



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular
de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas
en hortalizas**

Tesis que presenta

Clara Teresa Monreal Vargas

Para obtener el grado de

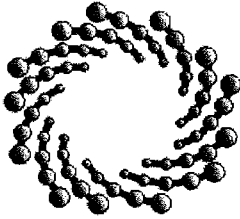
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2005.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 008 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de julio del año 2005, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Clara Teresa Monreal Vargas

sobre la Tesis intitulada:

Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes julio de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Clara Teresa Monreal Vargas y aprobada el 28 de junio de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dr. Sergio Casas Flores

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y con el apoyo de SIHGO (Proyecto No 2002.02.01.03) y la Fundación PRODUCE, San Luis Potosí.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice	i
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista General de Cuadros	vii
Lista General de Figuras	viii
RESUMEN GENERAL	xi
SUMMARY	xiii
Capítulo 1. Diagnóstico de enfermedades del jitomate y del chile en el altiplano potosino	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Principales enfermedades del jitomate y chile de importancia económica	5
1.1.1. Enfermedades bacterianas	5
1.1.1.1. Cáncer bacteriano	5
1.1.1.2. Mancha bacteriana	7
1.1.1.3. Mancha bacteriana (Peca)	9
1.1.1.4. Marchitamientos bacterianos	10
1.1.1.4.1. Necrosis de la médula	10
1.1.1.4.2. Marchitamiento bacteriano	10
1.1.2. Enfermedades fungosas	12
1.1.2.1. Cenicilla	12
1.1.2.2. Tizón tardío	13
1.1.2.3. Marchitez del chile	14
1.1.2.4. Marchitez vascular o Fusariosis	15
1.1.2.5. Pudrición de la corona y raíz	16
1.1.2.6. Marchitez por <i>Rhizoctonia solani</i>	17
1.1.2.7. Marchitez por <i>Verticillium</i>	19
1.1.2.8. Tizón temprano	20
1.1.3. Enfermedades virales	22
1.1.3.1. Marchitez manchada (Tomato Spotted Wilt Virus)	22
1.1.3.2. Virus del mosaico del tabaco (TMV)	25
1.1.3.3. Virus del mosaico del pepino (CMV)	26

	Página
1.1.4. Fitoplasmosis	27
1.1.4.1. Fitoplasmosis del jitomate	27
1.2. Diagnóstico de fitopatógenos	29
1.2.1. Diagnóstico molecular de hongos	35
1.2.2. Diagnóstico molecular de bacterias	40
1.2.3. Diagnóstico molecular de fitoplasmas	45
OBJETIVOS	52
Objetivo general	52
Objetivos específicos	52
II. MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1. Colecta de muestras	53
2.2. Cepas de referencia	53
2.3. Reactivos y medios de cultivo	53
2.4. Extracción de ADN	54
2.5. Diagnóstico de enfermedades basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	56
2.6. Identificación de hongos por secuenciación de las clonas	57
2.7. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> Top 10 por el método de CaCl ₂	59
2.8. Transformación de bacterias	59
III. RESULTADOS	61
3.1. Diagnóstico de enfermedades en jitomate por la técnica de la PCR	61
3.2. Diagnóstico de enfermedades en chile por PCR	68
3.3. Identificación de hongos por clonación y secuenciación	72
IV. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	77
4.1. Cáncer bacteriano	77
4.2. Fitoplasmosis	81
4.3. Diagnóstico de hongos fitopatógenos por PCR con los oligonucleótidos ITS 1-ITS4	84
4.3.1. Hongos involucrados en la Marchitez del chile	87
4.3.2. Cáncer del tallo por <i>Alternaria arborescens</i>	91
4.3.3. Tizón temprano	93

	Página
CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS	96
Capítulo 2. Desarrollo de una nueva metodología para el diagnóstico e identificación de begomovirus	112
RESUMEN	113
I. INTRODUCCIÓN	115
1.1. Organización del genoma de los begomovirus	116
1.2. Replicación de los begomovirus	118
1.3. Daños causados por begomovirus a cultivos de jitomate y chile así como su distribución en América	120
1.3.1. Begomovirus en Estados Unidos de América	120
1.3.2. Begomovirus en América del Sur	122
1.3.3. Begomovirus en la región del Caribe	123
1.3.4. Begomovirus en México	124
1.3.5. Begomovirus y nuevo biotipo de <i>Bemisia tabaci</i>	125
1.4. Identificación de Begomovirus	127
OBJETIVOS	132
Objetivo general	132
Objetivos específicos	132
II. MATERIALES Y MÉTODOS	133
2.1. Diseño de oligonucleótidos universales	133
2.2. Begomovirus	133
2.3. Extracción de ADN	134
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	134
2.5. PCR anidado	135
2.6. Caracterización de la región Rep Mot 1/CPc70 por patrón de restricción (RFLP)	136
2.7. Clonación y secuenciación	136
III. RESULTADOS	138
3.1. Diseño y síntesis de “iniciadores” universales	138
3.2. Evaluación de los juegos de iniciadores para la	

	Página
amplificación de diferentes regiones del ADN-A de los begomovirus	141
3.3. Caracterización de begomovirus por patrones de Restricción	147
3.4. Identificación de begomovirus en muestras vegetales por PCR-RFL y secuenciación	149
IV. DISCUSIÓN	156
CONCLUSIONES	166
REFERENCIAS	167

DEDICATORIA

Por el tiempo que hemos dejado de compartir:

A mi compañero de vida:

Amando

A mis hijos:

Luis Amando

Carlos Amando

Rafael Amando

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Potosino de Investigación Ciencia y Tecnología por ser una institución que fomenta el desarrollo de la investigación y permitió que realizara una formación de posgrado de alta calidad.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, a la Facultad de Agronomía y al PROMEP por la beca otorgada y la motivación para una constante superación.

Al SIHGO y a la Fundación PRODUCE por su apoyo financiero para la realización de esta trabajo.

Al Dr. Gerardo R. Arguello Astorga y al Dr. Ángel Alpuche Solís por la dirección de esta tesis y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Dr. Sergio Casas por sus enseñanzas, sugerencias y colaboración en el desarrollo de este trabajo, además de su compañerismo.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por sus enseñanzas y compañerismo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas

Especial agradecimiento a mi esposo e hijos por su apoyo incondicional.

LISTA GENERAL DE CUADROS

Capítulo 1. Diagnóstico de enfermedades del jitomate y del chile en el altiplano potosino

Cuadro		Página
1	Enfermedades epidémicas del jitomate detectadas en la región de Arista, SLP.	31
2	Patógenos del jitomate identificados por técnicas moleculares.	33
3	Oligos universales diseñados para la detección e identificación de fitoplasmas.	48
4	Protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos vegetales infectados, y de cepas microbianas de referencia.	55
5	Protocolo de extracción de ADN para microorganismos del suelo.	56
6	Condiciones utilizadas para la amplificación por la técnica de PCR de fragmentos de ADN indicadores de enfermedades provocadas por bacterias y hongos.	58
7	Secuencias del ADN amplificado con los oligos ITS1-ITS4 de los hongos fitopatógenos y el resultado del análisis tipo Blast de las secuencias obtenidas.	73 y 74

Capítulo 2. Desarrollo de una nueva metodología para el diagnóstico e identificación de begomovirus

Cuadro		Página
1	Características de los géneros de la familia Geminiviridae.	116
2	Diversos nombres de los genes ubicados en los componentes A y B de los Begomovirus.	117
3	Protocolo de extracción de ADN-modificación del método de Green y Thompson (1999).	135
4	Oligonucleótidos utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-A de Begomovirus.	139
5	Tamaño de la región Rep Mot 1/ CP-c70 de los begomovirus que se utilizaron en este trabajo.	146
6	Número y tamaño de bandas obtenidas por digestión de la región Rep Mot 1/ CP-c70 de los diferentes begomovirus utilizados en este trabajo, con las enzimas <i>Msp</i> I y <i>Hha</i> I.	147
7	Secuencias de las clonas obtenidas de chile y jitomate	154

LISTA GENERAL DE FIGURAS

Capítulo 1. Diagnóstico de enfermedades del jitomate y del chile en el altiplano potosino

Figura		Página
1	Regiones conservadas y variables del ADN ribosomal de hongos	36
2	Organización del DNA ribosomal en bacterias.	42
3	Árbol filogenético de 42 especies diferentes de fitoplasmas construido por el análisis de la secuencia completa del gen 16r RNA y seis miembros de la clase Mollicutes.	47
4	Enfermedades que afectaron al jitomate en la región de Arista en ciclo de cultivo 2004.	62
5	Detección por la técnica de la PCR de la bacteria <i>C. michiganensis michiganensis</i> en extractos de diversos tejidos de una planta de jitomate con síntomas de cáncer bacteriano.	63
6	Análisis por PCR de suelos colectados de diferentes parcelas e infestado artificialmente con diferentes concentraciones de <i>C. michiganensis michiganensis</i> .	63
7	Detección de <i>C. michiganensis michiganensis</i> en extractos de raíz de muestras de jitomate con síntomas de Cáncer bacteriano.	63
8	Estadios del psilido relacionado con la fitoplasmosis	65
9	Detección de fitoplasmas en extractos de jitomate con síntomas característicos, por PCR convencional y anidada.	65
10	Productos de la segunda reacción del PCR anidado específico para fitoplasmas con los oligos R16mF2/R16mR1 y R16F2n/R16R2.	66
11	Diagnóstico de Tizón temprano.	67
12	Diagnóstico de la Marchitez por <i>Rhizoctonia solani</i> .	69
13	Diagnóstico de la Marchitez por <i>Phytophthora capsici</i>	70

14	Marchitez del chile por <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium sp.</i>	71
15	Sintomatología del Cáncer del tallo y relación filogenética de las cepas de <i>Alternaria</i> .	75
16	Relación filogenética de <i>Phytophthora capsici</i> de la muestra de chile de Villa de Arista, con otros aislamientos de <i>P. capsici</i> y otras especies de <i>Phytophthora</i> .	76
17	Relación filogenética del aislamiento de <i>Rhizoctonia solani</i> de la muestra de chile del Altiplano Potosino (<i>R. solani</i> 27a) con diferentes aislamientos de <i>Thanathephorus cucumeris</i> .	76
18	Movilidad electroforética diferencial de los productos de PCR obtenidos con los oligos ITS1/ITS4 para algunos hongos fitopatógenos .	85

Capítulo 2. Desarrollo de una nueva metodología para el diagnóstico e identificación de begomovirus

Figura		Página
1	Organización genómica de un begomovirus bipartita típico como el PHV y un monopartita como el TYLCV.	119
2	Oligonucleótidos universales degenerados y las diferentes regiones del componente A de los begomovirus que se pueden amplificar con ellos.	140
3	El tamaño variable amplificado por PCR de la región Rep-Mot1/CP c70, permite diferenciar a los begomovirus, distinguiéndose por su origen geográfico a dos grandes grupos: begomovirus del viejo mundo y begomovirus de América.	142
4	Regiones del ADN-A que se pueden amplificar por PCR anidado.	143
5	Amplificación de diversas regiones del ADN-A, con los diferentes juegos de oligonucleótidos ensayados.	144
6	Diferentes regiones del ADN-A de PHV amplificadas por PCR anidado a partir del producto obtenido en la	145

primera etapa de amplificación con los oligonucleótidos YMAC-for/YMAC-rev.

7	Tamaño variable de los productos de amplificación de la región Rep-Mot 1/CP c70.	146
8	Patrón de restricción de la región Rep-Mot1/CP c70 obtenido con las enzimas de restricción 1) <i>Msp I</i> y 2) <i>Hha I</i> , el cual caracteriza la identidad de siete begomovirus.	148
9	Patrón de restricción diferencial de dos begomovirus originarios de América (PHV y PYMV) y dos begomovirus del Viejo Mundo (TYLCV y ACMV), obtenido de la región Rep-Mot1/CP c70 con las enzimas 2) <i>MspI</i> , 3) <i>Hha I</i> .	149
10	Síntomatología característica de begomovirus.	151
11	Diferenciación de dos begomovirus (A y B) en una muestra de girasol por el patrón de restricción de la región Rep-Mot1/CP c70 con las enzimas <i>Msp I</i> (carril 2), <i>Hha I</i> (3), <i>Hind III</i> (4), <i>Hinc II</i> .	152
12	Patrón de restricción obtenido con las enzimas <i>Msp1</i> (carril 2), <i>Hha1</i> (3), <i>Hind III</i> (4), <i>Hinc II</i> (5), que identifica a PHV originario de Tamaulipas.	152
13	Variantes divergentes de PHV identificadas en muestras de jitomate y chile de Jalisco, y chile de Campeche y su relación filogenética con el PHV de Sinaloa y PHV originario de Tamaulipas.	155

RESUMEN GENERAL

La horticultura es una de las actividades agrícolas de mayor importancia económica en nuestro país, destacando en ella el cultivo del tomate y el chile. Entre los principales factores que limitan la producción de hortalizas figuran las enfermedades causadas por virus, bacterias, fitoplasmas y hongos. Los problemas fitosanitarios provocados por estos agentes biológicos, y sus graves secuelas económicas, pueden disminuirse enormemente a través del diagnóstico preciso y oportuno de las enfermedades que surgen en los campos agrícolas, lo que permite adoptar de manera rápida medidas para controlar la propagación de los patógenos. El desarrollo de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades ha beneficiado de manera extraordinaria a la agricultura de países avanzados, pero en México estas tecnologías se usan todavía de modo esporádico y a pequeña escala. En el estado de San Luis Potosí, que es un productor importante de tomate y otras hortalizas, no existía hasta muy recientemente ningún laboratorio o centro de investigación que realizase diagnóstico fitopatológico por métodos moleculares. El presente trabajo representa el primer esfuerzo sistematizado para implementar en este Estado una serie de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico e identificación de los fitopatógenos bacterianos, fúngicos y virales que con más frecuencia afectan a los cultivos hortícolas del Estado.

El trabajo de investigación que aquí presentamos consta de dos partes distintas, que solo tienen en común el uso de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el objetivo de identificar fitopatógenos. En la primera parte se estandarizaron técnicas moleculares para el diagnóstico de algunas enfermedades bacterianas y fúngicas del jitomate y el chile que tienen gran incidencia en el altiplano potosino. Se establecieron métodos de extracción de ADN a partir de muestras de tejido vegetal enfermo y de cultivos axénicos de algunos patógenos, y se desarrolló un método especial de extracción de ADN de microorganismos presentes en el suelo que mostró ser muy eficiente. Se probaron varios pares de oligonucleótidos sintéticos previamente diseñados para el diagnóstico de fitopatógenos específicos, y se determinaron las condiciones más apropiadas para llevar a cabo la amplificación del ADN con cada uno de esos juegos de iniciadores. Mediante estas técnicas se logró la detección del agente causal del llamado "cáncer bacteriano" *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejidos vegetales, semillas y suelos infestados provenientes de varias áreas hortícolas del Altiplano. Se detectó también por técnicas moleculares una fitoplasmosis del jitomate transmitida por el psílido *Bactericerca* (= *Paratrioza*) *cockerelli* en la región de Arista y el Huizache. Esta enfermedad fue devastadora y se demostró que su etiología es diferente al *Big bud* y *Aster yellow* que son fitoplasmosis bien caracterizadas del tomate. Finalmente, se identificaron mediante el uso de los iniciadores ITS1 e ITS4, a los siguientes hongos en cultivos hortícolas de la región: *Phytophthora capsici* (marchitez del chile), *Rhizoctonia solani* (marchitez del chile) y *Alternaria arborescens* (cáncer del tallo del jitomate). También se detectó por PCR, y por análisis microbiológico paralelo, al llamado "tizón temprano"

(*Alternaria solani*), y se logró determinar que un síndrome de marchitez era provocado por una combinación de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* Los resultados del diagnóstico molecular fueron útiles a los productores de los campos hortícolas que se inspeccionaron durante el estudio, e hicieron posible la elección de los tratamientos de control fitosanitario pertinentes.

El segundo proyecto de investigación que integra el presente trabajo se orientó al desarrollo de nuevos métodos moleculares para el diagnóstico e identificación de begomovirus, un subgrupo de la familia de los geminivirus que ha causado en la última década daños muy severos a la agricultura de nuestro país y otros países latinoamericanos. Estos virus poseen un genoma de DNA circular y de cadena sencilla, son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), e infectan a una gran variedad de plantas dicotiledóneas, incluyendo al chile, el tomate, la calabaza y otras hortalizas. Se diseñaron y probaron experimentalmente 8 nuevos iniciadores “universales” que permitieron amplificar diferentes regiones del genoma A de begomovirus representativos de América, Europa, y África. Con un par de estos iniciadores, Rep-Mot y pCPc70, se amplificó una región genómica que permite distinguir, por la simple observación de la movilidad electroforética relativa de los productos de PCR, a los begomovirus de América de aquellos que provienen de otros continentes. La capacidad del método para identificar de modo preliminar a los virus se incrementó substancialmente al combinar la PCR con el análisis del patrón de restricción del DNA viral obtenido con las enzimas *Msp1* y *Hha1*. Este nuevo método de tipo PCR-RFLP hace factible la estimación rápida y confiable de la diversidad de especies virales en una región geográfica dada, y aumenta la resolución de las técnicas moleculares para detectar infecciones múltiples, como se pudo demostrar en el presente estudio. Adicionalmente, se identificaron variantes del *virus huasteco de chile* (PHV) en muestras de jitomate y chile provenientes de diversas regiones del país. Con la combinación de otro juego de iniciadores universales se logró amplificar, por la técnica de PCR anidado, una región del genoma viral que contiene dos promotores divergentes, de tal forma que los productos de PCR resultantes pueden ser utilizados adicionalmente como fuente de promotores susceptibles de uso en la ingeniería genética de plantas. Los métodos para el diagnóstico e identificación de begomovirus que desarrollamos en el presente trabajo son más sencillos y sensibles, involucran menores costos, y son más versátiles que otros métodos moleculares publicados y actualmente utilizados en los laboratorios de fitopatología de muchos países.

