

DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE *Jatropha curcas* L., EN CHIAPAS, MÉXICO

DETECTION OF BEGOMOVIRUS IN PLANTS OF *Jatropha curcas* L., IN CHIAPAS, MEXICO

Gallegos-Gómez, E.H.¹; Salvador-Figueroa M.¹; Torres-de los Santos R.^{1*}

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Instituto de Biociencias. Boulevard Príncipe Akishino S/N, Colonia Solidaridad 2000, Tapachula, Chiapas, México.

*Autor de correspondencia: rtdelossantos@gmail.com



ABSTRACT

The Mexican pine (*Jatropha curcas* L.) is the most promising non-edible plant for the biofuel industry in the world. The state of Chiapas, south of Mexico, inhibits high diversity of genotypes, with differences in agronomic traits such as greater number of floral events, high production and oil quality of its seeds. Despite such agronomic traits, it is susceptible to *Jatropha* mosaic disease (JMD), caused by begomovirus (*Geminiviridae*). In this study, we reported the presence of begomovirus related to *Jatropha* mosaic disease by visual detection in five populations of Tapachula, Chiapas, Mexico. The observed symptoms were mosaics, curls and leaf malformations. The presence of begomoviruses associated with JMD was confirmed by PCR obtaining 88% of positive samples to the infection and only 12% were healthy plants. In addition, the molecular detection allowed to observe that 16 asymptomatic samples were positive to the infection. The dependence between the symptoms of JMD and the presence of begomovirus was significant. This work represents the first report of begomovirus infecting *Jatropha curcas* L. plants in southern Mexico.

Keywords: Bioenergetic crops, Mexican pine, virical DNA, south of Mexico.

RESUMEN

El piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) es la planta no comestible más prometedora para la industria de biocombustibles en el mundo. El estado de Chiapas, al sur de México, presenta alta diversidad de genotipos, con diferencias en rasgos agronómicos como mayor número de eventos florales, alta producción y calidad del aceite de sus semillas. A pesar de dichos rasgos agronómicos, es susceptible a la enfermedad del mosaico de *Jatropha* (EMJ), causada por begomovirus (*Geminiviridae*). Mediante detección visual, en este estudio se caracterizó la sintomatología reportada para la enfermedad del mosaico de *Jatropha* en cinco poblaciones de Tapachula, Chiapas, México; los síntomas observados fueron mosaicos, enrollamientos y malformaciones foliares. Se confirmó la presencia de begomovirus asociados a la EMJ, mediante PCR obteniendo 88% de muestras positivas a la infección y solo el 12% fueron plantas sanas. En adición, la detección molecular permitió observar que 16 muestras asintomáticas fueron positivas a la infección. La dependencia entre los síntomas de la EMJ y la presencia de begomovirus fue significativa. Este trabajo representa el primer reporte de begomovirus infectando plantas de *Jatropha curcas* L. en el sur de México.

Palabras clave: Cultivos bioenergéticos, piñón mexicano, ADN vírico, sur de México.



INTRODUCCIÓN

Los begomovirus son fitopatógenos que poseen un genoma circular de ADN de cadena simple (ssDNA) constituido por una (monopartito) o dos (bipartito) partículas, DNA-A y DNA-B, de 2.6 a 2.8 kb, protegidos por la cápsula en partículas gemelas, cuasi-icosahédricas (Stanley *et al.*, 2005; Fauquet *et al.*, 2008). Este género es transmitido, principalmente, por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Faria y Nava, 2009), es un grupo causante de enfermedades y de alta incidencia, en diversas plantas dicotiledóneas en todo el mundo (Stanley *et al.*, 2005; Melgarejo *et al.*, 2013; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Los síntomas más frecuentes asociados a estos patógenos son mosaicos, deformaciones y enanismo (Faria y Nava, 2009; Navas-Castillo *et al.*, 2011). El uso de técnicas moleculares ha permitido la detección confiable y precisa de begomovirus en tomate (Faria y Nava, 2009; Garrido-Ramirez y Gilbertson, 1998), yuca (Hong *et al.*, 1993; Zhuo *et al.*, 1997), papaya (Chang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) y *Jatropha* spp. (Ramkat *et al.*, 2011; Narayana *et al.*, 2006, 2007; Raj *et al.*, 2008).

El piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.), es un arbusto leñoso de la familia Euphorbiaceae, cuyo centro de origen y diversificación posiblemente es la región mesoamericana (Heller, 1996; Carels, 2009). Prácticamente todas las partes de esta planta son utilizadas con fines medicinales e industriales (Dahake *et al.*, 2013), destacando como cultivo bioenergético (Heller, 1996). Sin embargo, es susceptible a infecciones begomovirales (JMV), incluyendo la Enfermedad del Mosaico de *Jatropha*

Cuadro 1. Poblaciones de *Jatropha curcas* L. colectadas en el municipio de Tapachula, Chiapas, México.

