

Detección de Virus que Afectan al Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México

Detection of Virus Affecting Chilli Pepper Crop (*Capsicum annuum* L.) in Chihuahua, Mexico

Ana Cecilia González Franco, Emma Monserrath Gill Langarica, Loreto Robles Hernández, Abelardo Núñez Barrios, Ramona Pérez Leal, Ofelia Adriana Hernández Rodríguez, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Ciudad Universitaria s/n Campus 1, Chihuahua, Chihuahua, CP 31310, México; Luis Pérez Moreno, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Apartado Postal 311, Irapuato, Gto., CP 36500, México. Correspondencia: lrobles@uach.mx

(Recibido: Julio 29, 2014 Aceptado: Septiembre 26, 2014)

González Franco AC, Gil Langarica EM, Robles Hernández L, Núñez Barrios A, Pérez Leal R, Hernández Rodríguez O A y Pérez Moreno L. 2014. Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 38-51.

Resumen. El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de 12 virus presentes en las dos regiones productoras de chile en el estado de Chihuahua. Se colectaron 203 muestras foliares sintomáticas en 10 localidades de las regiones centro-sur y norte del Estado y se analizaron mediante la técnica DAS-ELISA, utilizando anticuerpos policlonales específicos. La incidencia y severidad de infecciones de tipo viral fueron superiores en la zona norte. CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY y PepMV se detectaron en la región centro-sur, mientras que en la región norte se identificaron TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV y ToRSV. Cinco de los virus detectados fueron comunes en las dos regiones. CMV y TMV fueron predominantes en la región centro-sur, y TRSV y TBSV lo fueron en la región norte. El 44% de las muestras positivas para la región centro-sur fueron infecciones mixtas, mientras que para la norte fueron el 78%. Este es el primer estudio que reporta la presencia de 12 especies de virus e infecciones múltiples en el cultivo de chile del estado de Chihuahua y el primero en reportar al TBSV en el cultivo de chile en México.

Palabras clave adicionales: DAS-ELISA, CMV, TMV, AMV, TRSV, TBSV, INSV.

México ocupa el primer lugar en producción de chile verde (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial con una superficie sembrada de 138,188.21 ha y una producción de 2,379,735.80 t (SAGARPA, 2012). Este cultivo es uno de los más importantes en México por su rentabilidad y alta

Abstract. The objective of the present work was to determine the incidence of 12 viruses present in the two pepper-producing regions of the State of Chihuahua. A total of 203 symptomatic leaf samples were collected in 10 sites of the South-Central and North regions and tested by DAS-ELISA, using virus-specific polyclonal antibodies. The incidence and severity of the viral infections were higher in the North region. CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY and PepMV were detected in the South-Central region, while in the North region TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV and ToRSV were detected. Five of the detected viruses were common in both regions. CMV and TMV were predominant in the South-Central region, while TRSV and TBSV were the most frequent in the North region. Over 44% and 78% of the positive samples in the South-Central and the North regions respectively consisted of mixed infections. This is the first study that reports 12 viruses and multiple infections in pepper of Chihuahua State and the first in reporting TBSV in pepper in Mexico.

Additional keywords: DAS-ELISA, CMV, TMV, AMV, TRSV, TBSV, INSV.

México ranks first in green pepper (*Capsicum annuum* L.) worldwide production with a planted area of 138,188.21 hectares and a production of 2,379,735.80 t (SAGARPA, 2012). This crop is one of the most important in Mexico because of its cost effectiveness and high demand for labor (Perez and Rico, 2004). Nationally, Chihuahua state ranks first in production with 562,166.53 t and third in value of production with a contribution of almost two billion pesos. In Chihuahua state, chili pepper is mainly produced in the south-central and northern regions. In 2012 in the northern region of the state, 13,098.36 ha were seeded and producing 195,988.7 t worth of production above 817 million pesos, equivalent to 41.7% of the total state contribution. The main

demanda de mano de obra (Pérez y Rico, 2004). A nivel nacional, Chihuahua ocupa el primer lugar en producción con 562,166.53 t y el tercer lugar en valor de la producción con una aportación de casi dos billones de pesos. En Chihuahua la producción de chile se centra en las regiones centro-sur y norte. En la zona norte se sembraron 13,098.36 ha en el 2012, con una producción de 195,988.7 t y un valor de producción por arriba de 817 millones de pesos, equivalente a un 41.7% del total de la aportación estatal. Los principales municipios que conforman esta zona son Ascensión, Buenaventura, Galeana, Janos, Constitución y Nuevo Casas Grandes. En la región centro-sur se sembraron 9,588.52 ha, con una producción de 371,521.41 t y un valor de producción superior a un billón de pesos, equivalente a un 57.5% del total de la aportación en el Estado, en el 2012. Esta zona está constituida principalmente por los municipios de Allende, Camargo, Delicias, Jiménez, Julimes, Meoqui y Rosales (SAGARPA, 2012). En el cultivo de chile, las enfermedades representan uno de los factores de riesgo para su rentabilidad por lo que resulta necesario protegerlo del ataque de los diferentes patógenos. En los últimos años las enfermedades causadas por virus han ocasionado pérdidas económicas importantes debido a la reducción en la producción de diferentes cultivos hortícolas en México (Astier *et al.*, 2007). Estas pérdidas varían cada año, y han estado en función del manejo del cultivo y las condiciones climáticas, alcanzando en algunos casos pérdidas hasta de un 100% (Vidales y Alcantar, 1989). Las plantas infectadas por virus tienen un ciclo vegetativo más corto y los síntomas más comunes son ampollamiento, enanismo, mosaicos, moteados, necrosis, clorosis y deformaciones (Murphy y Warren, 2003; Agrios, 2005; Astier *et al.*, 2007). Estas enfermedades se han incrementado en casi todas las regiones de México, convirtiéndose en uno de los problemas de mayor importancia en los cultivos hortícolas (Pérez y Rico, 2004). Para realizar un control eficiente de una enfermedad es importante identificar el agente causal, ya que una buena identificación de éste garantiza el éxito en las medidas de su control (González y Delgadillo, 1989). En el caso específico de las enfermedades de tipo viral, no es suficiente el reconocimiento de los síntomas, ya que los síntomas causados por los diferentes virus a veces son similares (Pérez-Moreno *et al.*, 2004), o se confunden con daños por herbicidas o por desbalances nutricionales. Además, las plantas pueden estar infectadas simultáneamente por más de un virus, por lo que es importante utilizar técnicas de diagnóstico especializadas que permitan la identificación plena de los agentes virales (Harris, 1994). Entre estas técnicas, la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) ha sido una de las más utilizadas en detección de virus en plantas (Cruz y Frías, 1997). A nivel nacional se han reportado hasta 13 especies de virus con genomas de ARN asociados con enfermedades en el cultivo de chile (Núñez *et al.*, 1996; Pérez y Rico, 2004; Robles *et al.*, 2010); sin embargo, ninguna de estas especies se ha descrito en el estado de Chihuahua. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de las especies virales presentes

municipalities of this area are Ascension, Buenaventura, Galeana, Janos, Constitution and Nuevo Casas Grandes. In 2012 in the south-central region, 9,588.52 ha were planted and produced 371,521.41 t worth over one billion pesos, equivalent to 57.5% of the total state contribution. This area is mainly constituted by Allende, Camargo, Delicias, Jimenez Julimes, Meoqui and Rosales municipalities (SAGARPA, 2012). Among the chili pepper crops, several diseases represent the main risk factors for profitability, therefore, it is necessary to protect them from various pathogens attack. In recent years, diseases caused by viruses have considerably increased the economic losses due to reduced production of different vegetable crops in Mexico (Astier *et al.*, 2007). These losses vary every year and they have been based on crop management and climatic conditions, reaching in some cases up to 100% losses (Vidales and Alcantar, 1989). The virus infected plants have a shorter growing season and the most common symptoms are blistering, stunting, mosaics, mottling, necrosis, chlorosis and deformation (Murphy and Warren, 2003; Agrios, 2005; Astier *et al.*, 2007). These diseases have increased in almost all regions of Mexico, becoming one of the most important problems in horticultural crops (Perez and Rico, 2004). For an efficient disease control, it is important to identify the causal agent, since a good identification guarantees success in their control measures (Gonzalez and Delgadillo, 1989). In the specific case of virus-like diseases, it is not enough the symptom's identification because the symptoms caused by different viruses are sometimes similar (Perez-Moreno *et al.*, 2004), or they can be misdiagnosed as herbicide's damage or nutritional imbalances. In addition, plants may be infected simultaneously by more than one virus, so it is important to use specialized diagnostic techniques that allow full identification of the viral agents (Harris, 1994). Among these techniques, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test has been one of the most widely used tool in detection of viruses in plants (Cruz and Frias, 1997). Nationally, there have been reports of as many as 13 species of virus with RNA genomes related to diseases in the chili pepper crops (Núñez *et al.*, 1996; Pérez and Rico, 2004; Robles *et al.*, 2010); however, none of these species has been described in Chihuahua State. Therefore, the aim of this study was to determine the incidence of viral species present in chili pepper crops of the two main producing regions in Chihuahua. In both chili producing regions, the incidence and severity of the viral diseases in field, the detection of viral species, the ratio of virus detected by location and the analysis of multiple infections were determined.