SUMMARY

Horticulture is one of the farming activities of most importance in Mexico. The main horticultural crops (hortcrops) are tomato and pepper and some of the main limitation factors in hortcrops production are the diseases caused by fungi, bacterias, phytoplasmas, viruses and nematodes. Reduction of phytopathologic problems and economic losses caused by plant diseases can be addressed through an opportune and reliable diagnosis both in greenhouses as in field. Once the pathogenic agent is identified, corrective actions can be undertaken in order to avoid greater losses of these agricultural commodities. The development of molecular biology techniques for plant diseases diagnostic, have contributed in reduction of losses and also in the selection of proper disease control treatments mainly in developed countries, however these techniques are available in very few places in Mexico. San Luis Potosi (SLP), is one of the major producers in Mexico of tomato and other hortcrops of economic importance, nevertheless there was not previous report of private laboratories or research groups focused to develop molecular protocols for hortcrops disease diagnosis in this State, in spite of the serious problems of crop losses caused by pathogenic organisms the last agronomic cycles. The current research work aimed to develop and adapt molecular methods for the reliable identification of the main pathogenic agents in the hortcrops regions of SLP. The work was divided in two sections.

In the first one, several methods for bacteria, fungi, and phytoplasmas detection were adapted and standardized for reference strains and different complex matrix such as infected plant tissues and soil, both for tomato and pepper. One of the critical steps is the quality of DNA analyzed and therefore several DNA extraction methods were tested. The adapted ones allowed us to perform the diagnostic efficiently. The bacteria canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, was detected in seeds, plant tissues and soil. This was one of the most devastating diseases found in Villa de Arista region. Also a phytoplasmosis with different etiology from *Big bud* or *Aster yellow* phytoplasmas was detected. To our knowledge this is the first report using molecular methods of phytoplasm detection in SLP. In addition using the ITS1 and ITS4 primers, several fungi were detected: *Phytophthora capsici* (wilt pepper), *Rhizoctonia solani* (wilt pepper), *Alternaria arborescens* (tomato stem canker) and *Alternaria solani* (early blight). The fungi molecular diagnostic was confirmed by microbiological observation. It is important to mention that a syndrome was frequently observed caused by the presence of two fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp.). These results allowed the farmers to choose the adequate control treatment to stop spreading of the diseases, resulting in a significant losses reduction.

In the second section, a new PCR-based method for the identification of begomoviruses was developed. Geminiviruses are a diverse family of plant pathogens that produce devastating diseases in fiber and vegetable crops in tropical and subtropical agroecosystems worldwide. The genus *Begomovirus* is the most diversified and broadly distributed subgroup of the *Geminiviridae* family. The plethora of new begomoviruses isolated from diverse areas around the world requires the development of accurate and simple molecular methods for their rapid and precise

identification. We have developed a PCR-based method that simplify the identification of begomoviruses and makes feasible the discovering of new species. This methodology uses new universal (degenerated) primers to amplify different, overlapping genomic segments of begomoviruses natives from America, Asia and Africa. A pair of these universal primers (i.e., pRepMot and pCPc70) flanking a viral region encompassing both conserved and variable sequences from the *CP* and *Rep* genes plus the intergenic region, were used to amplify viral DNA from infected plant tissues or cloned viruses. The size of the single PCR product was highly variable, ranging from more than 750 bp. in some Old World begomoviruses, to 580-570 bp in certain American viruses. Thus, observation of the relative electrophoretic mobility of the PCR products from field samples, allows to obtaining a preliminary estimation of begomovirus diversity in extensive geographical areas. Moreover, PCR products were digested with restriction enzymes like *MspI* and *HhaI* to establish a methodology that makes feasible the preliminary identification of begomovirus species by PCR-RFLP. The viral region which is amplified with the pRepMot/pCPc70 primers contains two divergent promoters, and new universal primers were designed to selectively amplify the intergenic region encompassing them. This second amplified DNA can then be subcloned into specially designed vectors to directly generate two alternative gene expression cassettes, which could be used in plant biotechnology. The molecular methods developed in this study are more simple, cost effective and versatile than other published methods for begomovirus identification currently in use.

CAPÍTULO 1

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL JITOMATE Y DEL CHILE EN EL ALTIPLANO POTOSINO

RESUMEN

La horticultura es una de las actividades agrícolas de mayor importancia en nuestro país, destacando en ella el cultivo de jitomate y el chile. Los municipios del estado de San Luis Potosí que tienen la mayor producción son los ubicados en la región del altiplano y la zona media: Villa de Arista, Moctezuma, Villa de Guadalupe, y Cedral en la primera región, Río Verde y Cd. Fernández en la segunda. Entre los factores limitantes en la producción de hortalizas figuran en un plano importante las enfermedades causadas por hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y nemátodos. En la actualidad, la solución de los problemas fitopatológicos representa uno de los retos más importantes para los productores y los profesionales encargados de planificar y hacer eficientes los sistemas de producción hortícola en nuestro país, que afrontan el problema adicional de no contar con instituciones que realicen un diagnóstico eficiente y oportuno. Para avanzar en este rubro, es necesario establecer técnicas más rápidas y precisas que las pruebas microbiológicas, bioquímicas e inmunológicas, como son las basadas en la llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la amplificación selectiva de secuencias genómicas de los fitopatógenos. El presente trabajo se realizó durante el ciclo 2004, y tuvo por objetivo el establecimiento y estandarización de técnicas moleculares que permitan diagnosticar algunas de las enfermedades del jitomate y del chile que representan los mayores problemas en el altiplano potosino. Se realizaron inspecciones de campo en diferentes predios de Villa de Arista, Moctezuma, Villa de Guadalupe, Cedral y Vanegas. Se registró la sintomatología observada en los cultivos, se colectaron muestras con síntomas característicos, y se determinó la incidencia de cada enfermedad. Se establecieron métodos de extracción de ADN para diversas cepas microbianas, para muestras de tejido vegetal, y un método especial de extracción de ADN de microorganismos presentes en el suelo. Se ensayaron diferentes protocolos para establecer las técnicas moleculares más adecuadas a cada fin, tomando siempre en consideración la sintomatología observada en campo y trabajos reportados en la literatura. Se determinaron las concentraciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción para la PCR, así como las condiciones más apropiadas para llevar a cabo la amplificación del ADN de cada fitopatógeno. Se utilizaron los oligonucleótidos CM₃ y CM₄ para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejidos vegetales, y en semillas y suelo infestados naturalmente. El procedimiento basado en la PCR resultó ser más sensible que la técnica de diagnóstico denominada ELISA. En la región de Arista se determinó, por medio de esa técnica molecular, una incidencia del 100% del cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, en el ciclo 2004. Adicionalmente, se detectó por técnicas moleculares una fitoplasmosis del jitomate transmitida por el psílido *Bactericerca* (= *Paratrioza*) *cockerelli* en la región de Arista y el Huizache, San Luis Potosí. Ésta enfermedad fue devastadora y su etiología es diferente al *Big bud* y *Aster yellow* que son otros tipos de fitoplasmosis. Por otra parte, se identificaron en cultivos del altiplano potosino y mediante el uso de los iniciadores ITS1 e ITS4, a los siguientes hongos: *Phytophthora capsici* (marchitez del chile), *Rhizoctonia solani* (marchitez del chile) y *Alternaria arborescens* (cáncer

del tallo del jitomate). También se detectó por PCR, y por análisis microbiológico paralelo, al llamado Tizón temprano (*Alternaria solani*), y se logró determinar que un síndrome de marchitez era provocado por una combinación de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* Éste ha sido el primer trabajo de diagnóstico molecular de enfermedades de hortalizas desarrollado en un centro de investigación de San Luis Potosí, y los resultados facilitaron en su momento la elección adecuada de los tratamientos de control en campo.

I. INTRODUCCIÓN

En México la horticultura es una de las actividades agrícolas de mayor importancia, tanto en el plano social, como en el económico por la captación de divisas y la generación de empleos. Las principales hortalizas cultivadas en el país son el jitomate y el chile. México es uno de los tres principales países productores de chile en el mundo y el proveedor más importante de Estados Unidos y Canadá. Durante el año 2001 se sembraron 157,000 ha con un rendimiento de 17.7 ton/ha (INEGI, 2002). En el ciclo 2000, San Luis Potosí ocupó a nivel nacional el tercer lugar como productor de jitomate, con una superficie cultivada superior a 4660 hectáreas (ha) y una producción de 139,811 toneladas (ton). Los municipios con mayor producción de jitomate ubicados en el altiplano son: Villa de Arista, Moctezuma, Villa de Guadalupe, Cedral; y los de la zona media: Rioverde y Ciudad Fernández (INEGI, 2002).

Entre los factores limitantes para la producción de estas hortalizas se encuentran las enfermedades causada por hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y nemátodos. Se sabe que son muchas las enfermedades que afectan estos cultivos y que provocan pérdidas económicas que en algunos casos alcanzan el 100%. Por ejemplo, en la planicie huasteca se sembraban de 3000 a 4000 ha de jitomate anuales, sin embargo, en la década de los 90, el cultivo se vio afectado por la mosquita blanca, la cual transmite enfermedades virales que llegan a causar pérdidas que representan hasta el 100% de la producción (INEGI, 1999; Polston y Anderson, 1997) lo que originó una disminución considerable de la superficie sembrada. A partir de 1985, las enfermedades virales se constituyeron en uno de los principales problemas limitantes para la producción de chile, ocasionando daños económicos que fluctuaron entre un 20 y un 100%, estos factores propician que los cultivos sean muy costosos y de alto riesgo (Pozo-Campodónico, 1994).

Estos problemas fitosanitarios se han acrecentado, debido en parte a la falta de un diagnóstico certero y oportuno, razón por la cual los productores no

han podido manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades. Tradicionalmente la observación de síntomas por el técnico de campo o el productor es la estrategia para diagnosticar y tratar a las enfermedades, lo cual no es lo más apropiado, debido a que diferentes patógenos pueden provocar enfermedades con sintomatología muy similar, o bien, ésta puede deberse a la conjunción de un patógeno con algún factor abiótico como toxicidad de agroquímicos o deficiencia de ciertos minerales en el suelo, entre otros. En el contexto de esta problemática de manejo de enfermedades, se requiere de un diagnóstico preciso, para lo cual es fundamental el auxilio de técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.

1.1. Principales enfermedades del jitomate y chile de importancia económica.

1.1.1. Enfermedades bacterianas

1.1.1.1. Cáncer bacteriano

El agente etiológico de esta enfermedad fue conocido hasta 1983 como *Corynebacterium michiganense* y denominado actualmente como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (Gleason y col., 1993). La bacteria es un bacilo Gram (+), no móvil, aeróbico, con cápsula. En agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro, amarillo mucoide y blanco mucoide. La temperatura óptima para su crecimiento *in vitro* es de 25 a 28°C (Schaad, 1988). Las plantas infectadas por esta bacteria expresan una amplia variedad de síntomas y el desarrollo de éstos dependerá de que la infección sea localizada o sistémica. La infección primaria se origina principalmente de semilla infectada o contaminada. Las bacterias penetran a los tejidos vasculares principalmente a través de heridas, aunque también penetran por estomas, tricomas e hidátides de las hojas (Gleason y col., 1993). Los tizones foliares marginales o el marchitamiento de los folíolos son los primeros síntomas en las

plantas de todas las edades. Posteriormente aparecen unas estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del pecíolo hasta el punto donde se une con el tallo, estas estrías más tarde se agrietan y forman los cánceres en ramas y tallos, éstos se deben a que la bacteria a pesar de ser un invasor primario de los tejidos del floema, también invade la médula y la corteza. Finalmente todo el follaje se necrosa y la planta se marchita. En los frutos se presentan manchas necróticas con el centro rugoso de color pardo, rodeadas de un halo blanquecino; éstas son conocidas como “ojo de pájaro”. La gama de hospederos que presenta incluye al chile y a otros miembros de la familia Solanácea (Gleason y col., 1993; Blancard, 1996).

El cáncer bacteriano es una enfermedad que está ampliamente distribuida en todas las zonas productoras de jitomate y ocasiona cuantiosas pérdidas a nivel mundial. Afecta las regiones de Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda, África, China, costa mediterránea de Turquía y Suramérica. Desde su aparición en los invernaderos de Michigan en el siglo pasado en el año de 1909, ha causado epidemias con pérdidas económicas considerables durante el siglo pasado en las décadas de los 30s, 60s, 80s y 90s. Las pérdidas pueden oscilar entre un 10 y un 80% (Gleason y col., 1993).

La bacteria sobrevive durante varios años en el suelo y en restos vegetales malezas, estructuras de invernadero, herramientas, estacas, etc. Se transmite por trasplantes y semilla, en la cual también sobrevive de uno a varios años, (Gleason y col., 1993). La diseminación secundaria en el almácigo o en el cultivo ocurre por la lluvia y riego por aspersion, ayudado por el viento, por la maquinaria y las labores culturales; en hidroponía por la solución nutritiva circulante. Resulta especialmente peligrosa la poda generalizada en los almácigos debido a que los instrumentos se contaminan con los patógenos. Todas las condiciones óptimas para la planta hospedera, lo son también para el desarrollo de la enfermedad: temperatura de 28°C, humedad relativa de 80 a 90% y una intensidad elevada de luz. Las plantas fertilizadas con exceso de nitrógeno son más susceptibles (León, 1988).

1.1.1.2. Mancha bacteriana

El agente causal de la mancha bacteriana, también conocida como sarna o roña, es la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, la cual es un bacilo aerobio, Gram (-), móvil con un flagelo polar; en medios con extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio, las colonias son amarillas, mucoides. La clasificación de estas bacterias se puede realizar a través de pruebas de ADN, actividad amilolítica y pectolítica, composición de ácidos grasos y por serología (Schaad, 1988).

La Mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes del Chile y del jitomate. Se presenta anualmente en regiones húmedas y con temperaturas altas. Es la enfermedad bacteriana que se presenta con mayor frecuencia en Centroamérica y el Caribe desde 1912. También se localiza en las regiones productoras de Chile y jitomate de Estados Unidos de Norteamérica, Francia, Inglaterra, Holanda, Sudáfrica, India, Australia y México. Este problema fitosanitario aparece generalmente después del trasplante, aunque en ocasiones se observan daños foliares en el semillero. La enfermedad se generaliza e intensifica especialmente bajo lluvias continuas acompañadas por vientos fuertes. El principal daño es la excesiva defoliación y el manchado en los frutos, que afecta su calidad comercial. Con esta enfermedad se asocian otros problemas, como las quemaduras del sol en los frutos y su pudrición debida a la intervención organismos saprófitos secundarios, que penetran por las lesiones que causa la bacteria.

La enfermedad reduce el crecimiento de la planta, la producción y calidad de la fruta. Las lesiones son a veces difíciles de distinguir de manchas foliares causadas por otras bacterias patógenas o desórdenes fisiológicos. Los daños oscilan entre el 3 al 18% pero puede ocasionar pérdidas totales. Los síntomas iniciales sobre el follaje son manchas circulares verde claro o amarillas, translúcidas, de menos de 3 mm de diámetro; posteriormente, las lesiones se vuelven angulares y de color negro o marrón oscuro. Por lo general, la porción central de las manchas se desprende. Las manchas también se presentan

sobre los tallos, pecíolo y pedúnculos florales, cuyo tamaño puede ser de 10 mm de longitud; este daño destruye el follaje y causa defoliación. Los ataques severos ocasionan desprendimiento de flores. Los síntomas más conspicuos aparecen sobre los frutos jóvenes, como manchas en relieve, diminutas, que pueden alcanzar un diámetro de 3-6 mm de color verde oscuro, aceitosas; un halo claro puede rodear las manchas, pero desaparece a medida que estas envejecen. Luego, la epidermis se desgarran y la lesión se deprime, presentándose en forma de cráter irregular, con varios milímetros de diámetro, de color castaño claro a negro, de aspecto costroso y corchoso. No se produce infección en los frutos maduros (Pohronezny y Volin, 1983).

El ambiente húmedo y la temperatura entre 25 y 30°C, con un óptimo de 27°C favorecen el desarrollo de la enfermedad. La época lluviosa o la de sequía con riego por aspersión, son condiciones apropiadas para el desarrollo de la mancha bacteriana. El patógeno se disemina por el viento húmedo y por salpique de la lluvia; se introduce en las hojas a través de estomas y heridas, y en los frutos por heridas provocadas por insectos picadores, granizo y arena arrastrada por vientos fuertes (Jones y col., 1991; Gitaitis y col., 1992).