Localidad	Clave	Latitud (Norte)	Longitud (Oeste)	Precipitación media anual (mm) (INEGI, 2006)
Felipe Carrillo Puerto	FCP	15° 0' 40.58"	92° 11' 20.51"	4500
Veinte de Noviembre	VNV	14° 58' 36.10"	92° 15' 39.82"	4000-4500
Manga de clavo	MCL	14° 57' 21.01"	92° 16' 21.34"	3000-4000
Álvaro Obregón	ALO	14° 56' 42.26"	92° 23' 24.35"	2000-2500
Raymundo Enriquez	REQ	14° 52' 45.58"	92° 21' 59.73"	1500-2000

(EMJ) (Narayana *et al.*, 2007) que se caracteriza por presentar síntomas tales como: aborto de frutos (Narayana *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010), enanismo (Narayana *et al.*, 2007; Raj *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010), mosaico amarillo-verde, enrollamiento, malformación y la reducción de tamaño foliar (Narayana *et al.*, 2006, 2007; Raj *et al.*, 2008) y por lo tanto, disminuyen la producción de frutos al afectar la eficiencia fotosintética de la planta (Narayana *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010).

Actualmente, se sabe que la EMJ es causada por la infección de diferentes cepas de begomovirus en diversas partes del mundo; en India se han reportado dos cepas del JMV (Narayana *et al.*, 2007), una cepa del virus del mosaico de *Jatropha* de India (JMIV) (Snehi *et al.*, 2012), una cepa del virus del enrollamiento foliar de *Jatropha* de India (JL-CrIV) (Srivastava *et al.*, 2014) y una cepa del virus del mosaico amarillo foliar de *Jatropha* de Katarniaghat (JLYMKV) (Srivastava *et al.*, 2015). Sin embargo, en México no se han reportado síntomas asociados a EMJ y tampoco la presencia de begomovirus causando infecciones en piñón. Por lo que el objetivo de este estudio fue detectar la presencia de begomovirus en plantas de *Jatropha curcas* L. en Tapachula, Chiapas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y detección visual de la enfermedad del mosaico de *Jatropha* (EMJ)

50 accesiones totales de cinco poblaciones de *Jatropha curcas* en Tapachula, Chiapas, México fueron colectadas (Cuadro 1). Por cada zona se contabilizó el número de plantas con síntomas característicos de la EMJ.

Extracción de ADN y detección molecular de begomovirus

Las hojas fueron maceradas con nitrógeno líquido y la extracción de ADN se realizó con la técnica de Doyle y Doyle (1990), con las siguientes modificaciones: 200 mg del macerado fueron colocados en tubos de 2 mL. Se agregaron 60 mg de polivinilpirolidona y 900 μ L de buffer de extracción CTAB 2X (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 2 % p/v; EDTA, 5 mM; NaCl, 5M; Trizma Base, 50 mM, pH ajustado a 8.0 con HCl y 2-mercaptoetanol, 1 % v/v). Posteriormente, se aplicó una extracción orgánica con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y el ADN se precipitó con isopropanol 70 % frío. La pastilla de ADN fue re-suspendida en 60 μ L de Buffer Low TE 1X.

Para la detección de virus se utilizó un par de oligonucleótidos universales específicos para begomovirus:

PA y PB: PA, TAATATTACCKGWKGVCCSC; PB, TGGA-CYTTRCAWGGBCCTTCACA (Deng et al., 1994), que amplifican un fragmento de la región central del gen CP de dicho género de ~550 pb (Deng et al., 1994; Raj et al., 2008).

Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador Techne (Techne, TC 3000, Cambrige, UK). La PCR se estableció en una mezcla de reacción de 25 μ l que contenía: Colorless GoTaq[®] flexi buffer (5X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (50 μ M), oligonucleótidos (0.2 μ M, cada uno), GoTaq[®] DNA Polymerase (1.5 U) y ADN molde (100 ng). Las mezclas de reacción fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación (desnaturalización inicial: 94 °C por 5 min; posteriormente, desnaturalización: 94 °C por 45 s; alineamiento específico: 58 °C por 45 s y extensión: 72 °C por 1.5 min; extensión final: 72 °C por 5 min). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.2%. La banda amplificada se documentó utilizando una cámara digital en el equipo Gel DocTM EZ Imager (BioRad, EU).

