

INCIDENCIA DEL VIRUS MOSAICO DE LA ALFALFA EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO (*CAPSICUM CHINENSE* JACQ.) EN YUCATÁN, MÉXICO

José M. Tun Suárez,¹ Emma Zavaleta Mejía,¹ Daniel L. Ochoa Martínez,¹ Prometeo Sánchez García,¹ Marcos Soto Hernández¹ y Jairo Cristóbal Alejo²

¹ Colegio de Postgraduados. Km 35,5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. México, CP 56230

² Instituto Tecnológico de Conkal. Km 16,3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán, CP 97345

RESUMEN

Se determinó la incidencia del virus mosaico de la alfalfa (AMV) por medio de la técnica ELISA-DAS en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de las variedades Criolla y Elsa en Yucatán. La mayor frecuencia de AMV se detectó en los embriones de las semillas de ambas variedades. En plántulas de la variedad Elsa se detectó el doble de incidencia del AMV (80%) que la registrada en la Criolla (40%). La incidencia de AMV en plántulas estuvo directamente relacionada con la incidencia que se registró en los embriones de las semillas.

Palabras claves: *Capsicum chinense*, virus mosaico de la alfalfa, transmisión por semilla

ABSTRACT

The incidence of alfalfa mosaic virus (AMV) in seeds and seedlings of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) of varieties Criolla and Elsa of Yucatán, was determined by ELISA-DAS technique. The highest frequency of AMV was present in seeds embryos of both varieties. The incidence of AMV was twice as much in Elsa seedlings (80%) than that registered for Criolla (40%). AMV incidence in seedlings was directly related with the incidence registered in the seed embryos.

Key words: *Capsicum chinense*, alfalfa mosaic virus, seed transmission

INTRODUCCIÓN

El virus mosaico de la alfalfa (AMV) es la especie tipo del género *Alfamovirus* de la familia *Bromoviridae*. Es un virus multiparticulado y presenta tres moléculas de ARN en sentido positivo, de cadena sencilla (csARN) encapsidados en viriones baciliformes. Una cuarta molécula de ARN está contenida en una partícula isométrica codificada para la proteína de la capsida [Matthews, 1991; Šutia et al., 1999; Fleysh et al., 2001; Bol, 2003].

El AMV se transmite de manera no persistente por más de quince especies de áfidos entre los que se encuentran *Acyrtosiphon pisum*, *A. solani*, *Aphis craccivora*, *A. fabae*, *A. medicaginis*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus ligustri*, *M. persicae* y *Phorodon cannabidis*. Este virus también se transmite a través de las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y algunas malezas como *Datura stramonium* L., *Solanum nigrum* L., *Chenopodium quinoa* Wild. y posiblemente *Melilotus* spp. El porcentaje de transmisión en semillas comerciales de chile (*Capsicum annuum* L.) oscila de 1 a 69% [Šutia et al., 1999]. Las

plantas de chile provenientes de semillas infectadas con AMV retardan su crecimiento, y presentan escasa floración y amarre de fruto [Jaspars y Bos, 1980; Brunt et al., 1990; Šutia et al., 1999].

La transmisión del AMV por semilla está asociada a la infección del embrión. El virus presente en la testa y en el endospermo puede inactivarse durante el proceso de maduración, almacenamiento y deshidratación de la semilla, de ahí que la transmisión por este medio está determinada por la invasión directa o indirecta del embrión y por la sobrevivencia del virus durante la formación de la semilla, almacenamiento y germinación [Johansen et al., 1994].

En Yucatán se detectó en el 2003 la presencia del AMV en plantaciones de chile habanero de las variedades Criolla y Elsa. La presencia de AMV no estuvo asociada con altas poblaciones de áfidos vectores [Tun et al., inédito], lo que sugirió que su presencia podría explicarse por contaminación de la semilla provista por las compañías semilleras.