La bacteria sobrevive en el suelo asociada con residuos de cosecha por 3 o 6 meses y en plantas de chile o jitomate que persisten en los campos de cultivo por más de doce meses. También pueden sobrevivir como epífitos de las raíces o de las partes aéreas de las plantas remanentes de cosechas anteriores o en hospederas secundarias, principalmente solanáceas y brasicáceas silvestres. Como saprófito del suelo, muere a los cinco meses. Una fuente importante de inóculo primario es la semilla, ya que la bacteria puede persistir allí por períodos de 10 años, aún en semillas secas. Sin embargo, la importancia en la epidemiología de la semilla contaminada es relativamente desconocida (Jones y col., 1991; Gitaitis y col., 1992).

El patógeno presenta una gran variación en su población bacteriana, la cual se expresa en términos de razas fisiológicas, que tienen como fundamento la interacción entre los genes que confieren virulencia a *X. campestris* pv *vesicatoria* y los genes que confieren resistencia en genotipos específicos de

chile y tomate. En tomate se conocen tres razas no patogénicas al chile denominadas T1, T2, T3, complementariamente las razas P0, P1, P2, P3, P4, P5 y P6 atacan sólo al chile (Bustamante y Gamboa, 2003).

La bacteria *X. vesicatoria* también presenta en su población razas fisiológicas virulentas tanto en chile como en tomate. Las razas se denominan como P0T1, P0T2, P1T1, P1T2, P2T1, P2T2, P3T1, P3T2, P4T2, P5T2, P5T3, P6T2 y P6T3 (Bustamante y Gamboa, 2003)

La mancha bacteriana es una de las enfermedades importantes consideradas en el programa de certificación de chile y jitomate en el sur de los Estados Unidos, en donde las medidas de manejo están dirigidas hacia la producción de plántulas libres de esta enfermedad (Gitaitis y col., 1992).

1.1.1.3. Mancha bacteriana (Peca)

El agente causal de la enfermedad Mancha bacteriana o peca, es la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, la cual es un bacilo Gram (-), comúnmente asociado en cadenas, forma cápsula, es móvil a través de uno a siete flagelos polares. En cultivo, desarrolla colonias blancas, circulares, planas y produce un pigmento verde fluorescente. Su temperatura óptima de crecimiento es de 23 a 25° C (Schaad, 1988). Al igual que la mancha bacteriana afecta la comercialización de los frutos pero es de menor importancia.

Esta bacteria produce manchas sobre hojas, tallos y frutos. En las hojas se observan pequeños puntos negros que no sobrepasan los 2 mm, rodeados por un halo amarillo bien marcado que pueden confluir; si aparecen sobre las nervaduras éstas se tornan negras. Las hojas muy afectadas caen dejando expuestos los frutos a escaldaduras por el sol. Es muy difícil diferenciar la peca de la mancha por sus síntomas en hojas, tallos y sépalos. Los síntomas en frutos por el contrario son muy característicos: en la peca bacteriana, se forman sobre los frutos verdes pequeñas puntuaciones negras de 1 mm de diámetro algo elevadas, rodeadas de un delgado halo amarillento. El tejido que rodea las manchas madura lentamente, permaneciendo verde por más tiempo. Las

manchas se siguen observando en los frutos maduros (Vavrina, 2001; Blancard, 1996). Debido a su preferencia por bajas temperaturas, la peca normalmente se presenta antes que la mancha bacteriana. En términos generales, la epidemiología es semejante a la de la mancha bacteriana (Vavrina, 2001).

1.1.1.4. Marchitamientos bacterianos

Los marchitamientos del jitomate y del chile de origen bacteriano configuran enfermedades que han aumentado su incidencia en los últimos años, ocasionan serios perjuicios económicos, particularmente con la introducción de nuevos híbridos. En todos los casos, el síntoma final es el mismo (marchitamiento). Los agentes etiológicos son bacilos Gram (-) que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*.

1.1.1.4.1. Necrosis de la médula

La enfermedad conocida como necrosis de la médula es provocada por la bacteria *Pseudomonas corrugata*. Los primeros síntomas que desarrollan las plantas son clorosis apical en las hojas jóvenes, mientras que en el tallo y pecíolo, las lesiones externas son manchas necróticas de color marrón o negro. Además, se presenta desprendimiento y pardeamiento de los tejidos corticales. Agrietamiento del tallo y pudrición de la corteza, y finalmente marchitez. Afecta a plantas adultas con frutos próximos a la maduración. Las condiciones que predisponen a la infección son temperaturas nocturnas bajas, humedad relativa alta, escasa radiación solar y excesiva fertilización nitrogenada (Aggiehorticulture, 2004).

1.1.1.4.2. Marchitamiento bacteriano

La bacteria que provoca la enfermedad conocida como Marchitamiento bacteriano actualmente se conoce como *Ralstonia solanacearum*, anteriormente *Pseudomonas solanacearum*, es un bacilo Gram (-) que no produce cápsula y se desplaza con un flagelo polar. Las colonias que se obtienen en el laboratorio

son inicialmente blancas y se tornan de color café claro, lisas y pequeñas (Schaad, 1988).

Las hojas inferiores de la planta presentan epinastía. En condiciones ambientales favorables, la planta expresa marchitamiento en forma muy rápida (a partir de 2-3 días de los primeros síntomas). En estadios iniciales, el sistema vascular del tallo aparece de color amarillento o castaño claro en secciones transversales y longitudinales, a medida que la enfermedad avanza, se observa castaño oscuro. Una infección masiva de la corteza resulta en la aparición de lesiones acuosas en la superficie externa del tallo. La raíz presenta una podredumbre de color marrón, dependiendo del grado de avance de la enfermedad. Cuando la planta está totalmente marchita, la médula aparece de color castaño oscuro y con cavidades (Blancard, 1996; Instituto Centroamericano de Agricultura 2001 www.Cruzdelsuragro.com.ar.) El desarrollo de raíces adventicias, es particularmente notorio cuando las condiciones ambientales no son favorables para el progreso de la enfermedad la cual evoluciona en forma lenta. Las bajas temperaturas, la resistencia de los híbridos y la baja virulencia de algunas cepas del patógeno son factores que promueven la aparición de raíces adventicias. Las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad son: temperaturas de 30 a 35 °C y altos niveles de humedad en el suelo y el aire (Hayward, 1991). Esta bacteriosis se transmiten por semilla y persisten en el suelo como microorganismos libres y sobre restos del cultivo, razón por la cual es altamente recomendable utilizar semillas libres de bacterias y realizar una desinfección de suelo previo a la siembra (Hayward, 1991). La enfermedad está ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales. Muestra gran severidad en el tabaco, tomate, papa y berenjena (Rodríguez, 1997).

1.1.2. Enfermedades fungosas

1.1.2.1. Cenicilla

El agente etiológico que provoca la enfermedad conocida como cenicilla, es el hongo *Leveillula taurica* (fase sexual) y *Oidiopsis taurica* (fase asexual) y al igual que otros hongos que causan cenicilla, es un parásito obligado, produce micelio endofítico, forma conidióforos septados, generalmente simples que salen a través de los estomas, aunque ocasionalmente se han detectado en grupos de dos a tres; las conidias son unicelulares, hialinas, en forma de barril y piriformes. Este hongo es muy peligroso debido a que es muy prolífico, el inóculo aumenta continuamente a partir de la lesión primaria, realiza varios ciclos reproductivos en una misma estación, en una amplia gama de condiciones ambientales. Los factores determinantes para el desarrollo del patógeno son la humedad relativa entre 52 y 75%, con una temperatura de 15 a 25°C. El hongo se disemina principalmente por el viento (Correll y col., 1987).

Los primeros síntomas son manchas de color verde-amarillento en el haz, la parte central de la lesión se deshidrata y se torna de color café, estas lesiones se unen y las hojas se marchitan pero no hay defoliación, éstas permanecen adheridas a los tallos. En condiciones de ataque severo se puede observar la esporulación como vellosidades de color blanco-grisáceo en el envés de las hojas, la deshidratación parcial o completa de las hojas se presenta en forma ascendente, lo que trae como consecuencia un debilitamiento general de la planta, formación de frutos pequeños y frutos quemados por el sol (Sánchez-Castro, 1983).

La cenicilla es un viejo problema fitopatológico en las regiones calientes áridas y semiáridas del Mediterráneo, África y Asia, de donde se originó la mayoría de la información sobre la drástica disminución en la cosecha de jitomate, chile, berenjena, papa, zanahoria, cebolla, alfalfa, alcachofa y otras especies más de leguminosas, malváceas y euforbiáceas (Correll y col., 1987).

En Estados Unidos de Norteamérica se describió por primera vez en 1978. La Cenicilla se detectó por primera vez en México en el estado de Sinaloa, durante el ciclo hortícola 1979-1980; y causó severos daños en el cultivo de jitomate (Sánchez-Castro, 1983). Velásquez y Valle (1999) la refieren en Chihuahua, Zacatecas y Aguascalientes, afectando cultivares de chile en el año de 1998, con una incidencia del 35 al 80%. Antes de los años 80(s) no se conocía en nuestro país pero actualmente es una de las enfermedades que ataca con gran severidad (Anaya y col., 1992).

1.1.2.2. Tizón tardío

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, es el agente causal del tizón tardío; *Phytophthora infestans* es un hongo heterotálico que pertenece a los oomycetes, y es uno de los patógenos más devastadores debido a su capacidad reproductiva y a su elevada virulencia. Posee micelio hialino, zoosporangióforos ramificados y zoosporangios ovales hialinos en forma de limón con una papila apical (Romero-Cova, 1988). En México, este hongo se reproduce sexualmente debido a que están presentes los grupos de compatibilidad A1 y A2 y en el ciclo sexual puede ocurrir recombinación genética, lo cual es un factor importante en la aparición constante de nuevas razas fisiológicas del hongo.

La enfermedad es recurrente y agresiva en muchas regiones de EUA y México, debido a las nuevas cepas virulentas y resistentes a los fungicidas. Los síntomas característicos de la enfermedad son manchas inicialmente de color verde oscuro con los márgenes claros, las cuales se necrosan e invaden la lamina foliar, se desarrollan tizones en las hojas y en los pecíolos, llegando a destruir todo el follaje (Sánchez-Castro, 1990). El tizón tardío ha sido históricamente una enfermedad importante en todas las regiones productoras de papa y jitomate, especialmente en las que son frías y húmedas. En los Estados Unidos y Canadá, hasta antes de 1992, las epidemias de esta enfermedad eran esporádicas, sin embargo, en 1992 y 1993 se presentaron éstas en forma muy

severa y a partir de entonces se presentan anualmente (Fry y col., 1993). En el norte de Sinaloa se produce papa y tomate de alta calidad, tanto para exportación como para el mercado y la industria nacional. Durante los ciclos 1967-1968, 1978-1979 y 1980-1981; esta enfermedad provocó pérdidas del 100% en la producción (Retes-Cazares, 1982).

El patógeno sobrevive como micelio u oosporas en el tejido infectado, y necesita condiciones muy especiales de temperatura y humedad para poder prosperar, requiere presencia de rocío por cuatro horas como mínimo, la temperatura nocturna igual o superior a 10°C, cielo con un 80% o más de nublado al día siguiente, y precipitación igual o mayor a 0.1mm en las siguientes 24 horas; si alguna de estas condiciones no se cumple, no se desarrolla la enfermedad, pero si persisten, puede desencadenar epidemias devastadoras. El mecanismo efectivo de diseminación es el viento (Retes-Cazares, 1982).

1.1.2.3. Marchitez del chile

De los fitopatógenos del suelo que atacan al chile, el hongo *Phytophthora capsici* Leo, puede considerarse como el enemigo principal de este cultivo. Este hongo es un oomycete heterotálico con micelio hialino, los zoosporangióforos pueden ser simples o ramificados, y de forma variable (oblongos, elíptico, ovalados) con papila prominente o bipapilados y oosporas de paredes gruesas de color amarillo castaño (Romero-Cova, 1988). El hongo puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La podredumbre del cuello y la subsiguiente marchitez son los síntomas característicos. Cuando el ataque es en la raíz, el síntoma más común es un marchitamiento general de la planta, debido a que destruye el xilema y el floema impidiendo el paso del agua y nutrimentos hacia el follaje. Si la infección es en una rama, se presenta una marchitez parcial de las hojas. En plántulas causa ahogamiento y en los frutos, áreas decoloradas, y finalmente se momifican; el hongo crece en el interior del hospedero cuando la humedad es alta (Ramírez-

Villapudua y Rodríguez-Baez, 1990). Las condiciones ambientales favorables a esta enfermedad son temperatura óptima de 25 a 28°C, con un mínimo de 11 y un máximo de 35°C, y alta humedad. En las condiciones óptimas es sumamente agresivo, puede destruir campos enteros de Chile en un tiempo muy corto, debido a su gran velocidad de crecimiento y abundante esporulación (Romero-Cova, 1988).

Las oosporas son la única fuente de inóculo primario y sobreviven en el suelo más de dos años en ausencia de hospedero. El micelio no sobrevive más de siete días en suelo seco y no actúa como fuente de inóculo primario, pero puede jugar un papel importante como fuente de inóculo secundario, debido a que sobrevive en los frutos infectados y en suelos húmedos aproximadamente nueve semanas. El hongo viviendo saprofiticamente produce zoosporangios y zoosporas que distribuidas por el agua, van dispersando la enfermedad. Dada la exigencia de agua para el transporte de las zoosporas hasta la planta, los ataques al cuello de la planta se producen en parcelas con excesivo riego o mal drenadas. Las infecciones aéreas suelen estar asociadas con riego por aspersión, lluvia y corrientes de aire muy húmedo. En la semilla el hongo forma solamente micelio y no sobrevive por más de un mes (Ramírez-Villapudua y Rodríguez-Baez, 1990). Esta especie de *Phytophthora* se encontró por primera vez en Nuevo México, afectando al cultivo del pimiento. En México se describió en 1956 en las plantaciones de Chile del Estado de México (Galindo, 1960). Se calcula que aproximadamente el 40% de las plantas mueren a causa de esta enfermedad (Ramírez-Villapudua y Rodríguez-Baez, 1990).

1.1.2.4. Marchitez vascular o Fusariosis

El agente causal de la Marchitez vascular o Fusariosis es provocada por *Fusarium oxysporum lycopersici* (Fol), el hongo se caracteriza por producir tres tipos de esporas asexuales: las microconidias (son las más frecuentes en los vasos conductores de las plantas afectadas), las macroconidias (comúnmente

se forman en la superficie de las plantas muertas) y las clamidosporas (son las estructuras de sobrevivencia en el suelo). Gracias a estas esporas, el hongo puede permanecer en la semilla o en el suelo por más de cinco años. Se reconocen tres razas virulentas denominadas raza 1, raza 2 y raza 3, esta última identificada en la alta California por análisis isoenzimático (Gordon y Martyn, 1997).

Las plantas infectadas por Fol presentan un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos más jóvenes. En el caso de las plántulas infectadas es común que éstas se marchiten y mueran. Las plantas jóvenes expresan epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, achaparramiento y ocasionalmente, formación de raíces adventicias; necrosis marginal de las hojas, marchitamiento, defoliación y necrosis café obscura del tejido vascular (Agrios, 1996; Ramírez-Villapudua y García-Estrada, 1990). El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Fol), produce marchitez exclusivamente en jitomate y es la enfermedad más prevalente y dañina en las regiones donde éste se cultiva intensamente. La enfermedad es más destructiva en lugares con suelos cálidos y arenosos; así como para los cultivados en invernadero (Agrios, 1996). Es una enfermedad ampliamente distribuida en Europa, África, Asia, y América (Katan y col., 1997). En México está presente en Sinaloa, el Bajío y en San Luis Potosí (Ramírez-Villapudua y García-Estrada, 1990; Monreal-Vargas, 1992).

Este patógeno coloniza el suelo por debajo de los 80 cm y se disemina a largas distancias por la maquinaria agrícola, el agua de riego y a través de insectos. Las condiciones favorables para su desarrollo son temperatura entre 21 a 33°C, y suelos arenosos ácidos con alta humedad (Ramírez-Villapudua y García-Estrada, 1990).

1.1.2.5. Pudrición de la corona y raíz

La pudrición de la corona y raíz del jitomate, es una de las enfermedades de la raíz más destructivas que ataca a casi todos los cultivares de jitomate

resistentes a la marchitez causado por Fol raza 1 y 2. El patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) es morfológicamente indistinguible de otros aislados de Fol pero se diferencia de éste porque además de infectar los cultivares de jitomate resistentes a la raza 1 y 2, también infecta a *Solanum melongena* L., *Capsicum frutescens* L., *Glycine max* (L) Merr., *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* L., y *Arachys hypogea* L. El daño que causa en el tejido vascular es de color café chocolate y únicamente invade por arriba de la zona de transición raíz -tallo y el tejido vascular superior, por lo que solamente se puede aislar cerca de la lesión y de partes superiores de las plantas marchitas (Jarvis y Shoemaker citados por Mendoza-Zamora, 1996).

