siete días sobre las plántulas sanas con el fin de transmitir a posibles geminivirus. Después de este periodo, los insectos de cada planta fueron capturados y ~80% de ellos fueron analizados mediante PCR para detectar la presencia de geminivirus. El resto se utilizó para la identificación de la especie. Las plantas se mantuvieron en observación en invernadero (27 ±3°C) en una jaula entomológica y a las 12 semanas fueron analizadas mediante PCR.

Transmisión por biobalística

Cinco plantas (con 6-8 hojas verdaderas) de 11 especies (*Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum* var. xanthi, *N. rustica*, *N. glutinosa* y *N. benthamiana*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Zea maiz*, *Allium sativum* y *Alstroemeria* sp.) fueron inoculadas por biobalística con un acelerador Du Pont (PDS-1000), usando 50µl de micropartículas de tungsteno (Tungsten M-10, BIORAD) mezcladas con 5µl de ADN total (1µl·l⁻¹), obtenido a partir de plantas de alstroemeria con síntomas y en las que mediante PCR se había evidenciado la presencia de geminivirus. En cada planta el bombardeo se realizó en la parte apical, a una distancia de 2cm y 57kg·cm⁻² de presión (Garzón *et al.*, 1993). Los controles consistieron de dos plantas de cada especie inoculadas con agua o con ADN extraído de plantas de alstroemerias asintomáticas en las que la amplificación por PCR fue negativa. Las plantas bombardeadas, se mantuvieron en una cámara bioclimática a

28 ±1°C y luz blanca hasta observar la expresión de síntomas. El ensayo se realizó en los meses de agosto y noviembre de 2004 y enero de 2005. Las plantas que presentaron síntomas fueron analizadas mediante PCR para detectar la presencia de geminivirus.

Detección de TSWV y AIMV

Debido a que los virus *tomato spotted wilt virus* (TSWV) y *alstroemeria mosaic virus* (AIMV) fueron reportados previamente en México en la planta ornamental motivo de este estudio (Gutiérrez *et al.*, 2000), de enero a noviembre 2004 se recolectaron mensualmente en campo muestras de tejido de alstroemeria con síntomas, para detectar su presencia mediante ELISA-DAS (Clark y Adams, 1977). También se realizó la detección en plantas inoculadas por injerto y por biobalística. Se emplearon antisueros obtenidos de Agdia Inc., para TSWV (Lote 1476) y AIMV (Lote 0008).

Extracción del ácido nucleico viral y detección de geminivirus mediante PCR

A partir de hojas y tallos de cada una de las muestras de alstroemeria recolectadas en el campo, así como de las plantas sometidas a pruebas de transmisión por injerto y por biobalística, y de los testigos negativos, se llevó a cabo la extracción de ADN según la técnica descrita por Dellaporta *et al.* (1983). La concentración y calidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Lambda Bio 10, Perkin Elmer) a 260nm y promedio de absorbancia a 260/280nm, respectivamente. Se utilizaron los iniciadores MotCP2118 (CC GAA TTC GAC TGG ACCTA CAT GGN CCT TCA C) y MotCP2123 (GAG TCT AGA GGS TAN GTG/AAG/G AAA TAA/G TTC TTG GC) que amplifican un segmento de 0,65kb del componente A de geminivirus, y que incluye la región común y parte del

gen de la proteína de la cápside (Ascencio *et al.*, 2002). La mezcla de reacción final para PCR consistió de 120ng de ADN molde, 250µM de cada trifosfato de deoxinucleótido, 1mM de cada iniciador, 10µl de buffer de reacción para PCR (10X), MgCl₂ 5mM y 2.5u/ml de ADN polimerasa (Amplificasa®, Biotecnologías Universitarias). La PCR se realizó en un termociclador automático (GeneAmp 2400, Perkin-Elmer). Como testigo negativo se utilizó ADN proveniente de plantas de alstroemeria asintomáticas y como testigo positivo ADN amplificado de plantas de chile infectadas con el *pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), proporcionado por Rafael Rivera Bustamante, del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, México.