MATERIALS AND METHODS

Determination of the incidence and severity. Field trips were made during the crop development and fruiting season in order to determine the incidence and severity on chili plants with characteristic symptoms of a probable viral disease. These field trips were made to four sites of the south-central region and to six sites in the northern Chihuahua state (Figure 1). At each site, three plots were selected for evaluation. In order to estimate the incidence,

en el cultivo de chile de las dos principales regiones productoras de este cultivo en el estado de Chihuahua. En ambas regiones productoras de chile se determinaron las variables incidencia y severidad de la virosis en campo, detección de especies virales, proporción de virus detectados por localidad y análisis de infecciones múltiples.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la incidencia y severidad. Se realizaron recorridos de campo en la etapa de desarrollo y fructificación del cultivo para determinar la incidencia y severidad en plantas de chile que presentaban síntomas característicos de una probable enfermedad de tipo viral en cuatro localidades de la región centro-sur y en seis localidades de la región norte del estado de Chihuahua (Figura 1). En cada localidad se seleccionaron tres predios para su evaluación. Para medir la incidencia se seleccionó el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. Se hizo el conteo de plantas aparentemente sanas y plantas que presentaban síntomas característicos de enfermedades virales, tales como mosaicos, moteado, deformación de hojas, clorosis, ampollamiento y enanismo.

10% of the total grooves distributed throughout each plot was selected. Apparently healthy plants and plants showing typical symptoms of viral diseases, such as mosaics, mottling, leaf distortion, chlorosis, blistering and stunting disease were counted. Incidence was calculated considering the proportion of symptomatic plants to total plants sampled at each site. The severity was determined at each plot using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plant, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage. The severity index was estimated using the following formula:

$$IS = (\sum n.v / 5N) * 100$$

Where IS = severity index, n = number of plants per category, v = numerical value of each category and N = total number of plants per site (Escalona, 2002).

Plant material collection in the field. The collection of leaf samples with symptoms characteristic of viral diseases in chili pepper was done according to Hernandez *et al.* (1998) methodology, during June, July and August 2008 in the south-central region and during July and

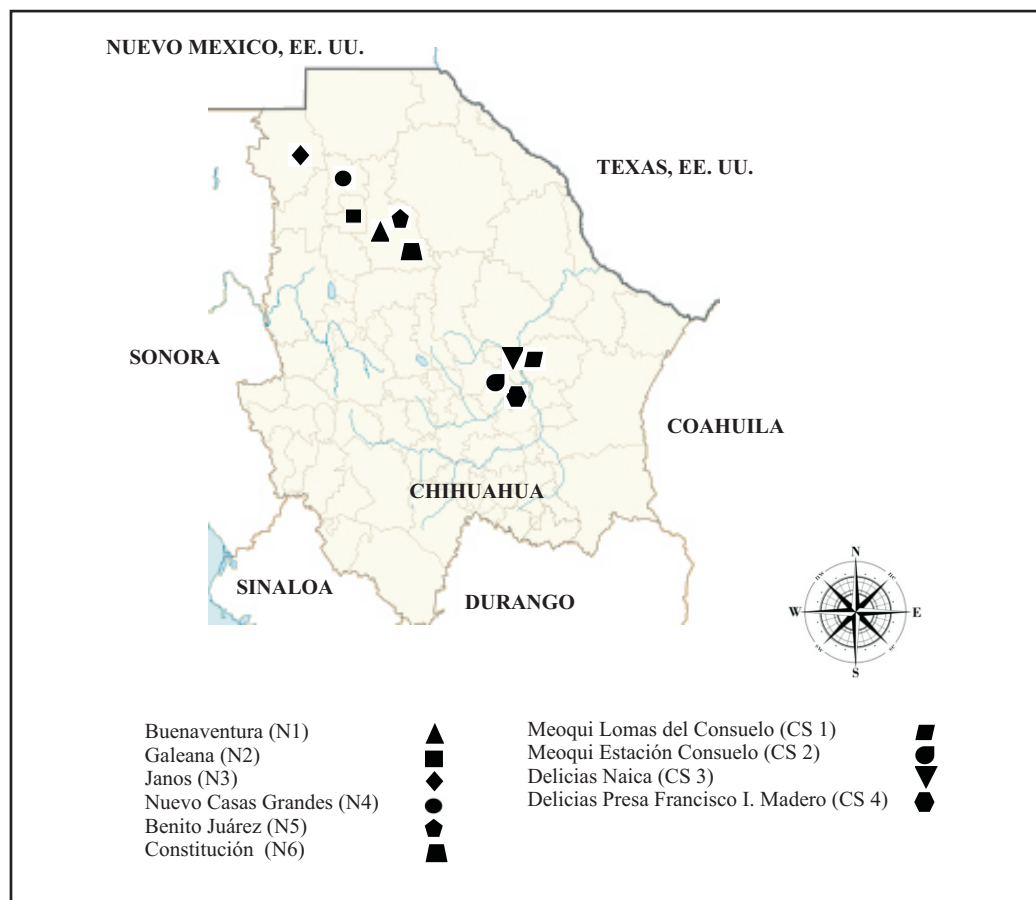


Figura 1. Distribución de las localidades muestreadas para la determinación de incidencia, severidad, índice de severidad de posibles enfermedades de tipo viral, y detección de virus en el cultivo de chile en las regiones centro-sur y norte del estado de Chihuahua.

Figure 1. Distribution of sampled sites to determine incidence, severity, severity index of potential virus-like diseases, and detection of virus in the culture of chile in south-central and northern state of Chihuahua regions.

La incidencia se calculó con base en la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en cada sitio muestreado. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0 = plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño. El índice de severidad se estimó por medio de la siguiente fórmula:

$$IS = (n.v/5N) * 100$$

Donde IS = Índice de Severidad, n = número de plantas por cada categoría, v = valor numérico de cada categoría y N = Número total de plantas por localidad (Escalona, 2002).

Colecta de muestras en campo. La colecta de muestras foliares con sintomatología característica de enfermedades virales en Chile se realizó de acuerdo a la metodología de Hernández *et al.* (1998) durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur y en julio y agosto de 2009 en la región norte. En la primera región se obtuvieron 129 muestras distribuidas por cada localidad (CS1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23) y en la región norte 74 muestras (N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8). Las muestras se colectaron en bolsas de plástico y se colocaron en una hielera acondicionada a 4°C para su transporte al laboratorio, en donde se almacenaron temporalmente a -20°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Fitopatología de la División de Ciencias de la Vida (DICIVA-CIS-UG) y en el laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, UACH. Para la detección de los virus se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática en fase sólida tipo sándwich (DAS-ELISA) según las recomendaciones del fabricante (Agdia Inc., 2008 y 2009), la cual se realiza en dos días (Clark y Adams, 1977; Cruz y Frías, 1997). En los ensayos se utilizaron los anticuerpos policlonales específicos para la detección de los virus TEV (*Tobacco etch virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), PMMoV (*Pepper mild mottle virus*), PepMV (*Pepper mottle virus*), AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TRSV (*Tobacco ring spot virus*), TBSV (*Tomato bushy stunt virus*), ToRSV (*Tomato ring spot virus*), INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) y TSWV (*Tomato spotted wilt virus*).

Origen de los antisueros. Los anticuerpos se obtuvieron de la compañía Agdia Inc., USA en 2008 y 2009, los cuales se preservaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante hasta el momento de realizar los bioensayos.

Obtención de lecturas. Las lecturas de absorbancia se obtuvieron utilizando un lector de microplacas marca BioRad, modelo 3550-UV a una longitud de onda de 405 nm, ya que en el sistema de detección de los virus estudiados se utilizó la enzima fosfatasa alcalina.

Determinación del límite de detección. El límite de detección se determinó considerando como positivas todas las muestras que tuvieron un valor de absorbancia dos veces mayor al promedio del valor de la absorbancia del control

August 2009 in the northern region. In the first region, 129 samples distributed per each site were obtained (CS1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23), and at the northern region, 74 samples were obtained (N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8). The samples were collected in plastic bags and immediately placed in a cooler (4°C), when in the laboratory, the samples were stored at -20°C until processing.