En cultivos a campo abierto, los síntomas que presentan las plantas son amarillamiento de los bordes de las hojas que progresa rápidamente y se torna generalizado, para finalmente concluir con la muerte de las plantas. Algunas plantas se marchitan rápidamente y se secan al tiempo de la maduración de los primeros frutos, pero la mayoría se marchita lentamente. En invernadero, las plántulas expresan síntomas similares a los de ahogamiento (Ramírez-Villapudua, 1990). Las condiciones ambientales para el desarrollo de la enfermedad son temperatura óptima de 15 a 20°C, el hongo sobrevive en el suelo como clamidospora y puede dispersarse a grandes distancias por el viento y la semilla. A distancias cortas puede diseminarse por el agua de riego, zapatos, ropa y maquinaria agrícola (Ramírez-Villapudua, 1990). La enfermedad causada por este hongo provoca pérdidas superiores al 50% en Japón, Estados Unidos, Canadá, Italia, Francia, Israel y los Países Bajos. En México está presente en Sinaloa, San Luis Potosí y Baja California, en donde genera una disminución en el rendimiento del 50% (Ramírez-Villapudua, 1990).

1.1.2.6. Marchitez por *Rhizoctonia solani*

Este hongo provoca la muerte de plántulas, y además causa el debilitamiento y muerte de plantas más desarrolladas, además afecta la integridad de los frutos. Todas esas manifestaciones se presentan en

invernadero y campo. *Rhizoctonia solani* se puede distinguir por su micelio de color oscuro septado, con las ramificaciones inclinadas en un ángulo de 45° de la dirección de crecimiento de la hifa madre y siempre presenta una constricción en su punto de origen. Forma esclerocios de color café, aproximadamente de 3 mm de diámetro. Este hongo no es una especie homogénea, debido a que está constituida por 12 grupos de anastomosis (AGs) y varían en morfología macroscópica y patogenicidad (Sneh y col., 1991).

El daño se puede manifestar como podredumbre de las raíces, con lesiones oscuras de las mismas, o bien como canchales del tallo a nivel del suelo. Los canchales son lesiones necróticas de color pardo que profundizan en el tejido y pueden abarcar porciones más o menos extendidas de la circunferencia del cuello causando marchitamiento, debilitamiento, detención de crecimiento y muerte de la planta. Los frutos en contacto con el suelo o cercanos al mismo, pueden desarrollar una podredumbre parda con bandas concéntricas más claras y más oscuras alternadas. Estas lesiones se expanden y pueden presentar hendiduras en forma de estrella; son primero firmes pero luego se transforman en una podredumbre húmeda por la actividad de otros microorganismos. Los frutos verdes son más resistentes que frutos maduros. Infecciones incipientes en el momento de la cosecha pueden manifestarse durante el transporte y la comercialización.

El diagnóstico de las distintas manifestaciones descritas, requiere por lo general de la confirmación en el laboratorio, la que se basa en la presencia del micelio característico de *R. solani*. Este hongo es una especie con muchas razas, algunas específicas y otras polífagas. Está presente en todos los suelos, y como típico hongo del suelo sobrevive de distintas formas: como saprobio sobre restos orgánicos, como parásito en raíces y otros órganos de plantas y, en forma pasiva, como esclerocios. El hongo puede infectar en muy distintas condiciones de temperatura y humedad, pero como patógeno relativamente débil ataca principalmente tejido estresado y debilitado del hospedero. El ataque

en los frutos se produce en condiciones húmedas y calurosas. Ocurre en frutos que tocan el suelo y que son invadidos en forma directa o en frutos más o menos distantes del suelo donde el inóculo llega por el salpicado de la lluvia o riego por aspersión (Instituto Centroamericano de Agricultura 2001 www.Cruzdelsuragro.com.ar).

1.1.2.7. Marchitez por *Verticillium*

Es una enfermedad que causa daños importantes, tiene una distribución geográfica similar a la de *Fusarium*, no obstante, más limitada a zonas de clima frío. Puede matar plantas o debilitarlas reduciendo la producción. *Verticillium albo-atrum* se caracteriza por presentar un micelio hialino ramificado y septado, produce conidióforos en racimo con terminales finas y conidias de esféricas a ovals, hialinas, unicelulares y pequeñas; éstas se pueden formar en cadenas o agrupadas en gotas (Romero-Cova, 1988). *Verticillium* es un hongo habitante del suelo asociado con las raíces de las plantas sea como comensal sin producir síntomas o como parásito que invade el sistema vascular. Como especie tiene un rango de hospederos muy amplio pero existen razas más o menos especializadas para determinados hospederos.

El primer indicio de la enfermedad es un marchitamiento pasajero durante las horas más calurosas del día y una recuperación por la noche; este marchitamiento más tarde se hace permanente. Luego se detecta clorosis y amarillamiento marginal e internerval de los folíolos dando una característica mancha en V cuya parte más ancha queda en el borde del folíolo; luego este tejido se necrosa tomando color pardo, pero siempre conservando un halo amarillo (Blancard, 1996; Instituto Centroamericano de Agricultura 2001. www.Cruzdelsuragro.com.ar.)

El amarillamiento de las hojas se debe, en parte, a la acción de las toxinas que produce el hongo. La enfermedad avanza de abajo hacia arriba. El hongo invade los vasos por ello los síntomas a menudo aparecen en forma sectorial,

abarcando sólo un lado de la planta o un lado de la hoja; es más evidente durante períodos secos. El marchitamiento foliar es seguido por necrosis y enanismo. Si se corta el tallo afectado se ve un cambio de coloración en los vasos: gris amarillo o pardo claro. Aunque la mancha en V es bastante característica, síntomas de marchitez similares pueden ser causados por otros hongos (*Fusarium oxysporum lycopersici*) o bacterias (*Clavibacter michiganensis*) o bien por estrés hídrico. Por este motivo, el diagnóstico definitivo debe basarse en estudios de laboratorio.

El hongo sobrevive en el suelo en forma pasiva como microesclerocios que se mantienen viables durante muchos años (hasta ocho). Las malezas pueden actuar como reservorios a menudo sin presentar síntomas. Las plántulas infectadas y las semillas pueden portar la enfermedad a campos libres del hongo. Los microesclerocios son transportados por el agua y el viento. Estos germinan y las hifas penetran en las raíces, pasando a los vasos; allí el hongo esporula y las conidias son llevados por la corriente ascendente del xilema llegando a distintas alturas en el tallo donde interrumpen el transporte de agua por obstrucción y producen toxinas que causan marchitamiento. Al final del ciclo de cultivo se forman los microesclerocios en los tallos invadidos que son incorporados con los restos al suelo (Instituto Centroamericano de Agricultura 2001).

Los fotoperíodos cortos, la baja luminosidad y el tiempo húmedo y fresco (20 a 24°C) favorecen el desarrollo de la enfermedad, la que es más severa en suelos neutros y alcalinos que en suelos ácidos (a diferencia de *F. oxysporum*). Una alta susceptibilidad a *Verticillium* ha sido correlacionada con altos niveles de nitrógenop y bajos niveles de carbohidratos en hojas. La presencia de nemátodos como *Pratylenchus penetrans* puede incrementar la severidad de la enfermedad (Rodríguez, 1997).

1.1.2.8. Tizón temprano

Alternaria solani es el agente etiológico del tizón temprano. Su micelio es oscuro, septado, ramificado; los conidióforos son cortos, oscuros y también septados. Las conidias son claviformes, oscuras, con septos transversales y longitudinales (Romero-Cova, 1988).

El tizón temprano es una enfermedad frecuente en el cultivo del jitomate. Se encuentra ampliamente distribuída en las zonas tropicales y templadas del mundo en donde se cultiva esta hortaliza, causando daños importantes. Produce muerte de plántulas en pre y post-emergencia; puede disminuir el tamaño de fruto y el rendimiento en un 30%. Las lesiones en los frutos disminuyen su valor comercial. En ocasiones la defoliación es tan intensa que deja los frutos expuestos al sol fomentando daños por insolación (Sánchez-Castro, 1990). Ataca a jitomate, papa, berenjena y otras solanáceas cultivadas, silvestres y malezas. Sobrevive de una estación a otra y tal vez más, en restos de plantas enfermas. Se transmite por semilla pudiendo causar, en este caso, la muerte de las plántulas (Sánchez- Castro, 1990).

Los síntomas característicos de la enfermedad en hojas son: manchas circulares de hasta $\frac{1}{2}$ cm de diámetro, de color pardo con anillos concéntricos solitarias o en gran número sobre las hojas. Las áreas afectadas se tornan amarillas, luego pardas y las hojas cuelgan. Este manchado comienza por las hojas más viejas y luego prospera hacia arriba, la planta entera puede defoliarse y morir. En tallo y pecíolo se producen lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar a veces anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuras ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. Los frutos expuestos se calcinan por el sol (Sánchez- Castro, 1990). Adicionalmente, pueden aparecer manchas típicas en el área de unión entre el pedúnculo y el cáliz del fruto y alcanzar hasta 2.5 cm de diámetro. Estas manchas son firmes, hundidas

y a veces con anillos concéntricos, sobre estas lesiones se producen abundantes fructificaciones (Sánchez- Castro, 1990).

Las conidias del hongo se forman con la humedad y se dispersan por el viento y lluvia; también hay transmisión por herramientas e implementos agrícolas y por labores manuales (Sánchez- Castro, 1990). Los primeros ciclos de la enfermedad parecen iniciarse por nuevas conidias que se producen sobre los restos de plantas enfermas u otra materia orgánica. Estas penetran por estomas ó directamente a través de la cutícula, cuando la hoja está mojada. La tasa de infección se incrementa con alta densidad de frutos y largos períodos de tiempo nublado (Sánchez- Castro, 1990).

En condiciones de campo las manchas se hacen visibles 2 ó 3 días después de la inoculación y la esporulación luego de 5 a 7 días. La germinación y la penetración pueden ocurrir bajo una amplia gama de temperaturas, entre 3° y 35°C. Una lluvia ligera es suficiente para provocar la diseminación y la infección (Sánchez- Castro, 1990). El hongo esporula poco sobre manchas foliares jóvenes; esto aunado al hecho que la susceptibilidad se incrementa con la edad, generando que las epidemias severas se manifiestan al final del ciclo del cultivo. Las plántulas poco vigorosas o estresadas dan lugar a plantas más susceptibles a la enfermedad; también la falta de nutrientes, especialmente nitrógeno, aumenta la susceptibilidad. La severidad de la enfermedad está positivamente correlacionada con la carga de frutos (Romero-Cova, 1988).

1.1.3. Enfermedades virales

1.1.3.1. Marchitez manchada (*Tomato Spotted Wilt Virus*)

El agente etiológico de la marchitez manchada es el *tomato spotted wilt virus* (TSWV) y es la especie tipo del género tospovirus de la familia Bunyaviridae. Los viriones son casi esféricos y con envoltura, además poseen un genoma constituido por tres segmento de ARN de cadena sencilla

denominado L, M y S. L es de polaridad negativa y codifica una posible RNA polimerasa, la cual puede estar asociada con el complejo ribonucleoproteína. Los otros dos tipos de ARN utilizan una estrategia de codificar en ambos sentidos. M codifica una proteína no estructural en el sentido del virión y una proteína que sirve como precursor de las glicoproteínas G1 y G2 en el sentido complementario del virión (Goldbach y Kuo, 1996). La marchitez manchada es una de las virosis más devastadoras para los cultivos de jitomate y chile y puede causar pérdidas hasta del 100%. Se encuentra presente en casi todas las áreas productoras del mundo, y afecta a una gran diversidad de hortalizas y plantas ornamentales. El virus se distribuye preferentemente en el subtrópico y en regiones con clima templado cálido, causa daños muy elevados en cuanto a producción y calidad, en el jitomate así como en muchos otros cultivos. Desde 1989 es un serio problema en Estados Unidos de América y Canadá (Gitaitis y col., 1998). La situación se ha ido agravando en los últimos años debido a la expansión del trips californiano, *Frankliniella occidentalis*, a casi todos los continentes. Esta especie es mucho más eficiente como vector de los tospovirus que los demás trips que los transmiten (Mumford y col., 1994).

Los síntomas varían de acuerdo con la variante del virus pero son características las manchas necróticas de color bronce. Plántulas con una infección temprana originan después del trasplante, plantas enanas, que raramente mueren pero permanecen improductivas. El follaje se torna bronceado o violáceo con aspecto marchito. Se detiene el crecimiento de las hojas apicales y se produce un enrollamiento hacia abajo de las hojas desarrolladas; puede morir el brote terminal. En las hojas jóvenes se observan manchitas pardo oscuras en mayor cantidad en la base de los folíolos, primero en el haz y luego en el envés, es común observar franjas oscuras en el pecíolo y tallo. La zona afectada no crece y a veces los folíolos quedan completamente enanos (parte apical marchita). Si la infección se produce antes de la formación de los frutos hay una reducción del tamaño y número de los mismos. Si los frutos ya se están formando, quedan irregulares en forma y color con marcas en

relieve circulares y bandas que alternan el rojo con el amarillo. En frutos maduros es frecuente observar manchas amarillas sobre el fondo rojo. Aunque la sintomatología descrita es bastante característica, no siempre se presenta en forma tan clara y es posible confundir esta enfermedad con otras que causan marchitamiento (*Fusarium*, *Clavibacter*) o manchas necróticas foliares (*Alternaria*, *Septoria*) o bien mosaicos y deformaciones en hojas y frutos (*tomato mottle virus*-ToMoV y otros virus) (Ramírez-Villapudua y col., 1990). Debido a la cantidad de hospederas (Solanáceas, Umbelíferas, Compuestas, Leguminosas y otras familias), el reservorio del virus es muy grande y las posibles fuentes de inóculo numerosas y variadas, entre cultivos, ornamentales, malezas y vegetación silvestre. Son especialmente importantes en este aspecto las plantas perennes como dalias o cultivos de invierno que constituyen un puente verde (lechuga) (Instituto Centroamericano de Agricultura 2001 www.Cruzdelsuragro.com.ar).

Los vectores para estos virus son Thysanópteros: *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *F. schultzei* y otros. El primero es el más importante ya que es muy eficiente como vector y difícil de combatir. Los virus son adquiridos por las ninfas pero transmitidos solamente por los adultos, después de un prolongado período de incubación *T. tabaci* necesita por lo menos 15 min. para adquirir el virus; la latencia es de cuatro a diez días. Después de la incubación los insectos permanecen infectivos durante 22 a 30 días y en ocasiones toda la vida. El virus no se transmite a la descendencia del vector. Los insectos vectores son arrastrados por el viento hacia los campos de cultivo de jitomate y chile y transmiten el virus a las plantas sanas (Gitaitis y col., 1998). El ambiente seco y caliente, con vientos dominantes en una dirección, asegura la reproducción y diseminación del transmisor y son las mismas que favorecen a la marchitez manchada. El virus también se transmite por semilla y se localiza en la testa (Gitaitis y col., 1998).

En el estado de Sinaloa el virus se presentó en la temporada agrícola 1987-1988 con la variante más destructiva conocida con el nombre de "Tizón de las Puntas" con una incidencia del 80 al 100% en jitomate "saladette". En general esta virosis puede disminuir el rendimiento hasta en un 50% tanto en cultivos de jitomate como de chile (Ramírez-Villapudua y col., 1990).

1.1.3.2. Virus del mosaico del tabaco (TMV)

El TMV es la especie tipo del género *Tobamovirus*. Es un virión sin envoltura, con morfología de varilla rígida y simetría helicoidal. El genoma consiste generalmente de una molécula ó de tres segmentos de ARN de cadena sencilla. El ARN codifica dos proteína estructurales y cuatro proteínas no estructurales entre las que se identificaron a una helicasa y a una replicasa (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002 a).

El TMV es probablemente el virus de plantas más estudiado, sobre todo, por sus daños en jitomates de invernadero. Puede causar severos daños cuando se lleva a cabo la infección al momento del transplante. Se puede presentar en cualquiera de las regiones productoras del país. La infección de una variedad susceptible con una raza altamente virulenta podría ocasionar hasta el 50% de la reducción en la cosecha. Su gama de hospederos es bastante amplio, debido a que infecta a más de 50 géneros y más de 300 especies de plantas herbáceas y leñosas, tales como la vid, papa, chile, frijol, berenjena, etc. (León, 1988).

Los síntomas más evidentes se presentan en el follaje con un moteado que varía de un verde claro a un verde oscuro y que va acompañado de un enrollamiento y malformación de las hojas. Las plantas reducen su crecimiento hasta en un 15% si se infectan antes de que se formen los primeros frutos. En los frutos se pueden desarrollar estrías, costras y deformaciones. Ciertas razas del virus causan amarillamiento, una deformación de las hojas denominada "hojas de helecho", enanismo y necrosis interna de los frutos (Ley-Flores,

1990). Además, es uno de los virus que se transmite con más facilidad en forma mecánica durante las prácticas culturales, principalmente en el manejo de plántulas en invernaderos, en las podas, y en las hiladas de las varas y estacones. No se le conoce un vector específico pero puede ser transmitido mecánicamente por ortópteros (grillos y chapulines). Se transmite también a través de la semilla contaminada externamente (Ley-Flores, 1990). El TMV puede permanecer viable durante muchos meses en residuos vegetales, en el suelo, en los instrumentos de labranza y en la infraestructura de los invernaderos (Ley-Flores, 1990).