Los productos de PCR (10µl) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, se tiñó con bromuro de etidio (0,5µg·ml⁻¹) y se visualizó en un transiluminador UV (Gel-Doc 2000, BIORAD). La longitud de los fragmentos obtenidos se comparó con el marcador de peso molecular 1kb ADN (GIBCO BRL).

Secuenciación

El producto de PCR fue purificado (Qiagen Co., Hilden, Alemania) y la secuenciación de nucleótidos se realizó en el laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Biología y Prototipos, FES-Iztacala, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias obtenidas se compararon con información disponible en la base de datos GenBank y con el paquete BLAST (<http://WWW.INCB.BLAST>).

Resultados

Detección de geminivirus mediante PCR

Con los iniciadores MotCP2118/MotCP2123 se amplificó un segmento de ~600pb (Figura 1, carriles 2

y 3) similar al control positivo (Figura 1, carriles 14 y 15) correspondiente a chile infectado con PHYVV. La detección fue positiva tanto en plantas sintomáticas colectadas en campo como en las dicotiledóneas inoculadas por biobalística (*C. annuum*, *N. tabacum* var. *xanthi*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana* y *D. stramonium*; Figura 1, carriles 4-9); pero no en las monocotiledóneas, incluyendo alstroemeria (carril 10). Cabe aclarar que no en todas las plantas con síntomas se logró amplificar el fragmento correspondiente (Tabla I) y que tampoco en las plantas injertadas se detectó el fragmento del geminivirus. También se detectó una banda del mismo peso en solo un grupo (de 10 individuos) de mosquita blanca utilizado en las pruebas de transmisión (Figura 1, carril 12), pero la planta que sirvió de hospedante no desarrolló síntomas ni presentó reacción positiva con PCR (carril 11).

Secuenciación

El fragmento de ADN amplificado con los iniciadores MotCP2118/MotCP2123 (número de acceso: AY044162.1) al ser comparados con las secuencias registradas en el GENBANK, mostraron 98% de homología con parte de la región común y del gen de la proteína de la cápside del PHYVV. Tales resultados sugieren que el aislamiento de geminivirus detectado en alstroemeria se relaciona probablemente con el PHYVV. La secuencia de nucleótidos de un fragmento obtenido con los mismos iniciadores a partir de ADN de mosquitas blancas provenientes de campo y utilizadas en las pruebas de transmisión, también mostró una homología del 98% con el PHYVV.

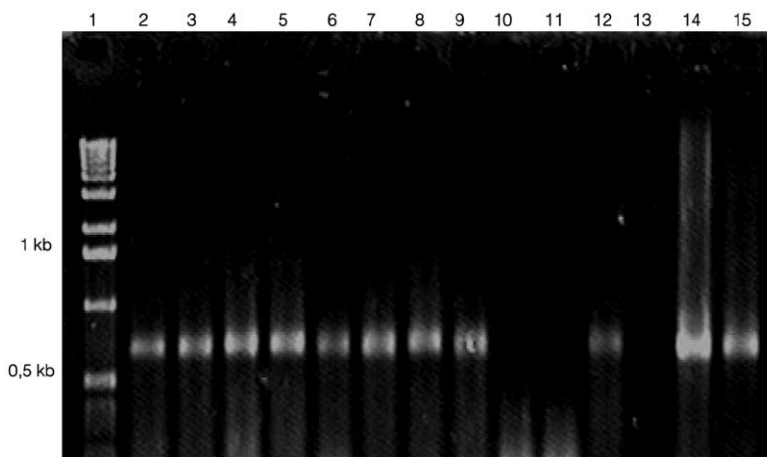


Figura 1. Fragmentos de ~600pb amplificados mediante PCR con el par de iniciadores MotCP2118/MotCP2123. Carriles: 1) marcador 1Kb ADN (GIBCO BRL®); 2 y 3) plantas de alstroemerias con síntomas colectadas en campo; 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) plantas de *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*, *N. rústica*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *D. stramonium* y *Alstroemeria*, respectivamente, inoculadas por biobalística con ADN total obtenido de plantas de alstroemeria con síntomas en las cuales se obtuvo mediante PCR un fragmento de ADN de 600pb; 11) alstroemeria utilizada para transmisión con insectos; 12) mosquitas blancas utilizadas para las pruebas de transmisión; 13) alstroemeria (control negativo); 14 y 15) testigo positivo (chile infectado con *pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV).