La presente investigación se realizó con el propósito de determinar el porcentaje de transmisión del AMV en semillas de chile habanero de las variedades Criolla y Elsa (*C. chinense*) y conocer la incidencia del AMV en la testa, endospermo y embrión de las semillas de estas variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Testa, endospermo y embrión. Se incubaron 120 semillas de cada una de las variedades Criolla y Elsa en placas Petri de 10 cm de diámetro sobre papel de filtro no.2 por 48 h. El papel se humedeció previamente con 5 mL de amortiguador de extracción (300 mg de albúmina de huevo, 195 mg de Na_2SO_3 , 300 mg de PVP-40, 3 mL de Tween-20; aforado a 150 mL con PBSt 1X (4 g de NaCl; 0,58 g de Na_2HPO_4 ; 0,1 g de KH_2PO_4 ; 0,1 g de KCl; 0,25 mL de Tween-20, aforado con agua destilada a 1 L) para ablandar la testa. De cada variedad se tomaron cinco grupos (repeticiones) de 20 semillas y se disectaron en testa, endospermo y embrión con ayuda de una pinza de relojero y un bisturí bajo un microscopio estereoscópico 4X. De cada estructura de la semilla se extrajo el virus por maceración en 2 mL de amortiguador de extracción para realizar la prueba de ELISA-DAS.

Semillas y plántulas. Se pusieron a germinar 100 semillas de cada variedad en contenedores de poliestireno de 200 cavidades, rellenas con el sustrato a base de turba de Sphagnum de origen canadiense. El contenedor se cubrió con una malla antiáfidos para prevenir el contacto con posibles vectores de virus. A los 58 días de germinadas se tomaron 50 plántulas de cada variedad y de cada una se colectó 0,1 g de tejido de la parte aérea, y se extrajo la savia con la adición de 2 mL de amortiguador de extracción para detectar la presencia de AMV mediante la prueba de ELISA-DAS.

Detección de AMV. La presencia o ausencia de AMV en plántulas y semilla (testa, endospermo y embrión) se determinó con la prueba de ELISA con la variante de sándwich de doble anticuerpo ELISA-DAS [Clark y Adams, 1977] para fosfatasa alcalina. Se utilizaron controles positivos, negativos y anticuerpos. Los valores de absorbancia de cada muestra se obtuvieron en un fotocolorímetro automático, a una longitud de onda de 405 nm. La reacción se consideró positiva cuando la lectura fue mayor al valor promedio de los controles negativos más dos veces la desviación estándar [Sutula *et al.*, 1986]. Los resultados de densidad óptica de las pruebas de ELISA-DAS se sometieron a análisis de

varianza y comparación múltiple de medias con ayuda del paquete estadístico SAS versión 6.12 (1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia de AMV en testa, endospermo y embrión de semillas de chile habanero

La presencia de AMV se detectó en los embriones de las semillas de las variedades Criolla y Elsa, en endospermos de la Criolla y en las testas de la Elsa. La mayor frecuencia de muestras positivas al AMV y concentración viral ($\text{DO}_{405\text{nm}}$) se registró en los embriones de la variedad Elsa, seguido de los embriones y endospermos de Criolla y testas de Elsa. Las muestras de embriones y testas de la variedad Elsa detectadas positivas provinieron de un total de 60 semillas. Para la variedad Criolla las muestras positivas de endospermos y embriones resultaron de 80 semillas (*Tabla 1*).

La incidencia del AMV registrada en la variedad Elsa fue superior a las reportadas en semillas de chile (de 1 a 69%), alfalfa (de 1 a 46%), trébol egipcio (*Trifolium alexandrinum* L., de 60 a 70%) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L., de 0,2 a 6%) [Frosheiser, 1974; Jaspars y Bos, 1980; Mishra *et al.*, 1980; Brunt *et al.*, 1990; Šutić *et al.*, 1999].

Asimismo la transmisión de semilla atribuible a la contaminación de la superficie o testa fue baja. Esto pudiera deberse a que las partículas del virus no son suficientemente estables para resistir los factores inherentes de la deshidratación, cosecha y almacenaje de la semilla; y el virus viable entrará en contacto con la plántula solo si ocurre la inoculación mecánica durante el transplante o manejo [Johansen *et al.*, 1994].