1.1.3.3. Virus del mosaico del pepino (CMV)

El CMV taxonómicamente pertenece a la familia *Bromoviridae* y es la especie tipo del género *Cucumovirus*. Es un virión sin envoltura con morfología de tipo circular, y simetría icosaédrica. Contiene tres segmentos de ARN de cadena sencilla y sentido positivo (ARN-1, ARN-2 y ARN-3), los cuales codifican la proteína de la cápside y tres proteínas no estructurales (una replicasa, una ARN polimerasa y una posible proteína de movimiento) (ICTV, 2002).

Las plantas enfermas presentan una gran variabilidad de síntomas, entre ellos el enanismo, amarillamiento, mosaicismo, deformación y reducción del limbo foliar (hojas filiformes). Además se observa necrosis en hojas, pecíolos y tallos, pudiendo llegar a causar la muerte de la planta, aunque en ocasiones las plantas se recuperan parcialmente. Los frutos en maduración presentan anillos con cavidades anulares que permanecen amarillas al madurar. Otros virus, como el virus del moteado del tomate (ToMoV), y otros agentes, como herbicidas y fitohormonas, causan síntomas similares y pueden complicar el diagnóstico, por lo cual éste debe confirmarse por métodos serológicos (Aggiehorticulture,2004).

El inóculo inicial proviene de cualquiera de los múltiples hospederos, entre Crucíferas, Solanáceas, Compuestas, Leguminosas, Cucurbitáceas y otras familias. Se transmite en forma no persistente por áfidos: *Myzus persicae*, *Aphis craccivora*, *Aphis fabae* y otros. Se puede transmitir por semilla en algunas malezas (*Stellaria media*) y en poroto. No se transmite por semilla de tomate (Instituto Centroamericano de Agricultura 2001 www.Cruzdelsuragro.com.ar). Los daños ocasionados por CMV son importantes en cultivos al aire libre, especialmente durante los meses de verano. Reduce el rendimiento y afecta la calidad.

1.1.4. Fitoplasmosis

Los fitoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, su genoma es muy pequeño (de 600 a 1,200 Kpb) comparado con el de otras bacterias, y contiene una baja cantidad de G+C (25 a 30%) pero su estructura es similar a la de otros procariotes (Berg y Seemüller, 1999). Tienen una morfología variable que incluye formas esferoidales, ovoides y en espiral. Su tamaño oscila entre 175 a 250 nm pero algunos pueden medir hasta 1µm. Son parásitos obligados intracelulares que infectan solamente las células del floema de una gran cantidad de especies de plantas. Los principales síntomas expresados en las plantas que se asocian a las fitoplasmosis son viriscencia, filodia, blastomania, esterilidad de las flores, amarillamiento, crecimiento en forma de roseta y metaplasia. La mayoría de los fitoplasmas en condiciones de campo son transmitidos de una planta a otra por insectos como chicharritas y psílidos, pero algunos de ellos son transmitidos por periquitos ("treehoppers") y fulgóricos. En invernaderos y viveros se transmiten por injerto (Agrios, 1996).

1.1.4.1. Fitoplasmosis del Jitomate

Existen al menos tres enfermedades del tomate cuyos agentes causales han sido asociados a fitoplasmas, dos de los cuales son transmitidos por

chicharritas y solamente uno por un psílido. Se ha descrito al amarillamiento del áster (*Aster yellows*), el cual se transmite por injerto y por cicadélidos como chicharritas-aster (leafhoppers) (Instituto Centroamericano de Agricultura 2001). Este fitoplasma puede invernar en plantas perennes, de ornato, hortalizas y malezas tales como cardo, zanahoria silvestre, diente de león, margarita del campo, margarita amarilla y llantén de hoja ancha. La sintomatología se caracteriza por manchas de apariencia gris-verde y de forma oval o redondeada, posteriormente se observan estructuras huecas con forma de espada, las cuales reemplaza a las flores. Las plantas afectadas no mueren y su crecimiento es fusiforme. Esta enfermedad puede atacar solo una porción de la planta. Otro síntoma, es la formación abundante de brotes (Instituto Centroamericano de Agricultura, 2001; University Central Davis-IPM, 2001). Además, causa la malformación de las partes florales.

La macro yema o yema grande del jitomate se caracteriza por la proliferación de las yemas axilares, acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas y verde-amarillentas, hipertrofia del cáliz y viriscencia; además, provoca el desarrollo anormal de frutos. El fitoplasma también es transmitido por otra especie conocida como chicharrita café (beet leafhopper) y el daño es dependiente de la población del insecto vector y de los reservorios de los fitoplasmas (Davis y col., 2003).

El tercer fitoplasma es el que en México causa la enfermedad llamada "permanente del tomate", el cual es transmitido por el psílido conocido comúnmente como pulgón saltador, científicamente identificado como *Bactericerca (=Paratrioza) cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae) (Liu y Trumble, 2004). Este patógeno se encontró por primera vez en el estado de Guanajuato, donde provocó un 60% de daños en la producción de una superficie sembrada de 13,000 ha, disminuyéndola a menos de 2,000 ha;

además, los agricultores sustituyeron este cultivo por otros con menor riesgo como el brócoli. La enfermedad se dispersó y en la actualidad afecta las principales regiones jitomateras del país, en lugares como Yurécuaro, Mich., Villa de Arista, S.L.P., la región de la Laguna en los estados de Durango y Coahuila, y San Quintín, B.C.N., además de algunas regiones de Morelos y Nayarit. Hasta el 2000 esta enfermedad afectó 30,000 ha y los daños correspondieron a pérdidas del 45%. Los síntomas característicos son enrollamiento de las hojas, las cuales son de color verde intenso y textura quebradiza, necrosamiento y aborto de las flores, así como reducción en el crecimiento de la planta (Garzón-Tiznado, 2002).

1.2. Diagnóstico de Fitopatógenos

Las enfermedades se pueden presentar en síndromes dependiendo de las condiciones climáticas de la región y el sistema de producción, además, pueden variar de un ciclo a otro. Por ejemplo, en la región de Arista, SLP (localizada entre los 22°33' y 22°55' de latitud norte y entre los 100°49' y 101° de longitud oeste, la cual comprende Villa de Arista, Moctezuma, Bocas y Venado), el sistema de producción que se maneja ha generado un agroecosistema con un alto grado de desequilibrio entre la planta cultivada y los microorganismos patógenos, debido a que se caracteriza por ser un monocultivo intensivo, extensivo y se basa en el uso constante de altas dosis de plaguicidas sistémicos que pueden inducir resistencia en los fitopatógenos, originar razas más virulentas y eliminar las poblaciones microbiana benéficas, derivando así en el desarrollo de problemas fitosanitarios complejos constituídos por varias enfermedades fungosas, bacterianas y virales que se presentan simultáneamente. La mayoría de estas enfermedades (Cuadro 1), son devastadoras por su comportamiento epidémico (Monreal-Vargas, 1994), lo cual incluye a la enfermedad denominada “permanente del tomate” (Garzón-Tiznado, 2002).

En la actualidad, los síndromes constituídos por varias de las enfermedades citadas, las nuevas que surgen y las que son re-emergentes, representan uno de los retos más importantes en los sistemas de producción de las plantas cultivadas en nuestro país, debido a que no se cuentan con suficientes instituciones que realicen un diagnóstico eficiente y oportuno. Habitualmente las enfermedades de las plantas se han diagnosticado en base a sintomatología, y por métodos convencionales, que implican análisis microbiológico, bioquímico e inmunológico. Al respecto, se puede decir, que son muchas las enfermedades cuya sintomatología suele ser muy similar y no lo suficientemente característica para efectuar un diagnóstico certero. El diagnóstico convencional de hongos y bacterias incluye el uso de medios de cultivo selectivos para el aislamiento, la identificación a través de morfología microscópica, pruebas bioquímicas, técnicas inmunológicas como la de ELISA y pruebas de patogenicidad en diferentes hospederos y cultivares específicos. Los fitoplasmas no se pueden cultivar *in vitro* y los métodos que se utilizan son técnicas específicas de tinción para detectarlos en el floema de las plantas con el microscopio de luz; estudios con el microscopio electrónico en cortes de tejido ultrafino y análisis inmunológico con la técnica de ELISA (Narayanasamy, 2001). Las desventajas del diagnóstico convencional son múltiples, e incluyen la lentitud relativa del análisis microbiológico, la imprecisión de algunas pruebas bioquímicas, el uso limitado de los ensayos inmunológicos que pueden dar

Cuadro 1. Enfermedades epidémicas del jitomate detectadas en la región de Arista, SLP (Tomado de Monreal-Vargas, 1994).

Marchitez Vascular <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	1984
Yema Grande y Mal Azul Micoplasma	1985
Pudrición de la Corona y Raíz <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	1986
Marchitez Bacteriana <i>Pseudomonas solanacearum</i>	1986
Amarillamiento del Aster Micoplasma	1987
Geminivirus	1987
Cáncer Bacteriano <i>Clavibacter michiganensi</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1988
Cenicilla <i>Oidiopsis taurica</i>	1989
Pudrición de la raíz y parte basal del tallo <i>Rhizoctonia solani</i>	1990
Mosaico del Tabaco -TMV y Mosaico del Pepino - CMV	1990
Marchitez Manchada Spotted Wilt Virus	1991
Mancha Bacteriana <i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>vesicatoria</i>	1992
Marchitez Manchada Spotted Wilt Virus variante Tomato Tip Blight	1993

falsos positivos, debido al uso de anticuerpos policlonales, o bien falsos negativos por no ser tan sensibles para poder incluirse en los programas de certificación fitosanitaria. La alternativa son los métodos moleculares que son rápidos, precisos y altamente sensibles. Éstos se basan en la amplificación de secuencias específicas del material genético de los patógenos por medio de técnicas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico, diferenciación y determinación cuantitativa de virus, hongos, bacterias y fitoplasmas que atacan a las plantas (Ruey y col., 2003).

En el caso de virus también se utiliza para estudiar el movimiento y sitios de replicación en la planta y en el insecto transmisor. Se ha aplicado en el diagnóstico de poblaciones bajas de hongos causantes de marchitez vascular y pudrición de la raíz, en los tejidos infectados y en el suelo. En relación a las bacterias se ha aprovechado en el diagnóstico y cuantificación de propágulos en las semillas contaminadas. La PCR es muy útil en el diagnóstico de fitoplasmas y para desarrollar un sistema de clasificación taxonómica filogenética de estos microorganismos (Narayanasamy, 2001). Algunos patógenos del jitomate que se han identificado por medio de la PCR se indican en el Cuadro 2.

El diagnóstico por PCR tiene muchas ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico. El patógeno no requiere ser cultivado para su detección y no es necesario que la planta exprese síntomas, para ello, es suficiente la extracción del ADN de la planta hospedera. La reacción es altamente específica debido a que puede detectar especies, razas o subespecies, y también puede detectar a muchos miembros de un grupo de patógenos relacionados, partiendo de nanogramos de ADN. La modalidad de la PCR multiplex (incluye juegos de oligos para varios patógenos) permite diagnosticar simultáneamente a un complejo de fitopatógenos en una misma muestra, adicionalmente, los resultados se pueden obtener en un tiempo corto (de uno a dos días) (Martin y col., 2000).

Cuadro 2. Patógenos del jitomate identificados por técnicas moleculares.

PATÓGENO	SECUENCIA/OLIGOS	REFERENCIA
Tobacco Mosaic Virus	Gen M/RS1 yRS2	Drygin y col., 1992; Chen y col., 1996
Tomato Mosaic Virus	Específica del Virus	Castello y col., 1995
Tomato Ringspot Virus	Específica del Virus	Chen et al., 1996
Tomato Spotted Wilt Virus	LRNA/L1 y L2	Mumford y col., 1994
Tomato Yellow Leaf Curl Virus	Específica del DNA viral	Navot <i>et al.</i> , 1992
<i>Phytophthora infestans</i>	rDNA/ITS4 e ITS5	Trout y col., 1997
<i>Fusarium oxysporum</i>	rDNA/IGS	Edel y col., 2001
<i>Rhizoctonia solani</i>	rDNA/ITS	Mazzola y col., 1996
<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	Específica del DNA/CM3 y CM4	Sousa Santos y col., 1997
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Cromosomal/PS96H y PS96I	Hartung y col., 1998

El contar con esta herramienta de detección, nos permite la identificación oportuna de los fitopatógenos, para poder definir los métodos de manejo que impliquen tanto los tratamientos en campo, en invernaderos, así como los tratamientos preventivos en ciclos posteriores, y que además impacten en los programas de certificación fitosanitaria.

Sin embargo, el éxito de las técnicas moleculares depende entre otros factores, de la calidad y cantidad de ADN que se extraiga de los tejidos de las plantas o de matrices complejas como el suelo y minerales. En particular, para el estudio de los fitopatógenos habitantes del suelo, ya sea para su detección, o para investigaciones referentes a ecología microbiana que permitan establecer métodos de manejo biológico, es fundamental contar con un buen método de extracción de ADN de esta matriz. La eficiencia de la lisis celular, así como la cantidad y calidad del ADN son cruciales para las subsecuentes aplicaciones.

Se han desarrollado numerosos métodos para la extracción de ADN de hongos y bacterias sin previo aislamiento del organismo (Miller y col., 1997; Orgram, 2000), no obstante, éstos se optimizan para un tipo de suelo específico, lo que implica que no se puede aplicar de manera general a todos los suelos, debido a que éstos son altamente variables en sus propiedades físicas y químicas, particularmente con respecto a la estructura y cantidad de materia orgánica. Al respecto, un problema específico es la co-purificación de los ácidos húmicos y fúlvicos y es uno de los obstáculos durante la obtención de un ADN que no contenga contaminantes, los cuales pueden afectar las técnicas moleculares como la PCR, debido a que estos compuestos son inhibidores de la Taq polimerasa (Zhou y col., 1996). Desarrollar un método único para la extracción de ADN de matrices complejas, con una eficiente lisis celular para todos los grupos microbianos y que se realice en poco tiempo sería de gran aplicabilidad para el análisis de las comunidades microbianas de cualquier suelo. Se han desarrollado varios métodos abordando los dos problemas fundamentales que son la lisis celular y la pureza del ADN, los cuales se han combinado con tratamientos químicos y físicos como son el uso de buffers de lisis que contienen alta concentración de detergentes, arena, o perlas de vidrio y enzimas como la lisozima, aplicando agitación (Frostegard y col., 1999; Millar y col., 1999). Vázquez-Marrufo y col (2002), desarrollaron un método para el aislamiento de ADN de hongos de suelo forestal modificando el protocolo de Bahnweg y col (1998). El aspecto fundamental para el éxito de este protocolo, es el uso de cloruro de bencilo (BC) el cual promueve la lisis celular y la extracción de los ácidos húmicos y fúlvicos, además de otros contaminantes orgánicos. El protocolo básicamente se realiza en dos etapas: la primera se lleva a cabo en un solo tubo la lisis celular, con el buffer de lisis, el tratamiento con BC y la extracción complementaria de compuestos orgánicos con fenol-cloroformo. En la segunda se recupera el ADN por precipitación con isopropanol. Este método posee cualidades como las de ser rápido, económico y la calidad del ADN es apropiada para la técnica de la PCR.

1.2.1. Diagnóstico molecular de hongos

En el caso de los hongos, se obtuvieron numerosas secuencias de los genes del rRNA anteriormente al desarrollo de la PCR, por aislamiento y secuenciación de los genes clonados individualmente (Medlin y col., 1988). Sin embargo, con el advenimiento de la PCR, la amplificación del ADN con esta técnica y la secuenciación directa de estos productos ha sido utilizada de manera preferencial por las ventajas que ofrece, que son las siguientes: 1) No requiere de un ADN muy puro; 2) Se requieren cantidades muy pequeñas (0.1 a 10ng) para lograr la amplificación; 3) Ambas cadenas del gen se pueden secuenciar lo cual reduce errores; y 4) el método es compatible con instrumentos de secuenciación automatizada del ADN.

Los genes del RNA ribosomal (rDNA) poseen características que son apropiadas para la detección de hongos. Los rDNA son altamente estables y exhiben una gama de regiones conservadas y variables dentro del genoma. Éstos generalmente existen en copias múltiples, por arriba de 200 copias por genoma haploide, arreglados en secuencias repetidas en tándem, en las que cada secuencia consiste de los siguientes genes y regiones intergénicas: subunidad pequeña 18S rRNA, región ITS1, 5.8S rRNA, ITS 2, y la subunidad grande 28S rRNA (Figura 1). Las regiones espaciadoras transcripcionales intergénicas (ITS), son regiones en las que se presenta más variación entre diferentes especies de hongos y por consiguiente son un blanco muy atractivo para estudios de taxonomía, filogenia y detección molecular de estos microorganismos (Whitey col., 1990; Matsumoto y col., 1999). Esta región se ha utilizado en diversas formas para el diagnóstico e identificación de hongos, y en relación a hongos fitopatógenos principalmente para el diseño de oligonucleótidos (iniciadores) específicos para varios géneros y especies.