Sample processing. The samples were processed at the Plant Pathology Laboratory of the Life Sciences Division (DICIVA-CIS-UG) and at the Applied Microbiology, Plant Pathology and Postharvest Physiology Laboratory of the Agrotechnological Sciences Faculty, UACH. As for virus detection, the Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) technique was used according to the manufacturer's recommendations (Agdia Inc., 2008 and 2009), which is performed in two days (Clark and Adams, 1977; Cruz and Frías, 1997). During the assays, specific polyclonal antibodies were used for detection of the following virus: TEV (*Tobacco etch virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PVY (*Potato virus Y*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), PMMoV (*Pepper mild mottle virus*), PepMV (*Pepper mottle virus*), AMV (*Alfalfa mosaic virus*), TRSV (*Tobacco ring spot virus*), TBSV (*Tomato bushy stunt virus*), ToRSV (*Tomato ring spot virus*), INSV (*Impatiens necrotic spot virus*) y TSWV (*Tomato spotted wilt virus*).

Origin of the antisera. Antibodies were obtained from Agdia Inc. Company, USA, during 2008 and 2009, which were preserved according to the manufacturer's recommendations until the bioassays.

Obtaining the readings. Absorbance readings were obtained by using a BioRad microplate reader, model 3550-UV at a 405 nm wavelength because in the detection system, the alkaline phosphatase enzyme was used.

Determination of the limit of detection. The detection limit was determined considering as positive all samples that showed an absorbance value twice the average value of the absorbance of the negative control; therefore, all absorbance values above this limit, were considered positive.

RESULTS

Incidence and severity of viral diseases. The incidence and severity was determined in chili pepper plants exhibiting characteristic symptoms of viral-type infections. In the south-central region, higher incidence and severity index were observed at the CS4 site with 15.9% and 5.4%, respectively, being category 1 the highest on the severity scale. This shows that although having fewer plants in category 4, the disease progression is very important, which could increase the spread of viral diseases, the loss of plants and significantly reduce the production of chili pepper. On the other hand, CS1, CS2 and CS3 sites were similar on incidence (3.9%, 3.7% and 4.3, respectively) and severity index (1.3%, 1.7% and 1.7%, respectively) (Figure 2). In the northern region, the N1 and N3 sites showed the highest incidence of plants with symptoms of viral type with values of 23 and 25%, respectively; while the lowest values of this

negativo; por lo que todo valor de absorbancia obtenido de las muestras que estuviera por arriba de este límite, se consideró positivo.

RESULTADOS

Incidencia y severidad de la virosis. La incidencia y severidad se determinó en plantas de chile que presentaban síntomas característicos de infecciones de tipo viral. En la región centro-sur, se observó una mayor incidencia e índice de severidad en la localidad CS4 con valores de 15.9% y 5.4%, respectivamente, siendo mayor la categoría 1 en la escala de severidad. Lo anterior muestra que aunque se tienen menor cantidad de plantas en la categoría 4, el avance de la enfermedad es muy importante, lo cual podría incrementar la diseminación de las enfermedades virales, causar la pérdida de plantas y reducir de manera importante la producción de chile. Por otro lado, las localidades CS1, CS2 y CS3 fueron similares en las variables de incidencia (3.9%, 3.7% y 4.3%, respectivamente) e índice de severidad (1.3%, 1.7% y 1.7%, respectivamente) (Figura 2). En la región norte, las localidades N1 y N3 presentaron la mayor incidencia de plantas con síntomas de tipo viral con valores

variable ocurrió en el N6 site; however, this latter site had the highest severity index with 47.7%, predominating category 4 on the severity scale (Figure 3).

Virus detection. Eight viruses were detected in the south-central region and nine viruses in the northern region, with five viruses in common in both regions: TMV, CMV, TBSV, TEV and PVY. From the 129 leaf samples with viral type symptoms from the south-central region, only 89 were positive for at least one type of virus. In this region the CMV, TMV, AMV, TBSV, PMMoV, TEV, PVY and PepMV viruses were detected; the first two had the highest frequency values 36% and 20%, respectively. The less frequent viruses were PVY (5%) and PepMV (1%). Furthermore, 42 out of the 74 leaf samples from the northern region were positive for at least one of the following viruses: TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV and ToRSV; the TRSV (53%) and TBSV (42%) viruses were the most frequent, while TSWV (3%), PVY (3%) and ToRSV (1%) were less frequent (Figure 4).

Out of the 10 sites under study, three of the south-central region (CS1, CS2 and CS3) and one from the

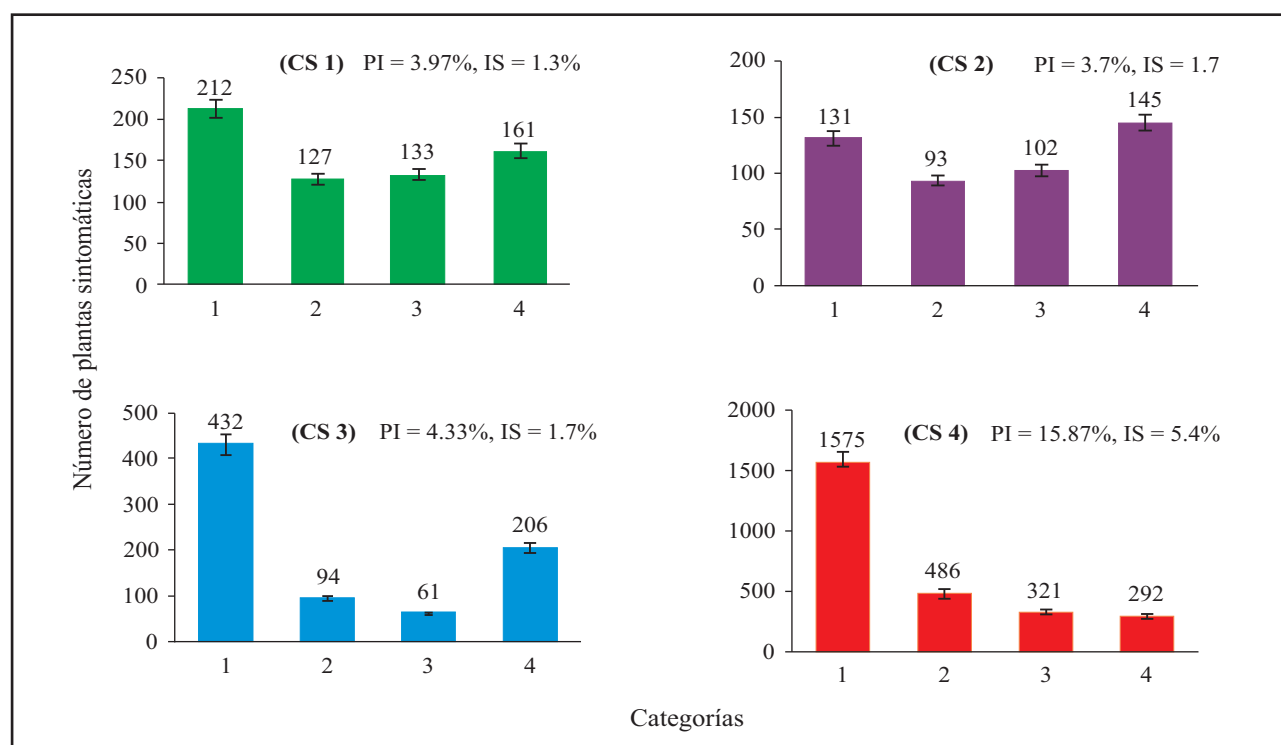


Figura 2. Incidencia (PI), severidad e índice de severidad (IS) de plantas con sintomatología característica de tipo viral en el cultivo de chile en cuatro localidades de la región centro-sur del estado de Chihuahua. La incidencia se calculó tomando en cuenta la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0 = plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño, y el índice de severidad se calculó de acuerdo a la metodología de Escalona (2002).