Transmisión

En el 60% (27/45) de las plantas de alstroemeria injertadas se observó mosaico y moteado amarillo a las cinco semanas de realizadas las pruebas. En Chile, el 100% de las plantas presentó mosaicos y deformación de hojas a las cuatro semanas. Las plantas de ambas especies utilizadas como testigo no desarrollaron síntomas ni fueron positivas para los virus TSWV y AIMV (prueba de ELISA) y geminivirus (PCR). Los sínto-

mas de enrollamiento, clorosis interna o en márgenes de las hojas y mosaico amarillo brillante, presentes en los tallos enfermos que se injertaron como fuente de inóculo y que se mantuvieron vivos sobre el portainjerto durante cinco días, no se presentaron en ninguna de las plantas injertadas. El 20% de las plantas de alstroemeria provenientes de semilla y que fueron injertadas con segmentos de plantas de alstroemeria o Chile que expresaron síntomas en la primera prueba de transmisión

por injerto, desarrollaron mosaicos y ligera deformación en hojas apicales, pero ninguna dio respuesta positiva por ELISA o PCR. Los resultados sugieren que los síntomas pudieron haber sido inducidos por otro patógeno.

La inoculación por biobalística no indujo síntomas en plantas de *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Alstroemeria* sp., *A. cepa* y *Z. maíz* (Tabla I). En cambio, a las seis semanas de realizada la inoculación, en *D. stramonium*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* var. *xanthi* y *N. rustica* se observaron síntomas de mosaicos leves y deformación ligera en las nuevas hojas emergentes (Figura 2, a y b), mientras que en las plantas de Chile fue solo a las ocho semanas que se desarrollaron síntomas típicos inducidos por geminivirus como mosaicos, aclaración o necrosamiento de venas, abultamientos severos en hojas y acortamiento de entrenudos con deformación de hojas (Figura 2c, d y e). Como se mencionó antes, en estas plantas la detección de geminivirus por PCR fue positiva. En cambio, en las plantas testigo no se desarrollaron síntomas ni se detectó la presencia de los virus TSWV y AIMV con la técnica de ELISA o geminivirus mediante PCR.

TABLA I
DETECCIÓN DE GEMINIVIRUS MEDIANTE PCR EN PLANTAS INOCULADAS POR BIOBALÍSTICA CON ADN TOTAL EXTRAÍDO DE PLANTAS DE ALSTROEMERIA CON SÍNTOMAS Y QUE PRESENTARON RESPUESTA POSITIVA A GEMINIVIRUS MEDIANTE PCR

Especie inoculada	Nº plantas con síntomas/ Nº plantas inoculadas	Resultados de PCR ^ε	Síntoma observado [§]
<i>Capsicum annuum</i>	6/15	6/6	M, NN, ASH
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	3/15	2/3	ML, DL
<i>N. rustica</i>	3/15	1/3	ML, DL
<i>N. glutinosa</i>	1/15	1/1	ML, DL
<i>N. benthamiana</i>	1/15	1/1	ML, DL
<i>Datura stramonium</i>	1/15	1/1	ML, DL
<i>Chenopodium quinoa</i>	0/15	0/1	SS
<i>Ch. Amaranticolor</i>	0/15	0/1	SS
<i>Zea mayz</i>	0/15	0/1	SS
<i>Allium sativum</i>	0/15	0/1	SS
<i>Alstroemeria</i> sp.	0/15	0/1	SS

^ε Plantas positivas a geminivirus con iniciadores MotCP2118/ MotCP2123/total de plantas procesadas.

[§] M: mosaico, NN: necrosamiento de nervaduras, ASH: abultamiento severo en hojas, ML: mosaico leve, DL: deformación ligera, SS: sin síntomas.