Konstantinova y col. (2002) desarrollaron oligonucleótidos específicos para el diagnóstico e identificación de tres especies de *Alternaria*, las cuales infectan

la semilla de zanahoria y son potencialmente toxigénicas. Primero amplificaron por PCR la región ITS de 50 aislados de *Alternaria* con los oligos ITS1/ITS4 y obtuvieron fragmentos de 520 a 550 pb. En base al análisis de estas secuencias se diseñaron 15 juegos de oligos, de los cuales AAF2/AAR3 fue específico para *Alternaria alternata*, ARF2/ARR3 para *A. radicina* y ADF2/ADR1 para *A. dauci*. Estos oligos detectaron diferencialmente cada especie en un extracto de semilla o de raíz. La sensibilidad fue de 0.5 a 1 ng del ADN del patógeno en 20 ng de ADN de la planta y además se pudo detectar una semilla infectada en el análisis de 100 semillas.

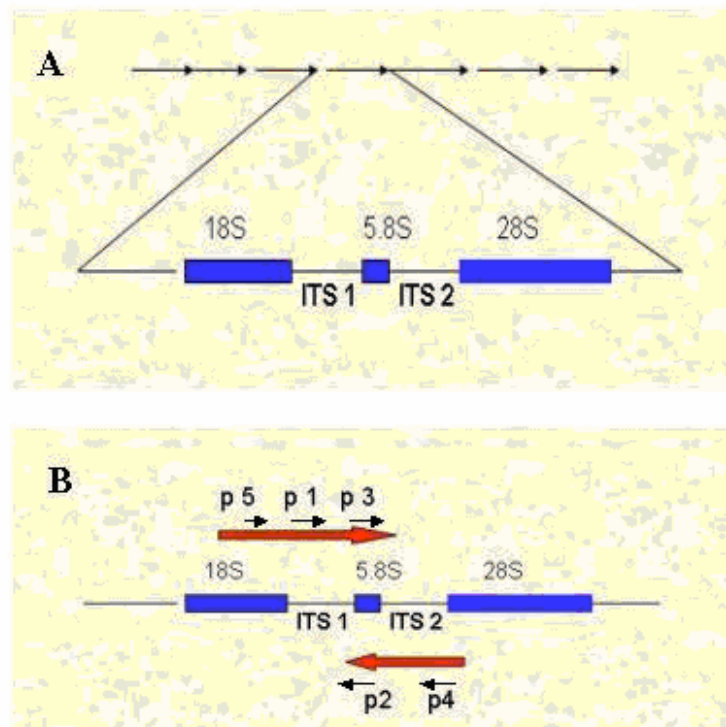


Figura 1. Regiones conservadas y variables del DNA ribosomal de hongos A) Secuencias repetidas arregladas en tandem del ADN ribosomal de hongos. Cada secuencia está constituida por los genes de la subunidad pequeña 18S, región ITS1, 5.8S rRNA, ITS 2, y la subunidad grande 28S. B) Regiones donde se diseñaron los oligonucleótidos por White y col. (1990) para amplificar las regiones ITS de los ARNr.

El Tizón tardío de la papa y jitomate causado por *P. infestans*, es una enfermedad devastadora que requiere un método rápido, seguro y específico para detectar a este hongo en los frutos infectados, hojas y tubérculos. La región ITS del rDNA de cuatro aislamientos de *P. infestans* que representan los cuatro genotipos principales, se amplificó por PCR con los oligos universales ITS5/ITS4. Los productos fueron secuenciados y las secuencias fueron comparadas con las de otras especies de *Phytophthora* y se seleccionó una región que fue única para *P. infestans*, la cual se usó para diseñar el oligo específico denominado PINF. Este se utilizó con el ITS 5 y se amplificó un fragmento de 600 pb aproximadamente solamente de papa y jitomate con *P. infestans*, dando resultados negativos con un mínimo de 13 géneros distintos de hongos y bacterias, así como 14 especies de *Phytophthora*, dando reacción cruzada únicamente con *P. mirabilis* y *P. cactarum* (Trout y col., 1997).

Recientemente se introdujo la variante A2 de *P. Infestans* a Europa y Norteamérica y conjuntamente la aparición de razas tolerantes al metalaxil, lo cual provocó la reemergencia de epidemias por este patógeno. La técnica molecular desarrollada por Trout y col. (1997) puede detectar a este hongo en muestras de papa y jitomate en campo, y considerar los métodos apropiados de manejo antes de que se desencadenen una epidemia. La región ITS del género *Phytophthora* se ha utilizado ampliamente para la diferenciación de especies, tal es el caso de un oligonucleótido sonda que en combinación con el oligo universal ITS1, amplificó solamente el ADN de *P. capsici*, *P. citricola* y *P. citrophthora*. En 2004, Tian y Babadoost utilizaron el oligo PCAP con el ITS 5 y amplificaron el ADN específicamente de *P. capsici*. Con estos oligos establecieron la gama de hospederos de este hongo en Illinois y encontraron que las cucurbitáceas y el chile son los hospederos más susceptibles.

Abd-Elsalam y col. (2003), desarrollaron dos iniciadores selectivos a nivel de taxón para identificar de una forma rápida hongos del género *Fusarium*. Estos oligos denominados ITS-Fu-f e ITS-Fu-r se diseñaron en base a la

secuencia de la región ITS de una gran variedad de especies del género *Fusarium*, amplificadas con los oligos universales ITS1 /ITS4. Se evaluó la especificidad con otros hongos como *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*. Estos oligos se aplicaron para un diagnóstico temprano de la marchitez por *Fusarium oxysporum* en plántulas de algodón.

Fusarium oxysporum f. sp. *canariensis* (FOC) es el agente etiológico de la marchitez que afecta a las palmas (*Phoenix canariensis*) de las Islas Canarias. Para facilitar el manejo de la enfermedad, se desarrolló un método de diagnóstico basado en la PCR. A partir de una biblioteca genómica de FOC, se encontró un aislamiento que se aprovechó para identificar una secuencia del ADN para el diagnóstico de un Inaje que contenga todos los aislamientos de FOC. El par de oligos HK66/HK67 amplificó un producto de 567 pb con el extracto de ADN de todos los aislamientos de FOC. Estos oligos dan una reacción cruzada con algunos aislamiento de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, las cuales se pueden diferenciar con un análisis por patrón de restricción (RFLP) (Plyler y col., 1999)

La identificación de algunas especies de *Pythium* es muy difícil a pesar de contar con medios selectivos para el aislamiento de muchas especies del suelo y de los tejidos vegetales infectados. Los problemas de identificación y cuantificación han limitado el estudio de la ecología de las especies de *Pythium* y el diagnóstico de las especies responsables de la enfermedad. En un trabajo de Kageyama y col. (1997), se amplificó la región ITS de *P. ultimum* y *Pythium* grupo HS (variante asexual de *P. ultimum*) de acuerdo a las claves de identificación de Plaats-Niterink (1981). En base a esta secuencia se diseñaron los oligos específicos K1/K3 para detectar por PCR a este hongo en plántulas con damping-off. Con estos oligos además se corroboró que el grupo HS de *Pythium* corresponde a una variante asexual.

En el período de 1994 a 1996, en Finlandia se informó de las grandes pérdidas en *Rubus arcticus* originadas por una enfermedad que provocaba manchas en las hojas y secaba el follaje. El patógeno probablemente asociados con esta enfermedad era *Peronospora sparsa*, el cual es un parásito obligado que no puede crecer *in vitro*. Esta característica hace difícil el diagnóstico de este hongo. Lindqvist y col., (1998) colectaron micelio y zoosporangios de plantas enfermas e inocularon las variedades susceptibles Pima y Mespi, en condiciones de invernadero. Después de que se manifestó la enfermedad, realizaron la extracción del ADN de estas plantas y amplificaron la región ITS con los oligos universales ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4. La secuencia de la región ITS de *P. sparsa* se comparó con la de otros hongos que infectan a *Rubus arcticus*. Se detectó una pequeña secuencia variable y característica para *P. sparsa* y con ella se diseñaron dos juegos de oligos específicos el PR1/PR2 y PR3/PR4. El último par de oligos amplificaron el ADN de plantas infectadas únicamente con *P. sparsa* y no el de plantas sanas ni el de otros hongos. Esta técnica se puede utilizar para verificar la calidad fitosanitaria de que se distribuya a los agricultores, para propagación por injerto y micropropagación.

La técnica de PCR también se puede utilizar como procedimiento simple para la identificación de todos los miembros de especies complejas como el hongo *Leptosphaeria maculans* (etapa anamorfa *Phoma lingam*) que afecta a las crucíferas, sin embargo, esta especie está dividida en dos patotipos: virulentos y avirulentos. Algunos autores las consideran dos especies distintas. Por esta situación se requiere de una herramienta molecular que permita la definición de subgrupos o subespecies. Balesdent y col. (1998) amplificaron la región ITS con los oligos universales PN3/PN10 de una colección internacional constituida por aislamientos de tres continentes (América del Norte, Europa y Australia) y un aislamiento para comparación de *Phoma nigrificans*. Se encontró polimorfismo en el tamaño de la región ITS, que permitió distinguir tres grupos. Posteriormente la digestión de la región ITS con 19 endonucleasas de restricción mostró cinco diferentes subgrupos y que el sitio de polimorfismo es

conservado para cada subgrupo. Se logró la amplificación directa de la región ITS, utilizando conidias intactas de cultivos axénicos o de hojas, con solamente una etapa de desnaturalización a 95°C /4 min previa a la reacción de PCR. Se estableció un protocolo de rutina para la identificación de subgrupos de *L. maculans*, el cual no requiere de la extracción de ADN y se fundamenta en la simple caracterización de la región ITS.

Además de diagnosticar e identificar a los hongos fitopatógenos en los tejidos de las plantas enfermas, también es posible diagnosticarlos con la PCR en suelo, en sustratos para propagación en invernaderos y en agua. En estas circunstancias, es frecuente que la cantidad de ADN del hongo se encuentre en niveles bajos y por consiguiente lo adecuado es realizar una técnica de PCR anidada. Una investigación en este sentido fue realizada por Faggian y col (1999), quienes desarrollaron una técnica de diagnóstico por PCR anidado para detectar a *Plasmodiophora brassicae* en el suelo y el agua, con los oligos específicos externos Pb ITS1/PbITS2 e internos PbITS6/PbITS7. Hongos relacionados como *Spongospora subterranea* y otros que se ubican en las raíces de crucíferas no fueron detectados. Debido a que *P. brassicae* es parásito obligado y habitante del suelo, los métodos de diagnóstico implican pruebas de patogenicidad que tardan alrededor de ocho semanas. Esta técnica representa una forma rápida de revelar los suelos infestados por *P. brassicae* y llevar a cabo las acciones conducentes para su tratamiento.

1.2.2. Diagnóstico molecular de bacterias

Diversas estrategias se han llevado a cabo para el diseño de oligos específicos para la detección de bacterias fitopatógenas por PCR, una de ellas implica las secuencias de ADN implícitas en los genes de patogenicidad (Leite y col., 1994), Por ejemplo, las variantes de *Agrobacterium* parecen ser un complejo de genotipos cromosomales capaces de estimular la enfermedad en base a la presencia de un plásmido inductor de tumor (Ti; *A. tumefaciens*) o un

plásmido inductor de la proliferación de raíces (Ri; *A. rhizogenes*). No obstante, todas las variantes patógenas tienen genes de virulencia (*vir*) que intervienen en la transferencia del ADN de la bacteria a la planta. El entendimiento de los mecanismos de patogenicidad ha permitido el diseño de numerosos juegos de oligos que se derivan de los genes de patogenicidad. Haas y col. (1995) usaron oligos para la porción altamente conservada del gen *virD2* con los cuales se detectan cepas patogénicas de *Agrobacterium*. También se diseñaron oligos para amplificar el segmento del oncogén *ipt*, asociado con la inducción de agallas, los que permiten diferenciar las cepas inductoras de tumores de las que no lo hacen. Darrase y col. (1994) diseñaron los oligos para amplificar un fragmento de 434 pb del gen que codifica la enzima pectato liasa (gen *pel*), la cual está asociada al síntoma de pudrición blanda que provocan las cepas de *Erwinia carotovora*. Estos iniciadores podrían identificar específicamente subespecies pectolíticas incluyendo a *wasabie*, *atroseptica* y *odorifera* pero no a *betavascularum* y otras especies de *Erwinia*.

Varios iniciadores se han desarrollado para amplificar segmentos de genes asociados a factores de virulencia, tales como el gen *efe* (enzima formadora de etileno). La detección específica de variantes virulentas permite la identificación rápida de éstas en una población dada. Otra estrategia es la utilización de los genes del rRNA (Bagic y col., 1995; Maes y col., 1996). En las bacterias el rDNA comprende tres genes evolutivamente conservados, el gene de la subunidad pequeña 16S rRNA, el de la subunidad grande 23S rRNA y el gene 5S rRNA y dos interespacios diferentes que son la región espaciadora transcripcional intergénica (ITS) y el pequeño espacio entre la 23S y 5S. Estrategias múltiples se han adoptado para caracterizar a las bacterias basándose en el DNA ribosomal. Se han diseñado oligos para las regiones altamente conservadas de estos genes, a los que se les denomina oligos universales (Fig. 2). Dentro de las técnicas de secuenciación para filogenias, se han analizado las secuencias de 5S, 16S y 23S y al parecer el uso de la 16S es la más adecuada ya que los oligos universales flanquean una región mayor de

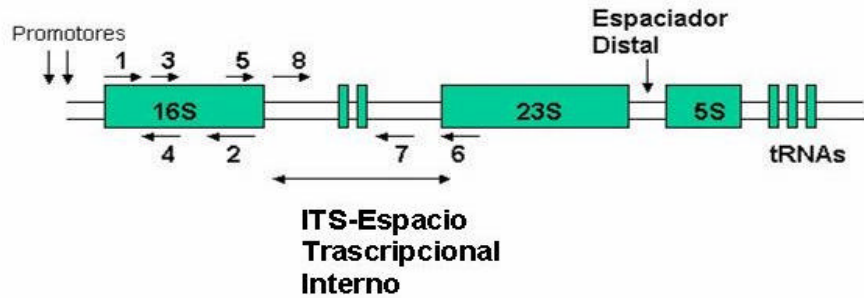


Figura 2. Organización del DNA ribosomal en bacterias. Los genes del rRNA poseen regiones conservadas y variables, además de la región ITS que pueden ser aprovechadas por diversos métodos para el estudio filogenético y detección de bacterias fitopatógenas. Los oligonucleótidos universales para amplificar el ADNr corresponden al juego 1-2; para la amplificación de los ITS se utilizaron los juegos de oligonucleótidos 5-6. Los juegos 3-4, 8-7, 5-7 y 8-6 para el diseño de oligonucleótidos específicos

de oligonucleótidos específicos de 1000 pb lo cual hace más robusto el análisis filogenético comparado con regiones menores de 5S y 23 S. Su análisis ha permitido encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para estos casos se diseñan oligos en regiones variables del rRNA 16S, de tal forma que a partir de secuencias conservadas se pueden generar oligos universales que amplifiquen un grupo bacteriano y en regiones variables del mismo, se diseñan oligos para seleccionar especies o serotipos (Louws y col., 1999). Las secuencias específicas en el 16S RNA a nivel de género para las fitobacterias están bien documentadas (DeParasis y Roth, 1990) y en base a ellas se han diseñado oligos para las diversas especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Maes (1993) dedujo un juego de oligos por combinación de un oligo universal para el 16S rDNA con un primer reverso específico para *Xanthomonas*, que fueron capaces de amplificar un fragmento específico de 480 pb para bacterias de ese género en extractos de semillas de trigo. Seal y col (1993,1992) desarrollaron “primers” con los que amplificaron un fragmento del 16SrRNA de 287-288 pb específico de *Ralstonia solanacearum*, a partir de 1 a 10 UFC (unidades formadoras de colonias). Estos oligos fueron útiles para identificar razas y biovars, no obstante, dan reacciones cruzadas con otras bacterias asociadas a la papa. También se han utilizado las

secuencias del 23S rRNA de *Erwinia amylovora* amplificando con los oligos específicos para este gen (oligos 3-4) (Louws y col., 1999).

En cuanto a los genes de la región espaciadora entre 16S y 23S rRNA Takeuchi y col (1997), secuenciaron esta región para 6 especies de *Burkholderia* y la de otras dos bacterias relacionadas. Con ellas pudieron diseñar oligos específicos dentro de la región ITS para detectar a *B. plantarii* y *B. glumae* que se asocian a daños en plántulas de arroz. La región ITS puede incluir varios genes tRNA y regiones no codificantes y parece estar bajo menos presión de selección y además ser más variable que la 16S y 23S rRNA. La secuencia del 16S rRNA se ha utilizado para estudios filogenéticos entre especies de *Erwinia carotovora*, productoras de pudriciones blandas, sin embargo, la identificación de subespecies no es resuelta por este método. Las multicopias de la región ITS exhiben mayor variabilidad por lo que ésta se amplificó con oligos universales y la identificación se realizó por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Toth y col., 2001).