Análisis estadístico de dependencia entre variables

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre las variables: presencia de síntomas de EMJ con infección por begomovirus se utilizó el análisis no paramétrico de distribución conjunta o tabla de contingencia, mediante la herramienta InfoStat[®]. Los datos uti-

lizados fueron los obtenidos en la detección visual de la EMJ y la detección molecular de begomovirus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección visual de la enfermedad del mosaico de *Jatropha* (EMJ)

La sintomatología foliar de la EMJ observada en poblaciones de piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.), con excepción del sitio VNV, fueron mosaicos, enrollamientos y deformaciones en hojas e inflorescencias (Figura 1).

Los resultados obtenidos en Tapachula, Chiapas, son similares a los descritos en Asia y África por diversos estudios (Narayana et al., 2006, 2007; Raj et al., 2008; Gao et al., 2010; Ramkat et al., 2011; Snehi et al., 2012; Srivastava et al., 2014; Srivastava et al., 2015). La ocurrencia de síntomas de EMJ en el sureste de México fue diferencial entre las poblaciones, siendo ALO fue la más afectada (100%) y la población VNV la menos afectada (0%) (Cuadro 2).

Estos síntomas, y otros que no encontramos en este estudio, se han asociado a begomovirus como agentes causales de la enfermedad por diversas técnicas inmunológicas y moleculares en Etiopía, Kenia e India (Narayana et al., 2006, 2007; Raj et al., 2008; Gao et al., 2010; Ramkat et al., 2011; Snehi et al., 2012; Srivastava et al., 2014, 2015).

Detección molecular de begomovirus

La presencia de begomovirus se detectó en las cinco poblaciones de *Jatropha curcas* L. (Figura 2).

El porcentaje de detección de begomovirus en ALO y VNV fue del 100%; en REQ y MCL de 90 %; mientras que en FCP fue del 60 % (Cuadro 2).

El porcentaje de infección (presencia del begomovirus) varió en todas las poblaciones evaluadas, y los valores fueron similares a los observados por Ramkat et al., (2011) en plantas sintomáticas de Etiopía y Kenia. Los resultados obtenidos, evidencian que la incidencia de begomovirus en Tapachula, Chiapas fue dos veces mayor a lo reportado en trabajos realizados por Narayana et al., (2006) en India,



Figura 1. Síntomas de la Enfermedad del Mosaico de *Jatropha* observados en Tapachula, Chiapas, México. a) *Jatropha curcas* L. b) Planta sana c) Mosaico d) Enrollamiento e) Deformación foliar.

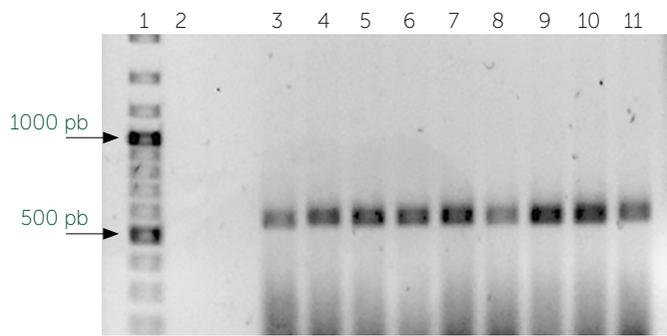


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de los productos de PCR observando bandas de ~550 pb obtenidas con los iniciadores PA/PB: PA, TAATATTACCKGWKGVCCSC; PB, TGGACYTTRCAWGGBCCTT-CACA (Deng *et al.*, 1994) del ADN aislado de hojas de *Jatropha curcas* L. en Tapachula, Chiapas, México. 1=Marcador de Peso Molecular O' Gene Ruler 100 pb (Fermentas); 2=Testigo Negativo; Muestras de FCP (3, con síntomas; 4, sin síntomas); Muestras de VNV (5, con síntomas; 6, sin síntomas); Muestras de MCL (7, con síntomas; 8, sin síntomas); Muestras de REQ (9, con síntomas; 10, sin síntomas); 11=Muestra de ALO (con síntomas).