Figure 2. Impact (IP), severity and severity index (SI) plant with characteristic symptoms of viral type in the cultivation of pepper in four towns in the south-central region of the state of Chihuahua. The incidence was calculated taking into account the proportion of symptomatic plants to total plant at 10% of grooves distributed throughout each property. The severity was determined at each site using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plants, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage and the severity index was calculated according to the methodology of Escalona (2002).

de 23 y 25%, respectivamente, mientras que los valores más bajos de ésta variable se presentaron en la localidad N6; sin embargo, esta última localidad presentó el índice de severidad más alto con un 47.7%, predominando la categoría 4 en la escala de severidad (Figura 3).

northern region (N4), tested positive for seven and eight viruses, respectively. In the south-central region, the TMV, AMV, CMV and PVY viruses were detected at all four sites, where the first three were observed in major proportions in at least 2 sites, and PVY was detected at all four sites, but in

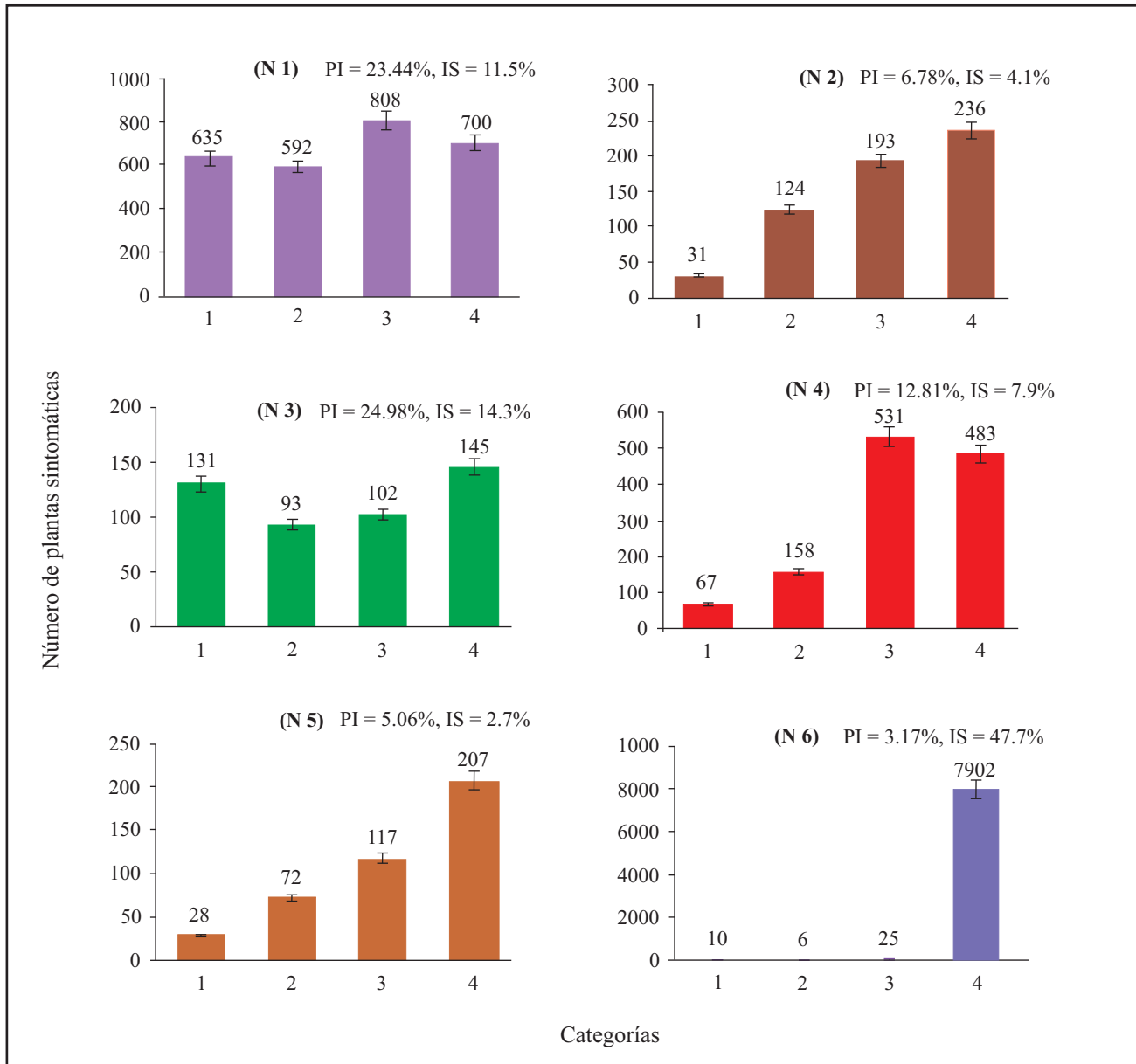


Figura 3. Incidencia (PI), severidad e índice de severidad (IS) de plantas con sintomatología característica de tipo viral en el cultivo de chile en seis localidades de la región norte del estado de Chihuahua. La incidencia se calculó tomando en cuenta la proporción de las plantas sintomáticas con respecto al total de plantas en el 10% del total de surcos distribuidos a lo largo y ancho de cada predio. La severidad se determinó en cada predio mediante una escala arbitraria de 5 categorías, donde 0 = plantas sanas, 1 = 1-25% de daño, 2 = 25.1-50% de daño, 3 = 50.1-75% de daño y 4 = 75.1-100% de daño, y el índice de severidad se calculó de acuerdo a la metodología de Escalona (2002).

Figure 3. Impact (IP), severity and severity index (SI) plant with characteristic symptoms of viral type in growing chile in six villages in the northern region of the state of Chihuahua. The incidence was calculated taking into account the proportion of symptomatic plants to total plant at 10% of grooves distributed throughout each property. The severity was determined at each site using an arbitrary scale of 5 categories, where 0 = healthy plants, 1 = 1-25% damage, 2 = 25.1-50% damage, 3 = 50.1-75% damage and 4 = 75.1-100% damage and the severity index was calculated according to the methodology of Escalona (2002).

Detección de virus. De las regiones evaluadas, se detectaron ocho virus en la centro-sur y nueve virus en la norte; obteniéndose cinco virus en común: TMV, CMV, TBSV, TEV y PVY. De 129 muestras foliares con sintomatología de tipo viral procedentes de la región centro-sur, 89 fueron positivas para al menos un tipo de virus. En esta región se detectaron los virus CMV, TMV, AMV, TBSV, PMMoV, TEV, PVY y PepMV; los dos primeros presentaron la mayor frecuencia con valores de 36% y 20% respectivamente. Los virus menos frecuentes fueron PVY (5%) y PepMV (1%). Por otro lado, 42 de 74 muestras foliares procedentes de la región norte resultaron positivas para al menos alguno de los siguientes virus: TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV y ToRSV; los virus TRSV (53%) y TBSV (42%) fueron los más frecuentes mientras que TSWV (3%), PVY (3%) y ToRSV (1%) se presentaron con la menor frecuencia (Figura 4).

lower ratio. The PMMoV and TBSV virus were found in three of the four sites, showing the highest proportion in the CS2 site (Table 1). On the other hand, in the northern region, TRSV was observed in high proportions in five out of the six sites (Table 2). The TBSV virus was detected in higher proportions in the N4, N5 and N6 sites. Lastly, INSV was only present in the N4 site, but in a high proportion (0.6) (Table 2).

Multiple infections. The samples that tested positive by DAS-ELISA from the south-central region, were 55% for a single virus, 29% for two virus types and 9% for samples infected with three types of virus; samples infected with four, five or six viruses were also detected in a lower percentage. The TMV and CMV virus occurred in almost all combinations (Table 3). In the northern region, 21.4% of samples were positive for one virus; combinations of two, three, four and five viruses were also detected, the first two

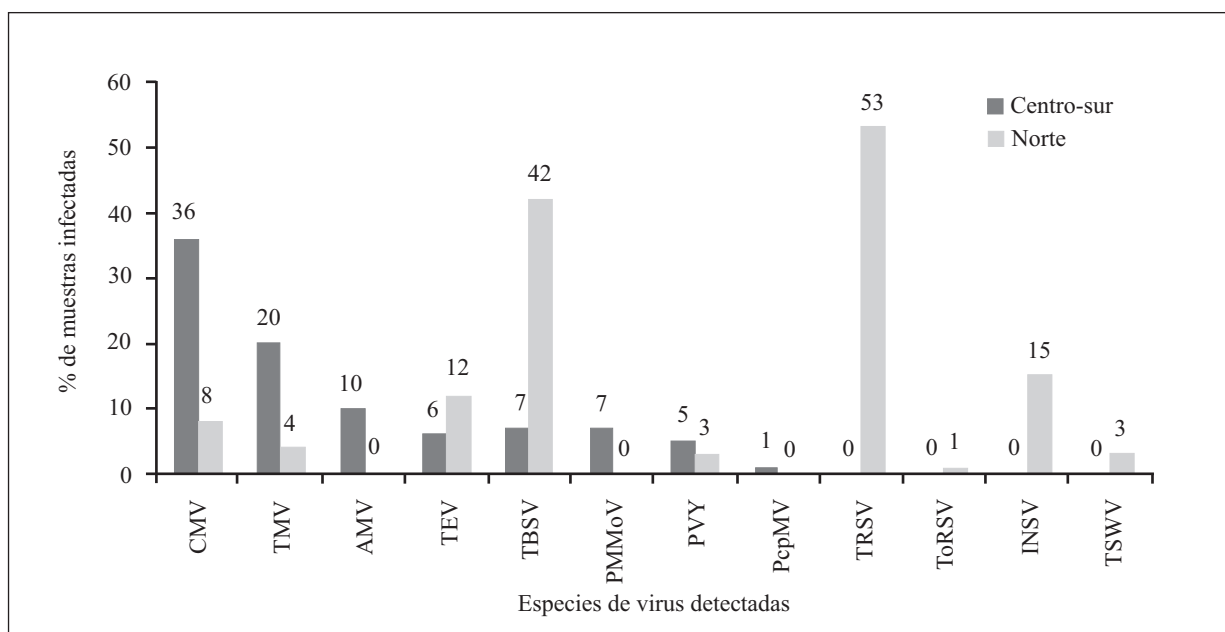


Figura 4. Frecuencia de virus en el cultivo de chile detectados por medio de la técnica DAS-ELISA en base a 129 muestras foliares provenientes de la región centro-sur, y 74 muestras foliares de la región norte del estado de Chihuahua, México. Las muestras con sintomatología característica de enfermedades virales en chile se colectaron durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur y en julio y agosto de 2009 en la región norte.