Identificación de mosquitas blancas y transmisión de síntomas en invernadero

En el cultivo de alstroemeria se encontró únicamente a la especie *Trialeurodes vaporariorum* (West), la cual hasta la fecha no ha sido consignada como vector del PHYVV. Los insectos utilizados para las pruebas de transmisión en invernadero correspondieron a la mis-



Figura 2. Síntomas inducidos por geminivirus transmitidos por biobalística en plantas diferenciales. Mosaico y deformación en hojas (indicada por flechas) en *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (a) y *N. rustica* (b); mosaico y necrosamiento de nervaduras y moteado necrótico y abultamiento en hojas (indicados por flechas) en *Capsicum annuum* (c y d). En e se muestran dos plantas de *C. annuum*; la de la izquierda presenta acortamiento de entrenudos con deformación en hojas apicales (indicado por flecha), y la de la derecha es una planta testigo asintomática, inoculada con ADN de alstroemeria.

ma especie. No obstante, no se descarta la posibilidad de que otras especies de mosquita blanca puedan estar presentes en otras plantas ornamentales, árboles frutales o maleza no muestreadas, o en los meses en los que no se recolectaron insectos.

En ninguna de las plantas de alstroemeria y chile utilizadas para las pruebas de transmisión con mosquita blanca se manifestaron síntomas, y tampoco se detectó mediante PCR la presencia de geminivirus a las 12 semanas de realizadas las pruebas. De los 30 grupos de mosquita blanca

(10 por grupo) utilizados para las pruebas de transmisión, solo en uno (3%) se obtuvieron por PCR fragmentos de ~600pb, idénticos al control positivo.

Detección de TSWV y AIMV

La detección de ambos virus mediante DAS-ELISA en plantas de alstroemeria con síntomas fue negativa en todos los muestreos realizados de 2002 a 2004. Tampoco en las plantas hospedantes utilizadas en las pruebas de transmisión por injerto y biobalística se detectó la presencia de estos virus.

Discusión

A partir de ADN obtenido de plantas sintomáticas de alstroemeria recolectadas en campo se amplificaron segmentos de ADN que aparentemente corresponden al geminivirus PHYVV. El PHYVV ha sido reportado desde 1993 en México (Garzón *et al.*, 1993) y en la actualidad se encuentra distribuido ampliamente en distintos estados de México (Torres *et al.*, 1996; Guevara *et al.*, 1999; Idris *et al.*, 1999).

Los resultados negativos para geminivirus y los virus TSWV y AIMV obtenidos mediante PCR y ELISA, respectivamente, en plantas de alstroemeria inoculadas por injerto y que mostraron síntomas, sugieren que los síntomas observados podrían deberse a la presencia de otros virus de ARN previamente detectados en la misma zona de estudio (Gutiérrez *et al.*, 2000). También De la Torre *et al.* (2002) al realizar, mediante injerto a distintos hospedantes, la caracterización de un geminivirus en plantas

de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B), solo detectaron la presencia de los virus mosaico del pepino (CMV), del tabaco (TMV), jaspeado del tabaco (TEV), marchitez manchado del tomate (TSWV) y mancha anular del tabaco (TRSV), pero no de geminivirus. Se menciona que la multiplicación y distribución de los virus de ARN es competitivamente más exitosa que la de los que presentan genomas de ADN (Hull, 2002). Los virus con genoma de ARN se multiplican inicialmente en el citoplasma de las células del mesófilo de las hojas y después en casi cualquier tipo de célula,

al dispersarse por el resto de la planta; en cambio, los geminivirus se multiplican en el núcleo y después se ubican solo en células del floema (Hanley *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 1999).

En ninguna de las plantas monocotiledóneas, incluyendo alstroemeria, inoculadas por biobalística se observó el desarrollo de síntomas; éstos fueron evidentes solamente en las plantas de chile y tabaco, aunque su expresión requirió de varias semanas, aún cuando ambas especies son los principales hospedantes naturales de este género de virus (Anaya *et al.*, 2003). El reducido número de plantas inoculadas que desarrollaron síntomas y que por PCR resultaron positivas para el geminivirus, pudo deberse a que se utilizó ADN total procedente de plantas de alstroemerias infectadas, en lugar de ADN viral infectivo clonado en un plásmido; esto último garantiza que se inoculan al mismo tiempo los componentes virales A y B para que se lleve a cabo el proceso infeccioso. Garzón *et al.* (1993), reportan que plantas de chile bombardeadas con solo uno de los componentes (A o B) clonados del geminivirus PHYVV, no desarrollaron síntomas, ni tampoco pudieron detectar al virus en sus tejidos por métodos moleculares (PCR o hibridación). Para el caso de geminivirus bipartitas, una parte de su genoma (componente B) codifica para proteínas involucradas en la traslocación del virus a partir del sitio de inoculación al resto de las células. En cambio en los geminivirus monopartitas, todos los genes involucrados en la infección (replicación y traslocación) se localizan en una sola molécula de ADN (Palmer y Rybicki, 1998; Hanley *et al.*, 1999).