El ADN plasmídico y las secuencias específicas de funciones desconocidas han servido como molde para el diseño de oligos específicos y para el diagnóstico por PCR de varios patógenos. Algunos genes de los plásmidos están relacionados con mecanismos de patogenicidad y con funciones desconocidas. En varios casos los oligos para la amplificación del ADN plasmídico no han podido detectar a todas las variantes virulentas de un grupo de patógeno en cuestión. Por ejemplo, los oligos X4c y X4e no detectan a todas las variantes de las *Xanthomonas* patógenas del frijol que causan el Tizón común del frijol (Audy y col., 1994; Toth y col., 1998). En particular para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), la alta homología entre las subespecies había complicado el desarrollo de sondas específicas de ADN. No obstante, Eichenlaub y col (1992); así como Meletzus y col. (1993) encontraron una cepa de esta bacteria con genes de patogenicidad *pat.1* en un plásmido pCM1 y un gen para una endocelulasa (*cel A*) en un plásmido pCM2.

Dreier y col (1995) diseñaron un juego de oligos (CMM-5 y CMM-6) derivados de la secuencia parcial del gen *pat 1*, los cuales resultaron ser específicos solamente para cepas virulentas de *Cmm* y establecieron un método de diagnóstico por PCR para este patógeno en tejidos vegetales y semillas.

El ADN plasmídico y las secuencias específicas de funciones desconocidas han servido como molde para el diseño de oligos específicos y para el diagnóstico por PCR de varios patógenos. Algunos genes de los plásmidos están relacionados con mecanismos de patogenicidad y con funciones desconocidas. En varios casos los oligos para la amplificación del ADN plasmídico no han podido detectar a todas las variantes virulentas de un grupo de patógeno en cuestión. Por ejemplo, los oligos X4c y X4e no detectan a todas las variantes de las *Xanthomonas* patógenas del frijol que causan el Tizón común del frijol (Audy y col., 1994; Toth y col., 1998). En particular para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), la alta homología entre las subespecies había complicado el desarrollo de sondas específicas de ADN. No obstante, Eichenlaub y col (1992); así como Meletzus y col. (1993) encontraron una cepa de esta bacteria con genes de patogenicidad *pat.1* en un plásmido pCM1 y un gen para una endocelulasa (*cel A*) en un plásmido pCM2. Dreier y col (1995) diseñaron un juego de oligos (CMM-5 y CMM-6) derivados de la secuencia parcial del gen *pat 1*, los cuales resultaron ser específicos solamente para cepas virulentas de *Cmm* y establecieron un método de diagnóstico por PCR para este patógeno en tejidos vegetales y semillas.

Sousa Santos y col (1997) desarrollaron una técnica para la detección específica por PCR de *Cmm* en semillas de jitomate. Para ello diseñaron los oligos específicos CM₃ y CM₄ a partir de un fragmento de ADN único en *Cmm*, el cual se seleccionó del DNA total de una cepa patogénica húngara no 3613 aportada por Ib Dinesen, Stattens Planteavesforsog, Lyngby, Denmark, que fue clonado por la técnica "shot-gun cloning" (una gran cantidad de diversos fragmentos de restricción se insertaron al azar en un plásmido). Los oligos

diseñados amplificaron un fragmento de 645 pb de cinco cepas de *Cmm* pero no de otras bacterias patógenas y saprófitas incluyendo a las subespecies *C. m. subsp. sepedonicum*, y *C. m. subsp. insidiosus*. La banda del tamaño esperado también se obtuvo con los extractos de semilla infestadas artificialmente (en algunas ocasiones la amplificación fue negativa, probablemente por la presencia de compuestos inhibidores en los extractos).

Alvarez (s/f), evaluó los oligos CMM-5/CMM-6 y los oligos CM₃/CM₄ con una colección aproximadamente de 231 aislamientos de *Cmm* y sus resultados indicaron que con los oligos CMM-5/CMM-6, existió una concordancia entre el resultado de la PCR con las pruebas de patogenicidad del 75% de los aislamientos. A diferencia con los obtenidos con los oligos CM₃/CM₄ que fue del 90%, llegando a la conclusión que estos últimos son mejores para el diagnóstico e identificación de *Cmm*.

1.2.3. Diagnóstico molecular de fitoplasmas

En lo que se refiere a bs fitoplasmas, la PCR es la técnica más versátil para su detección en la planta hospedera y en su vector, y se basa principalmente en secuencias específicas para este grupo microbiano dentro del gene 16S rRNA (Lee y col., 1993). Básicamente las secuencias del 16S rRNA y su análisis por RFLP son el fundamento del sistema taxonómico actual de los fitoplasmas, El análisis molecular los ubica dentro de la clase Mollicutes y están subdivididos en 14 grupos principales y 46 subgrupos (Fig. 3) (Lee y col., 1998).

Varios métodos se han desarrollado para la detección de fitoplasmas, los cuales difieren prácticamente en el tipo de iniciadores. Éstos se han diseñado en base a secuencias conservadas del 16S rRNA. La mayoría se han utilizado para la diferenciación de grupos de fitoplasmas, lo que significa que los

productos de PCR son relativamente grandes, y por consiguiente disminuye la sensibilidad. En el Cuadro 3, se resumen los juegos universales de oligos que se han diseñado para la detección de fitoplasmas. Los oligos P1/P6 o P7 se han aplicado ampliamente y con ellos se detectan todos los aislamientos de fitoplasmas. El riesgo es que el ADN de otros procariotes puede interferir especialmente con el P1/P6. El tamaño del producto de 1500 a 1800 pb disminuye probablemente su sensibilidad. No obstante, Green y Thompson (1999) amplificaron con los oligos P1/P7 el rDNA de los siguientes fitoplasmas: *pear decline*, *western X*, *peach yellow leaf roll*, *peach rosette*, *apple proliferation*, *Australian grapevine yellows* y *Vaccinium witches'broom*. El producto contiene la secuencia completa del gen 16SrRNA y la región espaciadora entre el 16/23S.

En Australia, tres enfermedades que inciden en el cultivo del papayo (*Carica papaya*) se han asociado con fitoplasmas y son dieback, yellow crinkle y mosaic. La amplificación del ADN (de muestras con los síntomas característicos de cada enfermedad) con los oligos P1/P7 y fU5 /AGY2 (oligos específicos a nivel de grupo) permitió diferenciar solamente dos tipos de fitoplasmas y se concluyó que yellow crinkle y mosaic son originados por el mismo patógeno, no así dieback que es causado por un fitoplasma asociado al subgrupo stolbur del aster yellows. Estos oligos facilitaron los estudios epidemiológicos de las enfermedades de la papaya (Guthrie y col., 1998).

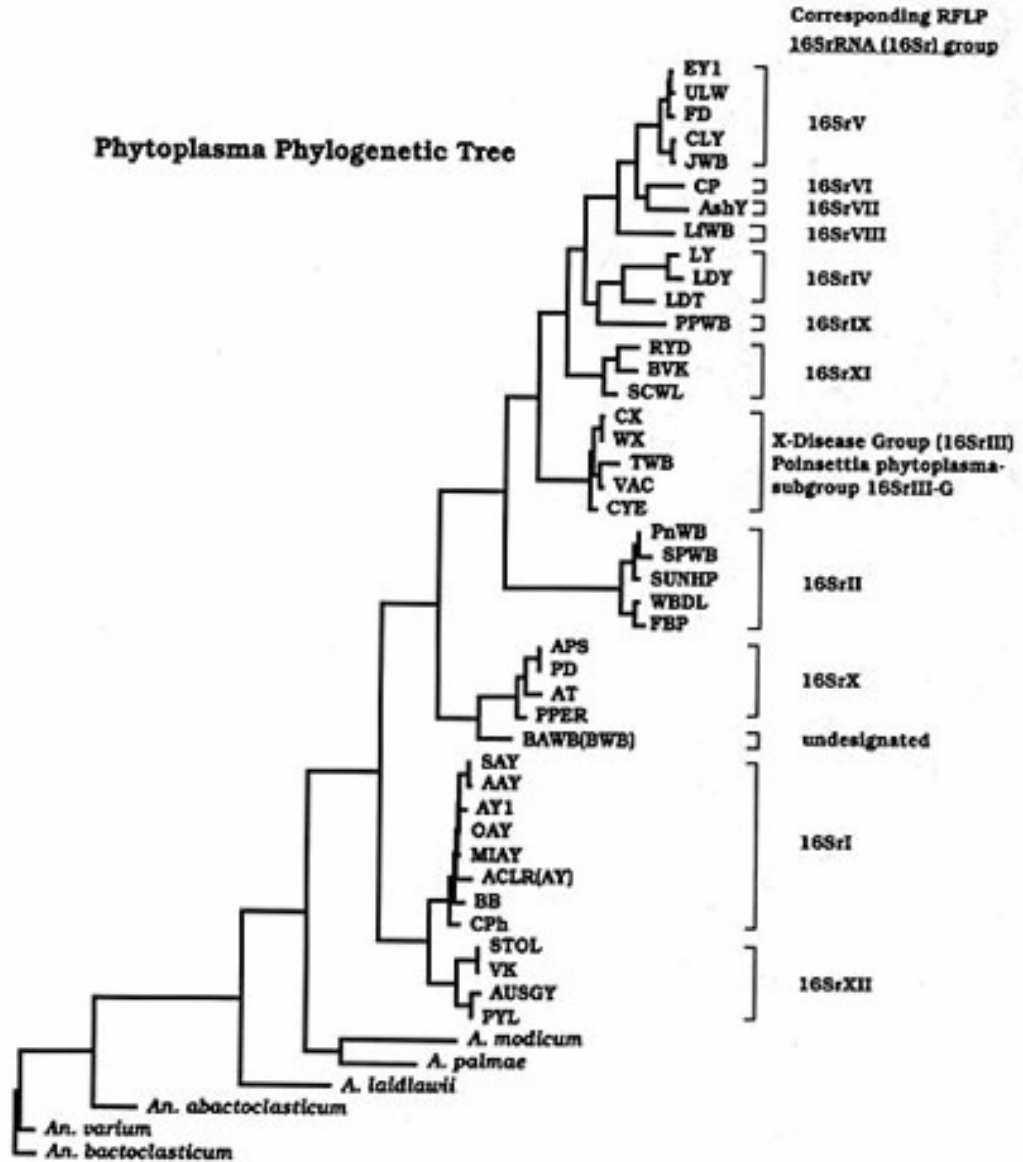


Fig. 3. Árbol filogenético de 42 especies diferentes de fitoplasmas construido por el análisis de la secuencia completa del gen 16r RNA y seis miembros de la clase Mollicutes. Figura tomada de <http://www.uniud.it/phytoplasma/>.

Cuadro 3 Oligos universales diseñados para la detección e identificación de fitoplasmas (para consultar las secuencias de oligonucleótidos referirse a las citas en el cuadro).

Oligos	Tamaño del producto de PCR-pb	Método desarrollado por:
SN910601/SN910502	1370	Namba y col.,1993
“Ahrens”	558	Ahrens y Seemüller,1992
P1/P6	1500	Deng y Hiruki, 1991
P1/P7	1800	Deng y Hiruki, 1991 y Schneider y col., 1995
NGF/NGR	506	Andersen y col.,1998
fU5/rU3	865	Lorenz y col., 1995
R16mF2/R16mR1	1400	Gundersen y Lee, 1996
R16F2n/R16R2	1248	

La secuencia del ADN ribosomal y no ribosomal de fitoplasmas que causan las enfermedades “apple proliferation” y “pear decline” fueron analizadas para diseñar un par de oligos para la detección e identificación de estos fitoplasmas. El juego de oligo fU5/rU3 derivados del rDNA amplificó el ADN de 42 muestras de perales infectados con “pear decline” y 36 árboles de manzano con “apple proliferation”. Estos oligos también amplificaron el rDNA de diferentes fitoplasmas probados. Además se diseñaron un par de oligos específicos (fO1/rO1) para el grupo de fitoplasmas que incluye a los dos anteriores y a otros fitoplasmas asociados como el “European stone fruit yellows”. La detección de los fitoplasmas “apple proliferation” y “pear decline” con los oligos fU5/rU3 y fO1/rO1 fue más sensible (Lorenz y col., 1995).

Normalmente, los fitoplasmas se encuentran en concentraciones muy bajas, además de estar localizados en tejidos muy específicos por lo que es

difícil detectarlos. La metodología alterna ha sido la aplicación de la PCR anidado, con la combinación de los diferentes juegos de oligos universales. Waterworth y Mock (1999), establecieron una técnica de PCR anidada para evaluar en forma rutinaria fitoplasmas en yemas invernantes de árboles frutales. Los juegos de oligos universales R16mF2/R16mR1 se utilizaron para la primera amplificación, en tanto que R16F2n/R16R2 para la segunda (oligos diseñados por Gundersen y Lee, 1996). En todas las muestras infectadas que se analizaron, se detectaron fitoplasmas asociados con las enfermedades “peach yellow leaf roll”, “Western X”, “apricot chlorotic leaf roll”, “plum leptonecrosis” y “apple proliferation”. Rápidamente se detectaron fitoplasmas tanto en yemas invernantes como en tejido internodal de *Prunus* spp. Esta técnica reemplaza al método de detección por injerto en plantas indicadoras, la cual puede dar resultado en tres años. En Colombia también se utilizó esta PCR anidada, con los mismo oligos de Gundersen y Lee (1996) para esclarecer la etiología de una enfermedad en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), la que se conoce como “Frogskin disease” y causa pérdidas aproximadamente del 90%, y que correspondió a un fitoplasma (CIAT, 2002). Saumtally y col., (s/f) probaron los pares de oligos P1/P7, SN 9106601/P6, R16mF2/R16mR1 y R16F2n/R16R2 para detectar por PCR al fitoplasma causante de la “sugar yellows phytoplasma”. Estos investigadores llegaron a la conclusión que los mejores iniciadores fueron R16mF2/R16mR1 y R16F2n/R16R2. En años recientes, en México, el cultivo de la papa ha sido afectado por dos enfermedades llamadas “potato purple top” (PPT) y “potato hair sprout” (PHS). Existen evidencias de que los agentes etiológicos son fitoplasmas. Se realizó una técnica de PCR anidada con los juegos de oligos P1/Tint y R16F/R16RR2. Los productos de PCR se analizaron por RFLP y éstos revelaron coinfecciones por dos fitoplasmas que infectan al cultivo de la papa; el causante de PPT corresponde al grupo 16SrI y el PHS al 16SrII (Leyva-López y col., 2002)

Luna-Esquivel y col. (2003) lograron identificar un fitoplasma en plantas de gandú (*Cajanus cajan*) y frijol lima (*Phaseolus lunatus*), con síntomas de escoba

de bruja y lámina foliar reducida. Las muestras se colectaron en el municipio de Altamirano estado de Guerrero, México, con el fin de determinar la presencia de fitoplasmas mediante PCR con el par de iniciadores P1/Tint; el fragmento se sometió a una segunda reacción con los iniciadores R16F2/R16R2. El producto amplificado en la segunda reacción fue digerido con las enzimas de restricción *AluI*, *KpnI*, *MseI*, *HpaII*, *HhaI*, y *Tsp509I*. Los patrones de restricción y secuenciación del fragmento 16S ADNr (Acceso AY247417, AY248753), indicaron similitud con el grupo 16SrIX del fitoplasma pigeon pea witches broom. Por primera vez se informa de la presencia de este fitoplasma en el estado de Guerrero en México.

La secuencia del gen 16S rRNA de fitoplasmas es muy similar, lo cual dificulta el diseño de oligos específicos. Todos los fitoplasmas examinados a la fecha contienen dos operones rRNA, los cuales parecen ser idénticos. Smart y col., 1996 analizaron la región espaciadora entre el 16S y 23S y encontraron que presenta mayor variabilidad que la 16S. Ellos diseñaron 10 iniciadores a partir de la región espaciadora, los cuales amplificaron específicamente el ADN de algunos grupos de fitoplasmas como el “elm yellows”, “ash yellows” y “pear decline”. También se han diseñado oligos específicos en el caso de la enfermedad del amarillamiento letal (Letal Yellowing, LY) del cocotero (*Cocos nucifera* L) que está presente en Cuba desde finales del siglo XIX ocasionando daños severos en diferentes regiones del país; se realizó el diagnóstico por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando los oligos específicos LYC24F y LYC24R. Los resultados positivos obtenidos por PCR al utilizar dichos oligos confirman la presencia del LY en Cuba. Se determinó una gran similitud entre las secuencias de los clones cubanos y las de los fitoplasmas causantes de esta enfermedad en México (Llauger y col., 2001; Harrison y col., 1996) desarrollaron una técnica de PCR capaz de detectar específicamente al fitoplasma asociado con la enfermedad “maize bushy stunt” del maíz. Estos investigadores diseñaron los oligos MBS-F1/MBS-R1, de una secuencia parcial de un fragmento del ADN del fitoplasma MBS clonado.

Finalmente nuevas tecnologías para el diagnóstico de enfermedades de plantas se están desarrollando con el objetivo de incrementar la sensibilidad, la especificidad y la rapidez para obtener los resultados, a través de la combinación de las técnicas tradicionales con la nuevas técnicas basadas en los ácidos nucleicos, y dichas innovaciones harán que los procedimientos complejos sean más simples y aplicables a un gran número de muestras.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer las técnicas moleculares basadas en la PCR que permitan diagnosticar certera y oportunamente algunas de las enfermedades de importancia económica del jitomate y del chile, en el altiplano potosino.