Figure 4. Frequency of virus in the culture of chili detected by the DAS-ELISA based on 129 leaf samples from the south-central region, and 74 leaf samples from the northern region of the state of Chihuahua, Mexico. Samples with characteristic symptoms of viral diseases in Chile were collected during the months of June, July and August 2008 in the south central region and in July and August 2009 in the northern region.

De las 10 localidades de este estudio, tres de la región centro-sur (CS1, CS2 y CS3) y una de la norte (N4) sobresalieron por presentar siete y ocho de los virus evaluados respectivamente. En la región centro-sur, los virus TMV, AMV, CMV y PVY se detectaron en las cuatro localidades, presentándose los tres primeros en proporciones importantes en al menos dos de ellas, mientras que PVY fue detectado en las cuatro localidades, pero en una baja proporción. Los virus PMMoV y TBSV se encontraron en tres de las cuatro localidades, detectándose en alta

being the most common with values of 40.5% and 19%, respectively (Table 4). The TRSV virus appeared in all combinations, whereas TBSV was present in almost all. The INSV, TEV, TMV virus occurred only in the combinations from three to five viruses (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, the incidence and severity of chili pepper plants with characteristic symptoms of viral type in south-central and northern regions of Chihuahua

proporción en la localidad CS2 (Cuadro 1). Por otro lado, en la región norte, el TRSV se presentó en altas proporciones en cinco de las seis localidades (Cuadro 2). El virus TBSV se detectó en altas proporciones en las localidades N4, N5 y N6. Finalmente, el INSV sólo se presentó en la localidad N4, pero con una proporción alta (0.6) (Cuadro 2).

State were evaluated. Additionally, the presence of 12 species of virus were detected in leaf samples and thus their frequency and viral complexity were determined.

In the northern region, the highest incidence and severity index values were obtained. This difference could be related to crop management because the production

Cuadro 1. Proporción de muestras positivas por virus detectados con base en la técnica DAS-ELISA en 129 muestras foliares recolectadas durante junio, julio y agosto de 2008 en la región centro-sur del estado de Chihuahua.

Table 1. Proportion positive samples detected viruses based on DAS-ELISA technique in 129 leaf samples collected during June, July and August 2008, in the south-central region of Chihuahua state.

Localidad	Virus							
	PMMoV	PVY	TMV	AMV	CMV	PepMV	TBSV	TEV
CS 1	0.09 ^a	0.02	0.35	0.16	0.49	0.00	0.05	0.09
CS 2	0.33	0.11	0.33	0.44	0.11	0.11	0.22	0.00
CS 3	0.04	0.06	0.07	0.02	0.31	0.00	0.09	0.07
CS 4	0.00	0.04	0.17	0.04	0.35	0.00	0.00	0.00

^aLos datos presentados son proporciones del número de muestras positivas para cada virus entre el total de muestras procesadas en cada localidad. Cs1, n=43; CS2, n=9; CS3, n=54; CS4, n=23.

Cuadro 2. Proporción de muestras positivas poro virus detectados con base en la técnica DAS-ELISA en 74 muestras foliares recolectadas durante julio y agosto de 2009 en la zona norte del estado de Chihuahua.

Table 2. Proportion positive samples detected viruses based on DAS-ELISA technique in 74 leaf samples collected during July and August 2009, in the northern region of Chihuahua state.

Localidad	Virus								
	TRSV	CMV	TEV	INSV	TSWV	PVY	ToRSV	TBSV	TMV
N1	0.00 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
N2	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N3	0.43	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N4	0.94	0.00	0.33	0.61	0.11	0.06	0.05	1.00	0.06
N5	0.58	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00
N6	1.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.25

^aLos datos presentados son proporciones del número de muestras positivas para cada virus entre el total de muestras procesadas en cada localidad. N1, n=20; N2, n=9; N3, n=7; N4, n=18; N5, n=12; N6, n=8.

Infecciones múltiples. De las muestras positivas analizadas por DAS-ELISA en la región centro-sur, el 55% de ellas fueron positivas para un solo virus, el 29% para dos tipos virus y 9% para muestras infectadas con tres tipos de virus; también se detectaron muestras infectadas con cuatro, cinco y seis virus en un menor porcentaje. Los virus TMV y CMV se presentaron en casi todas las combinaciones (Cuadro 3). En la región norte, el 21.4% de las muestras fueron positivas para un solo virus; también se detectaron combinaciones de dos, tres, cuatro y cinco virus, siendo las dos primeras las más comunes con valores de 40.5% y 19%, respectivamente (Cuadro 4). El virus TRSV se presentó en todas las combinaciones, mientras que TBSV estuvo presente en casi todas. Los virus INSV, TEV, TMV solo se presentaron en las combinaciones de tres a cinco virus (Cuadro 4).

systems in the region are less technically advanced than in the south- central region. Sepulveda *et al.* (2005) obtained a low percentage of infection and development of viruses as low as 8.2% incidence by installing padding and iron applications, whereas without padding but with the iron application the incidence was 24.4%. Moreover, Guigón-López and González-González (1999) found that combinations chili - sorghum and chili - corn decreased the incidence of viral infections by up to 39% and they delayed the development of virus-like symptoms in 60%. Additionally, weather conditions may play an important role in the development of viral diseases. Guigón-López and González-González (1999) reported that the April planting was better than May planting, showing a reduction of the incidence, the rate of apparent infection and the development of symptoms of viral type.

Cuadro 3. Complejidad de infecciones virales detectadas por la técnica DAS-ELISA en base al número total de muestras positivas para al menos un virus colectadas en la región centro-sur del estado de Chihuahua durante junio, julio y agosto de 2008.

Table 3. Complexity of viral infections detected by DAS-ELISA technique based on the total number of samples that tested positive for at least one virus. Samples collected in the south-central region of Chihuahua state during June, July and August 2008.

Número de virus en muestras de chile infectadas					
Uno	Dos	Tres	Cuatro	Cinco	Seis
CMV	CMV-TEV	TMV-CMV-TEV	TMMoV-AMV-PepMV-TBSV	PMMoV PVY-TMV-AMV-TBSV	PMMoV-TMV-AMV-CMV-PepMV-TEV
TMV	TMV-CMV	TMV-AMV-PMMoV	TMV-AMV-PMMoV-PVY		
AMV	TMV-PMMoV	AMV-CMV-PMMoV	TMV-CMV-TBSV-PVY		
TEV PVY PMMoV	TMV-TBSV	TMV-AMV-CMV			
55.6% ^a	29.3%	9.0%	3.0%	2.0%	1%

^aPorcentaje del total de muestras de chile que fueron positivas por DAS-ELISA.

Cuadro 4. Complejidad de infecciones virales detectadas por la técnica DAS-ELISA en base al número total de muestras positivas para al menos un virus colectadas en la región norte del estado de Chihuahua durante julio y agosto de 2009.

Table 4. Complexity of viral infections detected by DAS-ELISA technique based on the total number of samples that tested positive for at least one virus. Samples collected in the northern region of Chihuahua state during July and August 2009.

Número de virus en muestras de chile infectadas				
Uno	Dos	Tres	Cuatro	Cinco
TRSV PVY TBSV ToRSV	TRSV-CMV TRSV-TBSV	TRSV-TBSV-TMV TRSV-TBSV-TEV	TRSV-TBSV-TEV-TMV TRSV-TBSV-TEV-INSV	TRSV-TBSV-TEV-INSV-TSWV
		TRSV-TBSV-INSV	TRSV-TBSV-PVY-INSV TRSV-TBSV-TMV-INSV	
21.4% ^a	40.45%	19.04%	14.28%	4.76%

^aPorcentaje del total de muestras de chile que fueron positivas por DAS-ELISA.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la incidencia y severidad de plantas de chile con sintomatología característica de tipo viral en las regiones centro-sur y norte del estado de Chihuahua. Asimismo, se detectó la presencia de 12 especies de virus en muestras foliares y con ello se determinó su frecuencia y complejidad viral.