donde se encontraron valores de incidencia de hasta 47%. Como se observa en el Cuadro 2, de las cinco poblaciones estudiadas, FCP presentó menor incidencia de begomovirus (80%), lo cual puede deberse a una posible relación entre el fenotipo asociado a la enfermedad del mosaico de *Jatropha* (EMJ) y las condiciones climáticas de la región (4500 mm). Además, este estudio encontró que existen poblaciones de *J. curcas* L. que no evidencian síntomas de la EMJ como lo es la localidad VNV, similar a lo reportado por Narayana *et al.*, (2007), donde encontraron nula sintomatología de EMJ en plantas de

las poblaciones del distrito de Mandya, India. Es posible que las accesiones asintomáticas pero positivas por PCR se hayan encontrado en una etapa temprana de la infección con los síntomas fenotípicos aún no desarrollados. Los trabajos de Sidhu *et al.*, (2010) sugieren que la manifestación de los síntomas de la EMJ se atribuye causada por begomovirus, producen cambios significativos en el metabolismo de plantas enfermas de *J. curcas* L., en comparación con sanas, los cuales inducen alteraciones morfológicas y anatómicas que se manifiestan, según el genotipo, en la sintomatología de dicha enfermedad. Sin embargo, las enfermedades de origen viral pueden confundirse con síntomas causados por diversos factores abióticos, como la variación de temperatura o la precipitación pluvial, deficiencias nutrimentales en las plantas; y bióticos, como la interacción con otros agentes fitopatógenos, como fue el caso de individuos de la población FCP. Lo anterior se ha reportado en plantas asintomáticas de *Jatropha* spp., *J. curcas* L. (Narayana *et al.*, 2006, 2007; Raj *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010; Ramkat *et al.*, 2011; Snehi *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2014, 2015) y *Manihot esculenta* (Stanley y Gay, 1983; Hong *et al.*, 1993; Zhuo *et al.*, 1997).

Análisis estadístico de dependencia entre variables

El análisis de contingencia mostró una relación significativa entre la sintomatología y la infección ($\chi^2=4.28$; $p=0.05$) (Cuadro 3), por lo cual, se estableció la alta probabilidad de que los begomovirus sean los agentes causales de la Enfermedad del Mosaico de *Jatropha curcas* L. en Tapachula, Chiapas, México.

Esta hipótesis es respaldada por los estudios de Wang *et al.*, (2014), quienes agroinocularon clones del DNA-A del virus del mosaico de la yuca ICMV-SG aislado de *Jatropha curcas* de India en plantas de *Nicotiana benthamiana*, encontrando que este virus causa los síntomas en dicha planta. Por ello, se sugiere realizar

Cuadro 2. Relación entre síntomas y presencia de begomovirus en colecciones de *Jatropha curcas* en Tapachula, Chiapas, México.

Localidad	FCP		VNV		MCL		REQ		ALO	
	DV	DM	DV	DM	DV	DM	DV	DM	DV	DM
1	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
3	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
4	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Promedio	60	60	0	100	80	90	40	90	100	100

DV=Detección visual de EMJ; DM=Detección molecular de begomovirus. Los signos +/- indican la presencia/ausencia de los síntomas visibles o bien de la presencia/ausencia de la banda correspondiente detectada por PCR. Poblaciones muestreadas: Felipe Carrillo Puerto (FCP); Veinte de Noviembre (VNV); Manga de clavo (MCL); Álvaro Obregón (ALO); Raymundo Enríquez (REQ).

Cuadro 3. Análisis de contingencia entre síntomas e infección por begomovirus en poblaciones de *Jatropha curcas* Tapachula, Chiapas, México.

Infección	Presencia de síntomas	Ausencia de síntomas	Total
Si	27	17	44
No	1	5	6
Total	28	22	50

$\chi^2=4.28$; $\chi^2_{tab}=3.8$; $p=0.05$

estudios de agroinoculación de muestras infectadas a plantas sanas mediante los postulados de Koch en las poblaciones de *J. curcas* de Tapachula, Chiapas.

En Chiapas, las potenciales plagas y enfermedades asociadas a *J. curcas* no han sido caracterizadas. Nuestro estudio es el primer reporte de begomovirus asociados a la enfermedad del mosaico en plantas de *Jatropha curcas* L. en Tapachula, Chiapas, México.

CONCLUSIONES

El uso de la PCR permitió confirmar la presencia de begomovirus en plantas de *Jatropha curcas*, sintomáticas y asintomáticas de la enfermedad del mosaico de *Jatropha* (EMJ), en poblaciones de Tapachula, Chiapas, México, detectada previamente de manera visual. Dada la confirmación de la presencia de este virus, es necesario hacer selección de genotipos que presenten mayor resistencia a este agente patógeno dentro de los programas de mejoramiento genético operando en México.