Incidencia de AMV en plántulas y semillas de chile habanero

El AMV se detectó en plántulas de ambas variedades de chile habanero, y fue significativamente mayor la concentración viral ($\text{DO}_{405\text{nm}}$) en la variedad Elsa. La incidencia del AMV en la variedad Elsa fue el doble de la registrada en la variedad Criolla con 40%; sin embargo, a pesar de que esta variedad presentó una mayor incidencia de AMV, su porcentaje de germinación fue mayor (80%) en comparación con la Criolla 60% (*Tabla 2*).

La relación entre el porcentaje de plántulas y la incidencia de semillas infectadas con AMV fue de 40% en la variedad Criolla y de 80% en la variedad Elsa. El porcentaje de plántulas infectadas con AMV y la incidencia de semillas con AMV sugiere que la transmisión

del virus por semilla está asociada con la infección del embrión, pues cuando se presenta en testa y endospermo puede inactivarse durante el proceso de maduración, almacenamiento y deshidratación de la semilla. Por ejemplo, en las variedades Maris Kabul y Europe de

alfalfa el porcentaje de semillas infectadas con AMV disminuye durante la maduración de la semilla de 59 a 6,9%, y de 75 a 1,7%, respectivamente [Hemmati y McLean, 1977; Pesic y Hiruki, 1986; Mink, 1993; Johansen *et al.*, 1994; Maude, 2000].

Tabla 1. Frecuencia y concentración relativa (DO_{405nm}) de alfalfa mosaic virus (AMV) en testa, endospermo y embrión de semillas de chile habanero de las variedades Criolla y Elsa

Variedad	Testa (DO _{405nm}) ^b	Endospermo (DO _{405nm})	Embrión (DO _{405nm})
Criolla	0/5 ^a	2/5	2/5
1	0,099	0,099	0,112
2	0,106	0,117 ^c	0,111
3	0,104	0,128 ^c	0,092
4	0,098	0,113	0,116 ^c
5	0,098	0,099	0,122 ^c
Elsa	1/5	0/5	3/5
1	0,099	0,107	0,136 ^c
2	0,113	0,107	0,127
3	0,109	0,100	0,101
4	0,115 ^c	0,108	0,124 ^c
5	0,105	0,110	0,106 ^c
Negativos			
1	0,093	0,102	0,108
2	0,098	0,093	0,106

^a: Número de muestras positivas/total de grupos de semillas.

^b: (DO_{405nm}): Valores de densidad óptica.

^c: Muestra positiva basada en la media de los valores de las lecturas de las muestras negativas (DO_{405nm} 0,1) más dos veces la desviación estándar (0,0128) = 0,113 DO_{405nm}.

Tabla 2. Porcentaje de germinación, incidencia, concentración relativa (DO_{405nm}) y detección de alfalfa mosaic virus (AMV) por la prueba ELISA-DAS en plántulas de chile habanero de las variedades Criolla y Elsa

Variedad	Semillas sembradas	Germinación (%)	Plántulas			
			Analizadas	AMV + ^a	DO _{405nm} ^x	Detección (%)
Criolla	100	60	50	20	0,115 ^y b	40
Elsa	100	80	50	40	0,123 a	80

^a: Reacción positiva a AMV. Desviación estándar = 0,0146, r² = 0,546, CV = 12,29.

^x: Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

^y: Muestra positiva basada en la media de los valores de las lecturas de las muestras negativas (DO_{405nm} 0,1) más dos veces la desviación estándar (0,0128) = 0,113 DO_{405nm}.

La reducción en el porcentaje de detección (40%) registrado en la variedad Criolla, que fue el doble de la variedad Elsa, sugiere que la diferencia en porcentajes obedece a los efectos de los procesos sufridos por las semillas en su desarrollo, maduración, limpieza y secado que se traduce en valores representativos de su ca-

pacidad germinativa, vigor y contenido de humedad. Estos factores aunados a las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) de conservación influyen sobre la viabilidad de la semilla [Moreno, 1984; Besnier, 1989; Egli, 1998; Hernández-Verdugo *et al.*, 2001].