En la región norte se presentaron los valores mas altos de incidencia e índice de severidad. Esta diferencia podría estar relacionada con el manejo del cultivo, ya que los sistemas de producción en dicha región son menos

Tun-Azul *et al.* (2004) reported an 87% virus incidence in chili crops and a 3% severity index. In the present study, the incidence was lower but the severity index was similar for some sites of the south-central region; however, the average severity index of the northern region was higher than that reported by these authors.

From the two evaluated regions, eight viruses were detected in the south-central region and nine in the northern region, with five viruses in common; however, the most abundant viruses were different between regions. In the south-central region, the most frequent viruses detected

tecnificados que en la centro-sur. Sepúlveda *et al.* (2005) mediante la instalación de acolchado y aplicaciones de hierro, obtuvieron un bajo porcentaje de infección y desarrollo de la virosis hasta en un 8.2% de incidencia, mientras que sin acolchado pero con la aplicaciones de hierro tuvieron una incidencia de un 24.4%. Por otra parte, Guigón-López y González-González (1999) encontraron que las combinaciones chile-sorgo y chile-maíz disminuyeron la incidencia de la virosis hasta en un 39% y retrasaron el desarrollo de sintomatología de tipo viral en un 60%. Asimismo, las condiciones climáticas podrían jugar un papel importante en el desarrollo de las enfermedades virales. Guigón-López y González-González (1999) reportaron que la siembra de abril era mejor que la de mayo, reflejándose en la reducción de la incidencia, la tasa de infección aparente y el desarrollo de la sintomatología de tipo viral.

Tun-Azul *et al.* (2004) reportaron una incidencia de la virosis en el cultivo de chile del 87% y un índice de severidad del 3%. En nuestro estudio, la incidencia fue menor pero el índice de severidad fue similar para algunas localidades de la región centro-sur; sin embargo, el índice de severidad promedio de la región norte fue superior al reportado por dichos autores.

De las dos regiones evaluadas, se detectaron ocho virus en la región centro-sur y nueve en la norte, de los cuales cinco fueron en común; sin embargo, los virus más abundantes fueron diferentes entre regiones. En la región centro-sur, los virus que se detectaron con mayor frecuencia fueron CMV, TMV y AMV, los cuales están distribuidos en todo el mundo (Alonso-Prados *et al.*, 1998; Hull, 2002; Himmel, 2003). El CMV es uno de los virus de mayor importancia debido a su impacto económico (Alonso-Prados *et al.*, 1998), a su extensivo rango de hospederos (Hull, 2002) y a su eficiente transmisión de manera no persistente por más de 75 especies de áfidos, así como por su transmisión mecánica y por semilla (Murphy, 2003; Astier *et al.*, 2007); lo anterior, se puede considerar para tomar acciones preventivas en nuestra región mediante un manejo integrado de plagas, así como usar semilla certificada y evitar en lo posible la manipulación de plantas. El TMV se ha caracterizado por infectar cultivares del género *Capsicum*, en donde ocasiona pérdidas en la producción de hasta un 70% en cultivares susceptibles. La frecuencia de este virus se incrementa en el cultivo de chile por la manipulación de plántulas durante el trasplante o durante el desarrollo de las plantas, ya que este virus se transmite mayormente por contacto y mecánicamente (Himmel, 2003). Además, con frecuencia los trabajadores fuman durante los horarios de trabajo, lo cual es un riesgo de contaminación para iniciar las infecciones con este virus debido a que el TMV mantiene su estructura y actividad en la ceniza del cigarro cuando el tabaco proviene de un campo infectado con el virus (Hull, 2002). El AMV infecta una amplia gama de cultivos agrícolas de importancia económica; es causa de importantes pérdidas en los cultivos de chile en países como Bulgaria, Hungría, Yugoslavia, México y Estados Unidos de Norteamérica. La frecuencia de este virus se incrementa cuando el cultivo de chile se

were CMV, TMV and AMV, which are worldwide distributed (Alonso-Prados *et al.*, 1998; Hull, 2002; Himmel, 2003). The CMV is one of the most important viruses because of its economic impact (Alonso-Prados *et al.*, 1998), because of its extensive host range (Hull, 2002) and because of its efficient transmission in a non-persistent manner by more than 75 aphids species, as well as its mechanical transmission and by seed (Murphy, 2003; Astier *et al.*, 2007); all of the above, may be considered to take preventive actions in our region through an integrated pest management, as well as with the use of certified seeds and, whenever possible, avoid the plants manipulation. The TMV has infected crops of the genus *Capsicum*, where it causes yield losses of up to 70% in susceptible crops. The frequency of this virus is increased in the chili pepper crops because of the seedlings manipulation during transplant or during plant development, because this virus is transmitted primarily by contact and mechanically (Himmel, 2003). In addition, workers often smoke during working hours, which is a risk of contamination to initiate infection with this virus because the TMV structure and activity remains in the ash of the cigar when the tobacco comes from a virus infected area (Hull, 2002). AMV infects a wide range of economically important agricultural crops; it causes major chili crop losses in countries such as Bulgaria, Hungary, Yugoslavia, Mexico and the United States. The frequency of this virus increases when the chili crop is close to alfalfa fields and it can cause losses in crop yield by up to 65% (Hull, 2002). This virus may be an important risk in this region, which usually also produces alfalfa and it is very common to find this crop near to chili fields, favoring the flow of insect vectors between crops and thus the spread of virus. The AMV is transmitted in a non-persistent manner by at least 14 species of aphids, including the green peach aphid, pea aphid, and blue alfalfa aphid (Hull, 2002; Creamer, 2003; Astier *et al.*, 2007).

On the other hand, the PVY virus was found in the four sites of the south-central region, so it is important to understand its biology and distribution in order to establish preventive control actions. The PVY virus has also been reported in Puebla, Toluca, Coahuila and Nuevo Leon and it is considered one of the most damaging viruses in chili pepper, tomato and tobacco plants, as it causes significant economic losses in these crops (Luis-Arteaga and Ponz, 2003). It is possible to distinguish several PVY groups, according to the severity of symptoms caused in chili peppers. Fanigliulo *et al.* (2005), reported a PVY recombinant strain ((PVY^{NP})) which induces veinal necrosis in chili peppers; Also, Llave *et al.* (1999) reported the pathotypes PVY 0, PVY 1 and PVY 1-2 in chili pepper crops. This virus is transmitted by seed and by aphids in a nonpersistent manner; *Myzus persicae* aphid is the most efficient species in many regions (Hull, 2002; Luis-Arteaga and Ponz, 2003), which should be monitored in this region in order to take control actions before it poses a risk to chili crops. Although the INSV, TRSV, ToRSV and TSWV viruses have been reported in Mexico affecting chili crops, it was not possible to detect in any of the locations studied in this region. This suggests that the south-central region could

encuentra cerca de las plantaciones de alfalfa y puede causar pérdidas en el rendimiento del cultivo hasta en un 65% (Hull, 2002). Este virus podría ser un riesgo importante en esta región, ya que por lo general también se produce alfalfa y es frecuente encontrar plantaciones de este cultivo cercanas a los campos de chile, favoreciendo el flujo de insectos vectores entre los cultivos y con ello la diseminación del virus. El AMV es transmitido de manera no persistente por al menos 14 especies de áfidos, incluyendo el áfido verde del durazno, el áfido del chícharo y el áfido azul de la alfalfa (Hull, 2002; Creamer, 2003; Astier *et al.*, 2007).

Por otro lado, el virus PVY se encontró en las cuatro localidades de la región centro-sur, por lo que es importante conocer su biología y su distribución para tomar acciones preventivas de control. El PVY también se ha reportado en Puebla, Toluca, Coahuila y Nuevo León y es considerado uno de los virus más dañinos en plantas de chile, tomate y tabaco, ya que causa pérdidas económicas importantes en estos cultivos (Luis-Arteaga y Ponz, 2003). Pueden distinguirse muchos grupos de razas de PVY de acuerdo a la severidad de síntomas que causa en chile. Fanigliulo *et al.* (2005) reportaron una cepa recombinante de PVY (PVY^{NP}) que induce necrosis venal en chile; asimismo, Llave *et al.* (1999) reportaron los patotipos de PVY 0, PVY 1 y PVY 1-2 en el cultivo de chile. Este virus se transmite por semilla y por áfidos en forma no persistente; el áfido *Myzus persicae* es la especie más eficiente en muchas regiones (Hull, 2002; Luis-Arteaga y Ponz, 2003), el cual debería de monitorearse en esta región para tomar acciones de control antes de que éste represente un riesgo para el cultivo de chile. Aunque los virus INSV, TRSV, ToRSV y TSWV se han reportado en México afectando el cultivo de chile, no fue posible su detección en ninguna de las localidades estudiadas en esta región. Lo anterior sugiere que la región centro-sur podría estar libre de estos virus y por lo tanto se deberían tomar acciones para prevenir su entrada, ya que estos virus en general son de fácil transmisión si no se tiene cuidado al momento de seleccionar la semilla o manipular las plántulas tanto en invernadero como en campo.