La amplificación de partes de la región intergénica y del gen de la proteína de la cápside de geminivirus con los iniciadores MotCP2118/MotCP2123, generó un fragmento de 600pb y la secuencia de nucleótidos de este fragmento indicó un porcentaje de identidad del 98% con parte de la región común

y del gen de la proteína de la cápside (AR1) del PHYVV. Estos resultados indican que el begomovirus PHYVV podría estar presente en las plantas de alstroemeria. Tal geminivirus ha sido frecuentemente reportado como el causante de infecciones en casi todas las zonas productoras de hortalizas en México (Torres *et al.*, 1996; Anaya *et al.*, 2003).

La mosquita blanca que se colectó en los cultivos de alstroemeria correspondió a la especie *T. vaporariorum*, la cual no se ha reportado como vectora del PHYVV (Hull, 2002). Lo anterior podría explicar la ausencia de síntomas y el resultado negativo de las pruebas de PCR en las plantas utilizadas para las pruebas de transmisión por insectos. Por otro lado, el hecho de haber amplificado un fragmento de 600pb a partir de un solo grupo (de 10 individuos) de mosquita blanca utilizado en las mismas pruebas, sugiere que *T. vaporariorum* podría adquirir el virus al alimentarse en alstroemeria, pero esto no garantiza que sea capaz de transmitirlo. Se ha reportado que la adquisición de geminivirus por *B. tabaci* no es específica y que otras especies de mosquitas blancas los pueden adquirir pero no transmitirlos (Cohen *et al.*, 1989); en cambio, la inoculación al hospedante sí es una relación virus-vector específica (Hanley *et al.*, 1999). Por otra parte, en ninguno de los muestreos se colectaron individuos de la especie *B. tabaci*, que es el principal vector del PHYVV. Se menciona que la presencia de esta especie se limita a altitudes no mayores de 1000msnm (Morales y Jones, 2004), mientras que la zona donde se realizó el presente estudio se ubica a 2095msnm.

Hasta 1992 no se había consignado la presencia de geminivirus en monocotiledóneas en América o el Caribe (Brown y Bird, 1992). Una década después Garzón *et al.* (2002) consignaron a la monocotiledónea *Sorghum halepense* (zacate johnson) como un hospedante alternativo de los geminivirus PHYVV y del *pepper golden mosaic virus*, en la región central de México. Las especies de

geminivirus del género *Mastrevirus* generalmente infectan plantas monocotiledóneas (Palmer y Rybicki, 1998); sin embargo, los mastrevirus *tabacco yellow dwarf virus* en Australia (Morris *et al.*, 1992) y el *bean yellow dwarf virus* en Suráfrica (Liu *et al.*, 1997a) infectan dicotiledóneas. Esto sugiere que el PHYVV, perteneciente al género *Begomovirus*, generalmente asociado solo con plantas dicotiledóneas, también podría tener como hospedantes a monocotiledóneas.

Conclusión

Aunque no fue posible reproducir en alstroemeria los síntomas observados en campo, sí se evidenció mediante PCR la presencia de un geminivirus similar al PHYVV en tejido de plantas con síntomas recolectadas en campo. Futuros estudios enfocados en completar la caracterización molecular de aislamientos de geminivirus detectados en alstroemeria son necesarios para conocer la relación planta-patógeno, como hospedantes alternos para este género de virus de importancia ecológica y económica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca de doctorado otorgada y al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California por el tiempo destinado para la redacción final del documento e institución de trabajo del primer autor.

REFERENCIAS

Albouy J, Devergne JC (2000) *Enfermedades Producidas por Virus de las Plantas Ornamentales*. Mundi Prensa. Madrid, España. 496 pp.