CONCLUSIONES

- Las semillas de chile habanero de las variedades Elsa y Criolla presentaron 60 y 40% de transmisión de virus mosaico de la alfalfa (AMV), respectivamente.
- En el embrión de las semillas de ambas variedades se detectaron las mayores frecuencias de muestras positivas y concentración viral de AMV (DO_{405nm}) en relación con el endospermo y testa.
- En la variedad Elsa se presentó la mayor incidencia de plántulas positivas al AMV.

REFERENCIAS

- Besnier, R. F.: «Almacenamiento y conservación», *Semillas, biología y tecnología*, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1989.
- Bol, J. F.: «Alfalfa Mosaic Virus: Coat Protein-Dependent Initiation of Infection», *Molecular Plant Pathology*, 4:1-8, 2003.
- Brunt, A.; K. Crabtree; A. Gibbs: *Viruses of Tropical Plants*, CAB international Redwood Press, Melksham, Wiltshire, Wallingford, Oxon, Inglaterra, 1990.
- Clark, M. F.; A. N. Adams: «Characteristics of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses», *Journal General of Virology*, 34:475-483, 1977.
- Egli, D. B.: «Seed Growth Rate and Seed Fill Duration: Variation and Regulation», *Seed Biology and the Yield of Grain Crops*, CAB International, Wallingford, Oxon, Inglaterra, 1998.
- Fleysh, N.; D. Deka; M. Drath; H. Koprowski; V. Yusibov: «Pathogenesis of Alfalfa Mosaic Virus in Soybean (*Glycine max*) and Expression of Chimeric Rabies Peptide in Virus-Infected Soybean Plants», *Phytopathology*, 91: 941-947, 2001.
- Frosheiser, F. I.: «Alfalfa Mosaic Virus Transmission to Seed Trough Alfalfa Gametes and Longevity in Alfalfa Seed», *Phytopathology*, 64:102-105, 1974.
- Jaspars, E. M. J.; L. Bos: «Alfalfa Mosaic Virus», *Descriptions of Plant Viruses*, vol. III, Cambrian News, Wales, 1980.
- Johansen, E.; M. C. Edwards; R. O. Hampton: «Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives», *Annual Review Phytopathology*, 32:363-386, 1994.
- Hemmati, K.; D. L. McLean: «Gamete – Seed Transmission of Alfalfa Mosaic Virus and Its Effect on Seed Germination and Yield in Alfalfa Plants», *Phytopathology*, 67:576-579, 1977.
- Hernández-Verdugo, S.; K. Oyama; C. Vázquez-Yanes: «Differentiation in Seed Germination Among Populations of *Capsicum annuum* Along a Latitudinal Gradient in México», *Plant Ecology*, 155:245-257, 2001.
- Matthews, R. E. F.: *Plant Virology*, Academic Press Inc., San Diego, California, EE.UU., 1991.
- Maude, R. B.: *Seedborne Diseases and Their Control, Principles and Practice*, CAB International, Wallingford, Inglaterra, 2000.
- Mink, G. I.: «Pollen and Seed Transmitted Virus and Viroids», *Annual Review of Phytopathology*, 31:375-402, 1993.
- Mishra, M. D.; S. P. Raychaudhuri; A. Ghosh; R. D. Wilcoxson: «Berseem Mosaic, a Seed-Transmitted Virus Disease», *Plant Disease*, 64:490-492, 1980.
- Moreno, M. E.: «La humedad de las semillas, su importancia y medición», *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*, Ed. UNAM, México, 1984.
- Pesic, Z.; C. Hiruki: «Differences in the Incidence of Alfalfa Mosaic Virus in Seed Coat and Embryo of Alfalfa Seed», *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8:39-42, 1986.
- Šutia, D. D.; R. E. Ford; M. T. Tošić: *Handbook of Plant Virus Diseases*, CRC Press LLC, Boca Ratón, Florida, EE.UU., 1999.
- Sutula, C. L.; J. M. Guillet; S. M. Morrissey; D. C. Ramsdell: «Interpreting ELISA data and Establishing the Positive-Negative Threshold», *Plant Disease*, 70:722-726, 1986.