En la región norte, los virus con mayor frecuencia fueron TRSV, TBSV e INSV. Rodríguez *et al.* (2004) en un estudio de detección de enfermedades virales en Venezuela, reportaron que el virus TRSV presentó una incidencia del 59%, la cual fue similar a los resultados obtenidos para este virus en la región norte. Este virus se transmite mecánicamente, por semilla y por nematodos (Hull, 2002; Atier *et al.*, 2007). La diseminación por nematodos sería poco eficiente debido a la baja movilidad de éstos a grandes distancias dentro de las plantaciones (Hull, 2002). Su importancia está en que podrían ser diseminadores de virus a partir de inóculo primario, básicamente a plantas vecinas o a corta distancia cuando se utiliza riego por surcos y eventualmente pueden ser movidos a grandes distancias con restos de suelo en implementos mecanizados (Rodríguez *et al.*, 2004).

El virus TBSV particularmente infecta tomate en invernaderos y árboles frutales en varias regiones del mundo (Astier *et al.*, 2007). Este virus no es común en el cultivo de

be free of these viruses and, therefore, preventive actions should be taken, as these viruses are generally easily transmitted if not careful when selecting the seed or by manipulate the seedlings, in both greenhouse and field.

In the northern region, the most frequent viruses were TRSV, TBSV and INSV. Rodríguez *et al.* (2004) in a study of detection of viral diseases in Venezuela, reported that the TRSV virus had a 59% incidence, which was similar to the results obtained for this virus in the northern region. This virus is mechanically transmitted, by seed or by nematodes (Hull, 2002; Atier *et al.*, 2007). The spread by nematodes would be inefficient due to the low mobility of these in long distances within plantations (Hull, 2002). Their main significance is that they could be disseminators of viruses from primary inoculum, basically to neighbor plants or to those located at short distances when furrow irrigation is used and may eventually be moved over long distances with traces of soil in mechanical tools (Rodríguez *et al.*, 2004).

The TBSV virus particularly infects greenhouse tomatoes and orchards in several regions of the world (Astier *et al.*, 2007). This virus is not common in chili crops and few studies mention the natural infection of chili pepper plants with TBSV (Fischer and Lockhart, 1977); however, in this study, the TBSV was present in the northern region and was one of the most abundant, so this might be the first report of this virus in Mexican chili pepper crops. The TBSV is transmitted mechanically, by seed, by contact, by vegetative propagation or sometimes by the *Olpidium* spp. fungus (Astier *et al.*, 2007). This lays the foundation for further studies on the complete characterization of this virus and its management in Chihuahua State.

The INSV virus is currently worldwide distributed (Kuo *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2009). This virus is devastating for ornamentals and it was first detected in New Zealand, where there is an ongoing research about the virus distribution in different hosts (Elliott *et al.*, 2009); its global spread is mainly attributed to its vector, the *Frankliniella occidentalis* thrips. Although the INSV is rare in outdoors crops, Kuo *et al.* (2014) reported its presence in lettuce crops in California, USA, with devastating results; Gonzalez-Pacheco and Silva-Rosales (2013) reported this virus for the first time in tomatillo and chili pepper plants in Mexico after an assessment in Guanajuato and Queretaro States. In this study, the INSV was detected for first time in the northern region of Chihuahua State, with a very high frequency.

The highest virus diversity and incidence was registered in the CS2 site with seven viruses, where AMV, TMV and PMMoV where outstanding for their incidence; the N4 site had eight viruses, with TBSV, TRSV and INSV standing out for their incidence (Tables 1 and 2). These facts make the sites a source of dispersion of the detected viruses.

Multiple infections. From the two chili pepper producing regions in Chihuahua state, 44% of the positive samples from the south-central region showed mixed viral infections in combinations from two to six viruses (Table 3); in the northern region, from the total positive samples, 78% relates to mixed infections with combinations from two to five viruses (Table 4). Garzón-Tiznado *et al.* (2005) found a

chile y escasos estudios mencionan la infección natural de plantas de chile con TBSV (Fischer y Lockhart, 1977); sin embargo, en este estudio el TBSV se presentó en la región norte y fue uno de los más abundantes, por lo que este podría ser el primer reporte de este virus en el cultivo de chile en México. El TBSV se transmite en forma mecánica, por semilla, por contacto, por propagación vegetativa y en ocasiones por el hongo *Oplidium* spp. (Astier *et al.*, 2007). Lo anterior establece las bases para un estudio posterior sobre la caracterización completa de este virus y su manejo en el estado de Chihuahua.

El virus INSV se encuentra distribuido a nivel mundial (Kuo *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2009). Este virus es devastador de plantas ornamentales, detectado por primera vez en Nueva Zelanda, y donde se siguen realizando estudios de distribución del virus en diversos hospederos (Elliott *et al.*, 2009); su dispersión mundial se le atribuye principalmente a su vector, el trips *Frankliniella occidentalis*. Aunque el INSV no es muy frecuente en cultivos a cielo abierto, Kuo *et al.* (2014) reportaron su presencia en cultivos de lechuga en California, EUA con resultados devastadores; González-Pacheco y Silva-Rosales (2013) lo reportaron por primera vez en plantas de tomatillo y de chile en México a través de una evaluación en los estados de Guanajuato y Querétaro. En el presente estudio, se detectó el INSV por primera vez en la región norte del estado de Chihuahua, con una frecuencia alta.

La mayor diversidad e incidencia de virus se registró en las localidades CS2 con siete virus, donde destacan por su incidencia AMV, TMV y PMMoV y N4 con ocho virus, destacando por su incidencia TBSV, TRSV e INSV (Cuadros 1 y 2). Lo anterior convierte a estas localidades en una fuente de dispersión de los virus detectados.

Infecciones múltiples. De las dos regiones productoras de chile en el estado de Chihuahua, el 44% de las muestras positivas de la región centro-sur mostraron infecciones virales mixtas en combinaciones de dos a seis virus (Cuadro 3); en la región norte, del total de muestras positivas, el 78% se relaciona con infecciones mixtas con combinaciones de dos a cinco virus (Cuadro 4). Garzón-Tiznado *et al.* (2005) encontraron un 49% de infecciones mixtas en chile en la región centro-norte del pacífico mexicano, coincidiendo a lo reportado en este estudio para la región centro sur; pero con un valor inferior al de la región norte. Asimismo, estos autores reportaron la combinación TEV-CMV como la más frecuente, similar a lo detectado en la región centro-sur de este estudio. Afouda *et al.* (2013) obtuvieron infecciones mixtas de dos y tres virus, coincidiendo solamente con la mezcla de CMV-TMV de la región centro-sur, que fue una de las más abundantes. Las combinaciones CMV-TMV y CMV-TRSV fueron detectadas en un trabajo previo en el cultivo de chile en Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2004), las cuales coinciden con las combinaciones más abundantes para la región centro-sur y norte, respectivamente de este estudio. Green (2003) reportó infecciones virales múltiples de PMMoV-TMV y PMMoV-ToMV en cultivos de chile a campo abierto, coincidiendo la primera combinación con este estudio para la región centro-sur, pero no fue de las más frecuentes. Otros

49% of mixed infections in chili pepper in the central northern region of the Mexican Pacific, this fact coincides with this study for the south-central region; but with a lower value in the northern region. Also, these authors reported the TEV-CMV combination as the most frequent combination, similar to that detected in the south-central region of this study. Afouda *et al.* (2013) obtained mixed infections of two and three viruses, only coinciding with the mixture CMV-TMV in the south-central region, which was one of the most abundant mixtures. The CMV-TMV and CMV-TRSV combinations were detected in a previous study on the chili pepper crops in Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2004), which coincide with the most abundant combinations for the south-central and northern regions, respectively, in this study. Green (2003) reported multiple viral infections of PMMoV-TMV and PMMoV-ToMV in open air chili crops, coinciding the first combination with this study for the south-central region, but it was not the most frequent. Other authors have reported that the PMMoV-PVY-TEV mixture occurs frequently in chili pepper crops (Hull, 2002; Murphy and Zitter, 2003), but it did not appear on any combination of three viruses in the two evaluated Chihuahua regions. The INSV has been found in mixed infections with TSWV (Elliott *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2014); but in this study, it was detected in triple infections always associated to TRSV and TBSV and only in five virus infections, the INSV was detected with TSWV.