Anaya LJI, Torres PI, González CM, Garzón TJA, Pons HJL (2003) Resistance to geminivirus mixed infections in mexican wild peppers. *HortScience* 38: 251-255.

Ascencio IJT, Argüello ARG, Méndez LJ, Rivera BFR (2002) First report of Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Dis.* 86: 692.

Bellardi MG, Bertaccini A (1996) Recenti indigini sulle infezioni virali dell'astroemeria in Italia. *Italus Hort.* 2: 32-38.

Brown JK, Bird J (1992) Whitefly-transmitted geminivirus and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Dis.* 76: 220-225.

Clark MF, Adams NA (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Cohen S, Duffus EJ, Liu YH (1989) Acquisition, interference and retention of cucurbit leaf curl viruses in whiteflies. *Phytopathology* 79: 109-113.

Daughtrey LM, Jones RK, Moyer JW, Daub ME, Baker JR (1997) Tospovirus strike the greenhouse industry. *Plant Dis.* 81: 1220-1230.

Damsteegt VD (1999) New and emerging plant viruses. Research Plant Pathology. USDA. Colloquium APS/CP. Montreal, Canada, August 8-11. www.army-medicine.army.mil/usda/ (Cons. 21/02/2009).

Dellaporta SJ, Wood J, Hicks BJ (1983) A plant DNA miniprep, version II. *Plant Mol. Biol.* 19: 21.

De la Torre AR, Valverde R, Méndez LJ (2002) Preliminary characterization of a geminivirus in tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) in the central region of México. *Agrociencia* 36: 471-481.

Garzón TJA, Torres PI, Ascencio IJT, Herrera EL, Rivera BFR (1993) Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.

Garzón TJA, Acosta GG, Torres PI, González CM, Rivera BFR, Maya HV, Guevara GRG (2002) Presencia de los geminivirus, huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T), y chino del tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 45-52.

Guevara GRG, Ramos PL, Rivera BFR (1999) Complementation of coat protein mutants of pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 89: 540-545.

Gutiérrez EA, Zavaleta-Mejía E, Gaytán AEA, Herrera GJA, Mora AG (2000) Virus associated with *Alstroemeria* in México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17: 97-103.

Hanley BL, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 71-106.

Hull R (2002) *Matthews' Plant Virology*. 4ª ed. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. 1001 pp.

Idris AM, Lee SH, Brown JK (1999) First report of chino del tomate and pepper huasteco geminivirus in greenhouse-grown tomato in Sonora, México. *Plant Dis.* 83: 396.

Liu S, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG (1997a) Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J. Gen. Virol.* 78: 1791-1794.

Liu L, van Tonder T, Pietersen G, Davies JW, Stanley J (1997b) Molecular characterization of a subgroup I geminivirus from a legume in South Africa. *J. Gen. Virol.* 78: 2113-2117.

Martín JH (1987) An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera:Aleyrodidae). *Trop. Pest Manag.* 33: 298-322.

Morales JF, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res.* 100: 57-85.

Morris BAM, Richardson KA, Haley A, Zhan X, Thomas JE (1992) The nucleotide sequence of the infectious cloned ADN component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. *Virology* 187: 633-642.

Palmer KE, Rybicki EP (1998) The molecular biology of Mastrevirus. *Adv. Virus Res.* 50: 183-234.

Pringle CR (1999) Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sidney, Aust. *Arch. Virol.* 144: 2065-2070.

Rosell RC, Torres PI, Brown JK (1999) Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology* 89: 239-246.

Soto MJ, Gilbertson RL (2003) Distribution and rate of movement of the curtovirus Beet Curly top virus (family Geminiviridae) in the beet leafhopper. *Phytopathology* 93: 478-484.

Spence JN, Peter RM, Dez JB (2000) A survey of viruses of alstroemeria in the UK and the characterization of carlaviruses infecting alstroemeria. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 843-847.

Torres PI, Garzón TA, Brown KJ, Becerra FA, Rivera BFR (1996) Detection and distribution of geminiviruses in México and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

Wisler GC, Duffus EJ, Liu YL, Li HR (1998) Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closterovirus. *Plant Dis.* 82: 270-280.