LITERATURA CITADA

- Carels N. 2009. *Jatropha curcas*: A review. *Advances in Botanical Research* 50: 39-86.
- Chang L.S., Lee Y.S., Su H.J., Hung T.H. 2003. First Report of Papaya leaf curl virus Infecting Papaya Plants in Taiwan. *Plant Disease* 87: 204-204.
- Dahake R., Roy S., Patil D., Rajopadhye S., Chowdhary A. 2013. Potential Anti-HIV activity of *Jatropha curcas* Linn. leaf extracts. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals* 5: 160-165.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., Harrison B.D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plant and vector in sects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology* 125: 327-336.
- Faria A., Nava A. 2009. Detección por PCR de begomovirus en el cultivo del tomate en las áreas productoras de los Andes venezolanos. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 26: 179-195.
- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783-821.
- Gao S., Qu J., Chua N.H., Ye J. 2010. A new strain of Indian cassava mosaic virus causes a mosaic disease in the biodiesel crop *Jatropha curcas*. *Archives of Virology* 155: 607-612.
- Garrido-Ramirez E.R., Gilbertson R.L. 1998. First Report of Tomato Mottle Geminivirus Infecting Tomatoes in Yucatan, Mexico. *Plant Disease* 82: 59.
- Heller J. 1996. *Physic nut Jatropha curcas* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 66 pp.
- Hong Y.G., Robinson D.J., Harrison B.D. 1993. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly - transmitted geminivirus in cassava. *Journal of General Virology* 74: 2437-244.
- INEGI. 2006. Cuaderno Estadístico Municipal de Tapachula, Chiapas. Ed. 2006. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem06/info/chs/m089/mapas.pdf>. Fecha de acceso: 07/02/2017.
- Melgarejo T.A., Kon T., Rojas M.R., Paz-Carrasco L., Zerbini F.M., Gilbertson R.L. 2013. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *J Virology* 87: 5397-5413.
- Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E., Sánchez-Campos S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219-248.
- Narayana D.S.A., Shankarappa K.S., Govindrappa M.R., Prameela H.A., Gururaj Rao M. R., Rangaswamy K.T. 2006 Natural occurrence of *Jatropha* mosaic virus disease in India. *Current Science* 91:584-586.
- Narayana D.S.A., Rangaswamy K.T., Shankarappa K.S., Maruthi M.N., Lakshminarayana Reddy C.N., Rekha A.R., Keshava Murthy K.V. 2007. Distinct begomoviruses closely related to Cassava mosaic viruses cause Indian *jatropha* mosaic disease. *International Journal of Virology* 3: 1-11.
- Raj S.K., Snehi S.K., Kumar S., Khan M.S., Pathre U. 2008. First molecular identification of a begomovirus in India that is closely related to Cassava mosaic virus and causes mosaic and stunting of *Jatropha curcas* L. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 69-71.
- Ramkat R.C., Calari A., Maghuly F., Laimer M. 2011. Biotechnological approaches to determine the impact of viruses in the energy crop plant *Jatropha curcas*. *Virology Journal* 8: 386.
- Sidhu O. P., Annarao S., Pathre U., Khetrpal C. L. 2010. Metabolic and histopathological alterations of *Jatropha* mosaic begomovirus-infected *Jatropha curcas* L. by HR-MAS NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Planta* 232: 85-93.
- Stanley J., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Fauquet C.M., Rybicki E.P., Harrison B. D. 2005. Family Geminiviridae. *In: Virus taxonomy: VIII Report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, London. 326 pp.
- Snehi S.K., Srivastava A., Raj S.K. 2012. Biological characterization and complete genome sequence of a possible strain of Indian cassava mosaic virus from *Jatropha curcas* in India. *Journal of Phytopathology* 160: 547-553.
- Srivastava A., Jaidi M., Kumar S., Raj S.K. 2014. Molecular identification of a new begomovirus associated with leaf crumple disease of *Jatropha curcas* L in India. *Archives of Virology* 160: 617-619.
- Srivastava A., Kumar S., Jaidi M., Raj S.K. 2015. Molecular characterization of a new begomovirus associated with leaf yellow mosaic disease of *Jatropha curcas* in India. *Archives of Virology* 160: 1359-1362.
- Stanley J., Gay M.R. 1983. Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* 301: 260-262.
- Wang G., Wei Y.S., Rui R.X., Jing Q., Chuan S.T., Xi Y.J., Jian Y. 2014. DNA-A of a highly pathogenic Indian cassava mosaic virus isolated from *Jatropha curcas* causes symptoms in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Genes* 48: 402-405.
- Wang X.Y., Xie Y., Zhou X.P. 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. *Virus Genes* 29: 303-309.
- Zhuo X., Liu Y., Calvert L., Munoz C., Otim-Nape G. W., Robinson D.J., Harrison B.D. 1997. Evidence that DNA -A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* 78: 2101-2111.