CONCLUSIONS

The incidence and severity index of plants with virus-like symptoms on chili pepper crops were higher in the northern region. In the south-central region the CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY and PepMV viruses were detected; and in the northern region TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV and ToRSV viruses were detected. The CMV, TMV and AMV viruses predominated in the south-central region and TRSV, TBSV and INSV viruses predominated in the northern region. About half of the positive samples in the south-central and most of the northern region, were mixed viral infections. In the south-central region, infections of up to six virus occurred, while in the northern only up to five; mixed infections of two viruses were the most abundant in both regions. The TMV was present in almost all mixed infections in the south-central region, while in the northern region, the TRSV-TBSV association was in almost every combination. This is the first study reporting the presence of 12 species of viruses and the first to show mixed infections in Chihuahua state. Also, the TBSV is reported for the first time in Mexican chili pepper crops. With all of the above, it is necessary to raise awareness among chili growers to carry out a good crop management at all stages of the production system in order to prevent viral infections. This study might start a new research area related to the characterization of detected viral species.

Acknowledgments. The authors wish to thank to Fundación Produce- Chihuahua and to the Consejo Estatal de Productores de Chile del estado de Chihuahua for

autores reportan que la mezcla PMMoV-PVY-TEV ocurre frecuentemente en campos cultivados con chile (Hull, 2002; Murphy y Zitter, 2003), pero ésta no se presentó en ninguna combinación de tres virus en las dos regiones evaluadas en Chihuahua. El INSV se ha encontrado en infecciones mixtas con el TSWV (Elliott *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2014); pero en este estudio, se detectó en infecciones triples asociado siempre a TRSV y TBSV y sólo en infecciones de cinco virus, el INSV se detectó con el TSWV.

CONCLUSIONES

La incidencia y el índice de severidad de plantas con síntomas de tipo viral en el cultivo de chile fueron mayores en la región norte. En la región centro-sur se detectaron los virus CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY y PepMV, y en la región norte fueron TRSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV, PVY, TSWV y ToRSV. Los virus CMV, TMV y AMV predominaron en la región centro-sur y TRSV, TBSV e INSV en la región norte. Cerca de la mitad de las muestras positivas en la región centro-sur y la mayoría de las de la norte fueron infecciones virales mixtas. En la región centro-sur se presentaron infecciones de hasta de seis virus, mientras que en la norte hasta de cinco; las infecciones mixtas de dos virus fueron las más abundantes en ambas regiones. El TMV se presentó en casi todas las infecciones mixtas en la región centro-sur, mientras que en la norte, la asociación TRSV-TBSV estuvo en casi todas las combinaciones. Este es el primer estudio que reporta la presencia de 12 especies de virus y el primero en mostrar las infecciones mixtas en el estado de Chihuahua. Asimismo, el TBSV se reporta por primera vez en el cultivo de chile en México. Con lo anterior, es necesario concientizar a los productores de chile para que lleven a cabo un buen manejo del cultivo en todas las etapas del sistema de producción para prevenir infecciones virales. Con este estudio se podrían iniciar nuevos trabajos de investigación relacionados con la caracterización de las especies virales detectadas.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Fundación Produce-Chihuahua y al Consejo Estatal de Productores de Chile del estado de Chihuahua por financiar esta investigación, Clave: 08-2007-004.

LITERATURA CITADA

- Afouda LAC, Kotchofa R, Sare R, Zinsou V and Winter S. 2013. Occurrence and distribution of viruses infecting tomato and pepper in Alibori in northern Benin. *Phytoparasitica* 41:271-276.
- Agrios GN. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Alonso-Prados JL, Aranda MA, Malpica JM, García-Arenal F and Fraile A. 1998. Satellite RNA of Cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology* 88:520-524.
- Astier S, Albouy J, Maury Y, Robaglia C and Lecoq H. 2007. *Principles of plant virology*. Science Publishers. Enfield, NH, USA. 472 p.
- Clark MF and Adams AN. 1977. Characteristics of the funding this research, Code: 08-2007-004.
- microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
- Creamer R. 2003. *Alfalfa mosaic virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 24-26.
- Cruz FM y Frías TGA. 1997. Guía ilustrada de la prueba de Inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. México, D.F. 23 p.
- Elliott DR, Lebas BSM, Ochoa-Corona FM, Tang J and Alexander BJR. 2009. Investigation of *Impatiens necrotic spot virus* outbreaks in New Zealand. *Australian Plant Pathology* 38:490-495.
- Escalona AMA. 2002. Interacción de plantas de café fertilizadas con fósforo e inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares y *Phoma costarricense* Echandi. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima, México. 106 p.
- Fanigliulo A, Comes S, Pacella R, Harrach B, Martin DP and Crescenzi A. 2005. Characterisation of *Potato virus Y* nnp strain inducing veinal necrosis in pepper: a naturally occurring recombinant strain of PVY. *Archives of Virology* 150:709-720.
- Fischer HU and Lockhart BEL. 1977. Identification and comparison of two isolates of *Tomato bushy stunt virus* from pepper and tomato in Morocco. *Phytopathology* 67:1352-1355.
- Garzón-Tiznado A, Celis-Aramburo TJ, Velarde-Félix S, Ceballos-Ruiz J, Barbosa-Jasso P, Reyes-Moreno C, Martínez-Carrillo JL, Sánchez-Peña P y Hernández-Verdugo S. 2005. Detección de virus fitopatógenos en la región centro-norte del pacífico mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:238-245.
- González LR y Delgadillo SF. 1989. Inclusiones producidas por algunos virus fitopatógenos. *Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Xalapa, Veracruz, México. Resumen, p. 89.
- González-Pacheco BE and Silva-Rosales L. 2013. First report of *Impatiens necrotic spot virus* in Mexico in tomatillo and pepper plants. *Plant Disease* 97: 1124.
- Green SK. 2003. *Pepper mild mottle virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 32-33.
- Guigón-López C y González-González PA. 1999. Manejo integrado de la virosis del chile (*Capsicum annum* L.) en el sur de Chihuahua. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:8-16.
- Harris M. 1994. Enfermedades virales de la calabacita. pp. 42-43. En: Katie O' Keeffe-Swank, Ana Reho, and Luis Bringas (eds.). *Productores de Hortalizas*. Willoughby, Ohio, EUA. 70 p.
- Hernández S, Fernández C y Baptista P. 1998. *Metodología de la Investigación*. Segunda Edición. Editorial Mc Graw

- Hill. México. 501 p.
- Himmel PT. 2003. Tobacco mosaic virus. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 38-39.
- Hull R. 2002. Mathews' Plant Virology. Fourth edition. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1001 p.
- Kuo YW, Gilbertson RL, Turini T, Brennan EB, Smith RF and Koike ST. 2014. Characterization and Epidemiology of Outbreaks of *Impatiens necrotic spot virus* on Lettuce in Coastal California. Plant Disease 98:1050-1059.
- Llave C, Martínez B, Díaz-Ruiz JR and López-Abella D. 1999. Serological analysis and coat protein sequence determination of *Potato virus Y* (PVY) pepper pathotypes and differentiation from other PVY strains. European Journal of Plant Pathology 105:847-857.
- Luis-Arteaga M and Ponz F. 2003. *Potato virus Y*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 35-36.
- Murphy JF and Zitter TA. 2003. Pepper mottle virus. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 33-34.
- Murphy JF and Warren CE. 2003. Diseases caused by viruses. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 23-24.
- Murphy JF. 2003. *Cucumber mosaic virus*. Compendium of pepper diseases. APS PRESS, p. 29-31.
- Núñez F, Ortega GR y Costa J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Editorial Mundi Prensa. España. 607 p.
- Pérez ML y Rico JE. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. Primera edición. Universidad de Guanajuato. 143 p.
- Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Pelé JR, Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R, Rivera-Bustamante RF. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:187-197.
- Robles-Hernández L, González-Franco AC, Gill-Langarica EM, Pérez-Moreno L y López-Díaz JC. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. Tecnociencia Chihuahua 4:72-86.
- Rodríguez Y, Rangel E, Centeno F, Mendoza O y Parra A. 2004. Detección de enfermedades virales afectando al pimentón en los municipios Iribarren, Jiménez y Torres del estado Lara, Venezuela, utilizando la técnica ELISA. Revista de la Facultad de Agronomía, Caracas Venezuela 21:1-8.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx (consulta, junio 2014).
- Sepúlveda RP, Larraín SP, Quiroz EC, Rebufel A y Graña SF. 2005. Identificación e incidencia de virus en pimiento en la zona centro norte de Chile y su asociación con vectores. Agricultura Técnica 65:235-245.
- Tun-Azul JC, Santamaría BF y Avilés BWI. 2004. Efecto del sombreado sobre el comportamiento de Chile (*Capsicum annuum* L.) en suelos pedregosos de Yucatán. Primera convención Mundial del Chile. Yucatán, México. p. 211-217.
- Vidales FJA y Alcantar RJJ. 1989. Ataque de la virosis durante la floración y su efecto sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.). Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, México. Resumen, p 67.