Objetivos específicos

- 1.- Identificar por métodos moleculares al agente causal del cáncer bacteriano en semilla, suelo y plantas establecidas en invernadero y campo, utilizando los oligonucleótidos CM₃ y CM₄ específicos para *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.
- 2.- Diagnosticar la presencia de hongos fitopatógenos en semilla, suelo y plantas establecidas en invernadero y campo mediante la amplificación de las regiones ITS (internal transcribed spacer) de los genes RNA ribosomales.
- 3.- Detectar por técnicas moleculares a las bacterias causantes de la fitoplasmosis en base a las secuencias conservadas de los genes ribosomales (16S rDNA) de estas bacterias.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colecta de muestras

Se realizaron inspecciones de campo en diferentes predios de la región de Arista, la cual comprende a Villa de Arista, Moctezuma, Bocas y Venado; además en Villa de Guadalupe (predios del Huizache), Cedral y Vanegas. Se registró la sintomatología en plantas de jitomate y chile, se determinó la incidencia, el patrón de distribución de cada enfermedad y se colectaron muestras de plantas con síntomas característicos para las diferentes enfermedades bacterianas, fungosas y virales.

2.2. Cepas de referencia de microorganismos fitopatógenos.

Se adquirieron las cepas de *Clavibacter michiganensis michiganensis*, (*Cmm*) *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum* y *Alternaria solani* del cepario del Institute of Fermentation of Osaka, Japan. Las cepas *Phytophthora capsici* y *P. Infestans* fueron proporcionadas por la Dra Silvia González Pavia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y la de *Rhizoctonia solani* se aisló de plantas enfermas de la región.

2.3. Reactivos y medios de cultivo

En general, los reactivos que se utilizaron en la preparación de la soluciones fueron de alta pureza y provenían de compañías como Sigma-Aldrich, J. T. Baker, Biochemics y Shelton Scientific-IN. Los medios de cultivo fueron de Bioxon, Beckton Dickinson, y Merck. Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron de New England BioLabs, Invitrogen, Inc. y Promega. La Taq DNA-polimerasa de Roche Diagnostic.

2.4. Extracción de ADN

Se ensayaron diferentes protocolos de extracción de ADN total de tejidos vegetales, así como para los cultivos de los hongos y bacterias de referencia. Sin embargo, considerando que los métodos de diagnóstico deben ser rápidos y prácticos, es fundamental para esto contar con un solo método de extracción, y de acuerdo a Sharma y col (2003) una característica deseable del mismo, cuando es aplicado rutinariamente a un gran número de muestras, es no depender del uso de nitrógeno líquido. En base a lo expuesto, se estableció un solo método de extracción de ADN para todas las cepas microbianas, así como para las diferentes muestras de tejido vegetal y semilla. Este se fundamentó en el método utilizado por Green y Thompson (1999) que no utiliza nitrógeno líquido y consiste en moler 0.5 g de tejido vegetal, o la biomasa microbiana de una caja petri con medio de cultivo, con 2 ml del buffer de extracción CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) compuesto por 100 mM de Tris-HCl a pH 8.0, 1.4M de NaCl, 50mM de EDTA a pH 8.0, 2.5% de CTAB, 1% polivinilpirrolidona y 0.2% 2-mercaptoetanol. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 4.

Tomando en cuenta que la enfermedad denominada “cáncer bacteriano” tiene también al suelo como fuente de inóculo importante, es vital disponer de un método de extracción de ADN de las bacterias (*Cmm*) que infestan los suelos y con ello poder detectar al patógeno en esta matriz compleja. El método debe de cumplir con ciertas características, como ser eficiente en la lisis de las células inmersas en el suelo, en la obtención de ADN en cantidad suficiente, y eliminar además los elementos inhibidores de la Taq polimerasa como ácidos húmicos y fúlvicos. Se eligió el protocolo de extracción de ADN de microorganismo del suelo propuesto por Vázquez-Marrufo y col. (2002), el cual se distingue por usar cloruro de bencilo para eliminar a los ácidos húmicos y fúlvicos. El protocolo fue modificado para su optimización ya que no funcionó con una sola etapa líquida de transferencia como proponen los autores, se utilizó además un buffer de lisis diferente, y las cantidades de buffer de lisis,

cloruro de bencilo y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se redujeron a la mitad de las indicadas en la referencia original (Cuadro 5). Este protocolo se probó con suelo infestado tanto de modo artificial como naturalmente (procedente de Villa de Arista, SLP), y con suelos no infestados de otros sitios.

Cuadro 4. Protocolo de extracción de ADN a partir de tejidos vegetales infectados, y de cepas microbianas de referencia

- 1. Pesar 0.5 g de tejido infectado y agregar 500 ml de buffer de extracción, para posteriormente triturar por maceración en un mortero.**
- 2. Incubar el homogeneizado (vegetal o microbiano) a 65°C por 30 min**
- 3. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min**
- 4. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorff limpio, adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 13,000 rpm por 10 min**
- 5. Separar la fase acuosa y volver a adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 13,000 rpm por 10 min**
- 6. Pasar la fase acuosa a un tubo eppendorff limpio y agregar 2 ml de RNAasa 25 mM e incubar a 37°C por 30 min**
- 7. Precipitar el ADN con un volumen igual de alcohol isoamílico e incubar en hielo por 5 min**
- 8. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min y eliminar el sobrenadante**
- 9. Lavar la pastilla con 450 ml de etanol al 70%**
- 10. Centrifugar a 13,000 rpm 2 min y eliminar el sobrenadante**
- 10. Secar al aire y resuspender en 40 ml de TE (Tris.HCl 10 mM y EDTA 1 mM) pH 8.0**

Cuadro 5. Protocolo extracción de ADN para microorganismos del suelo y de cepas microbianas de referencia

- 1. Disolver 5 g de suelo previamente pulverizado en 2 ml (si el suelo está húmedo) o con 5 ml (suelo seco) del buffer de extracción CTAB (bromuro de hexadeciltrimetil-amonio) compuesto 100 mM de Tris_HCl a pH 8.0, 1.4 M NaCl, 50 mM de EDTA a pH 8.0, 2.5% de CTAB, 1% polivinilpirrolidona y 0.2% de 2-mercaptoetanol.*
- 2. Transferir la muestra a un tubo de polipropileno de 50 ml e incubar a 65°C por 15 min con agitación.*
- 3. Adicionar 5 ml de cloruro de bencilo y mezclar con vortex por 3 min. Incubar a 65°C por 15 min con agitación.*
- 4. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio*
- 5. Agregar 5 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y mezclar con vortex por 1 min. Incubar en hielo por 10 min.*
- 6. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min. Obtener la fase acuosa y adicionar un volumen igual de isopropanol frío.*
- 7. Incubar a -20 °C por 15 min y centrifugar a 13,000 rpm por 15 min*
- 8. Eliminar la fase acuosa y lavar la pastilla con etanol al 70% para eliminar las sales.*
- 9. Secar la pastilla al aire y disolver en 50 µl de TE (10mM de Tris-HCl y 1mM de EDTA a pH 8.0)*

2.5. Diagnóstico de enfermedades basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Considerando la sintomatología observada en campo, se realizó el diagnóstico presuntivo de la o las enfermedades presentes en las plantas, y en base a ello, se definió la composición de la mezcla maestra de reacción, las condiciones para la amplificación del ADN y los oligonucleótidos a utilizar.

Se eligieron los iniciadores apropiados de acuerdo a estudios publicados y a la enfermedad o enfermedades diagnosticadas por una evaluación preliminar. Para el cáncer bacteriano (*Cmm*) se eligieron los oligos CM3 y CM4 reportados

por Sousa-Santos y col (1999) (ver cuadro 6). En relación a los hongos, se ensayaron los juegos de oligos ITS1/ITS2, ITS1/ITS4 e ITS5/ITS4, reportados por White y col (1990) (ver cuadro 6); siendo los más eficaces ITS1/ITS4, los cuales fueron flanqueados por los sitios de restricción *EcoRI* y *Xba I* con la finalidad de clonar los productos de PCR obtenidos en el vector pBlueScript-KS (Stratagene, Inc).

Para la detección y amplificación de los fitoplasmas se optó por una técnica de PCR anidado y para ello se dispuso de dos juegos de oligos universales que amplifican la secuencia del 16S rRNA (ver cuadro 6).

Para los ensayos de PCR, se utilizó el termociclador TouchGene (Techne-Inglaterra). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen (AccesoLab de México). Los productos de PCR (alícuotas de 5 a 8 μ l) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5% y teñidos con bromuro de etidio (1 μ g/ml).

2.6 Identificación de hongos por secuenciación de las clonas

Para la identificación de los hongos patógenos se clonaron los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ITS1/ITS4, cuyo tamaño fuera similar a la de los hongos fitopatógenos que se utilizaron como referencias, y estuviesen relacionados con la sintomatología previamente observada. Estos productos se purificaron con el kit comercial QIAquick PCR purification kit de QIAGEN, o con el kit Wizard^R PCR Clean-Up System de Promega; en ambas situaciones se siguieron las indicaciones del proveedor. Para efectuar la ligación en el plásmido pBSK (pBluescript II SK +, vector de clonación de Stratagene, Inc), cada producto purificado se digirió con 1.5 μ l (15 Unidades) de las enzimas

Cuadro 6. Condiciones utilizadas para la amplificación por la técnica de la PCR de fragmentos de ADN indicadores de enfermedades provocadas por bacterias y hongos.

Enfermedad	Iniciadores	Mezcla Maestra	Condiciones
<p>Cáncer Bacteriano</p> <p>CM3-CM4 (Sousa Santos y col., 1999)</p> <p>5'CCTCGTGAGTGCCGGGAACGT ATCC-3'</p> <p>5'CCACGGTGGTTGATGCTCGCG AGAT-3'</p> <p>Tamaño del producto de PCR 645pb</p> <p>Marchitamientos Fungosos</p> <p>ITS1-ITS4 (EcoRI) (White y col. 1990).</p> <p>ITS 1 (Xba I):</p> <p>5'GAGTCTAGATCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3</p> <p>ITS 4 (EcoRI):</p> <p>5'AAGCACTTCCGCTTATTGATATGC-3</p> <p>Tamaño del producto variable, de acuerdo a la especie del hongo</p>	<p>Buffer Taq polimerasa 1X,</p> <p>MgCl₂ 1.5 mM,</p> <p>dNTPs 0.2mM</p> <p>Iniciadores 1mM</p> <p>Taq polimerasa 2.5</p> <p>UT DNA 1 mg</p>	<p>Desnaturalización inicial 94° C/2min</p> <p>35 ciclos :</p> <p>Desnaturalización: 94° C/1min</p> <p>Alineamiento: 55° C/1min</p> <p>Extensión: 72° C/1min</p> <p>Extensión final: 72° C/7min</p>	
<p>Fitoplasmas</p> <p>PCR anidado</p> <p>R16mF2/R16mR1 como oligonucleótidos externos:</p> <p>5'CATGCAAGTCGAACGGA-3'</p> <p>5'CTTAACCCCAATCATCGAC-3'</p> <p>R16F2n/R16R2</p> <p>5'GAAACGGCGGTGTGTACAAAC CCCG-3'</p> <p>5'TGACGGGCGGTGTGTACACCG -3'</p> <p>(Gundersen y Lee, 1996)</p> <p>Tamaño del primer producto de PCR: 1400pb</p> <p>Tamaño del segundo producto de PCR: 1248pb</p>	<p>Buffer Taq polimerasa 1X</p> <p>MgCl₂ 3.0 mM</p> <p>DNTPs 0.8mM</p> <p>Iniciadores 0.1mM</p> <p>Taq polimerasa 1 UT</p> <p>DNA 120ng</p> <p>Segundo PCR:</p> <p>Mismas características</p> <p>De la mezcla de reacción, excepto que el primer producto de PCR se diluye 1:10 ó 1:30 y se toma 1ml como DNA molde</p>	<p>Desnaturalización inicial 94° C/2min</p> <p>35 ciclos :</p> <p>Desnaturalización: 94° C/1min</p> <p>Alineamiento: 55° C/2 min</p> <p>Extensión: 72° C/3 min</p> <p>Extensión final: 72° C/10 min</p> <p>Segundo PCR:</p> <p>Mismas condiciones excepto para el alineamiento que es: 50° C/2 min</p>	

EcoRI y *Xba I*, y 5 μl del buffer 10X para *Xba I*, y se incubaron durante 2 horas a 37°C. El plásmido se digirió con las mismas enzimas. Los productos digeridos se volvieron a purificar como se describió anteriormente. La ligación de los productos de PCR digeridos con pBSK se llevó a cabo en un volumen de 15 μl de acuerdo a protocolos estándares (la relación vector-inserto fue de 1:3), 1 μl de la enzima T4 ADN ligasa (1 unidad/ μl), y 3 μl del buffer 5X para la T4 ADN ligasa).

2.7 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 por el método de CaCl_2 .

Se creció un precultivo de la bacteria toda la noche para posteriormente inocular 100 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, usando una luz de 600nm. El cultivo se distribuyó en alícuotas de 25 ml en tubos para centrifuga estériles. Se centrifugó a 3000 rpm/10 min, y el paquete bacteriano se resuspendió en 12 ml de MgCl_2 0.1M. Se volvió a centrifugar con las mismas condiciones y el paquete bacteriano se resuspendió nuevamente en 12 ml CaCl_2 0.1M. Finalmente se repitió el procedimiento del paso anterior, pero esta vez las bacterias se suspendieron en 5 ml de CaCl_2 0.1 M más 70 μl de dimetilsulfóxido. Todo el proceso se realizó a baja temperatura (en hielo). Se distribuyeron alícuotas de 200 μl en tubos Eppendorff estériles y se congelaron de inmediato con nitrógeno líquido, almacenándose a -70°C.

2.8 Transformación de bacterias

Se descongelaron las células competentes en hielo y se les adicionó 5 μl de la reacción de ligación, mezclando rápidamente e incubando en hielo por 10-15 min. Posteriormente se dio a las bacterias un choque térmico a 42°C/1.5 min, seguido de incubación en hielo por 5 a 10 min. Se les adicionó 500 μl de medio

LB y se incubaron a 37°C/45 min. Posteriormente se obtuvo el paquete bacteriano por centrifugación a 8000 rpm/2 min. Este se resuspendió con vórtex en 100 µl de LB. Alícuotas de 20 a 50 µl se sembraron en medio LB/ ampicilina/ IPTG/X-gal. Las transformantes se seleccionaron por complementación alfa, es decir, las colonias que no presentaron actividad de β-galactosidasa presumiblemente contenían inserto y las azules no. Para verificar la presencia del inserto se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico (miniprep) de acuerdo a un procedimiento modificado de Birnboim (Sambrook y Russell, 2001). Finalmente se confirmó la clonación del inserto mediante la digestión de los plasmidos obtenidos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Xba I*, y subsecuente electroforesis en gel. De las clonas positivas se realizó una maxiprep de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) para obtener el ADN plasmídico en suficiente cantidad para la secuenciación.

Los productos clonados fueron secuenciados por el método de Sanger en la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV, Irapuato, y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST y el método Clustal (MegAlign, DNA Star software, Madison, WI).

III. RESULTADOS

3.1 Diagnóstico de enfermedades en jitomate por la técnica de la PCR

En la región de Arista, que comprende Villa de Arista, Moctezuma, Bocas y Venado, se detectaron por sintomatología en el cultivo del jitomate, tres enfermedades que corresponden al cáncer Bacteriano por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), una fitoplasmosis, y el tizón temprano por *Alternaria solani* (Figura 4). En los tres casos la incidencia fue del 100% y los principales daños fueron provocados en primera instancia por el fitoplasma y la bacteria *Cmm*, las cuales ocasionaron la pérdida del 65% de las 450 ha sembradas en la primera etapa del ciclo de producción. El patrón de distribución inicialmente fue heterogéneo y al final del ciclo fue homogéneo, lo que indica que el mecanismo de dispersión fue aéreo y efectivo, y que las condiciones climáticas prevalecientes fueron propicias para el desarrollo de las enfermedades mencionadas.

En lo referente al cáncer bacteriano, los análisis con la técnica de PCR establecida se pudo detectar a *Cmm* por la amplificación de un fragmento de ADN específico de aproximadamente 645 pb. Los extractos obtenidos de todos los órganos de las plantas enfermas resultaron positivas para el producto de amplificación (Figura 5); de igual forma se obtuvieron amplificaciones de las diversas muestras de semillas procedentes de esta región; para el caso de suelos infestados artificialmente con una densidad de 10^6 y 10^5 ufc y en una muestra de suelo colectada en Villa de Arista también se obtuvieron resultados positivos (Figura 6). Se obtuvo también el producto de PCR característico en todas las muestras de plantas que se colectaron durante el ciclo 2004 (Figura 7).

En el caso de la Fitoplasmosis, ésta no solo se presentó en la región de Arista, también afectó a la zona productora del Huizache del municipio Villa de Guadalupe. En esta región la enfermedad fue devastadora, y causó pérdidas de



A) Cáncer bacteriano: síntomas característicos de tizón marginal y cáncer en las ramas



B) Fitoplasmosis: Amarillamiento del follaje y blastomanía



C) Tizón temprano: Manchas necróticas en ramas y hojas

Figura 4. Enfermedades que afectaron al jitomate en la región de Arista en ciclo de cultivo 2004. A) Cáncer bacteriano por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, B) Fitoplasmosis y C) Tizón temprano por *Alternaria solani*

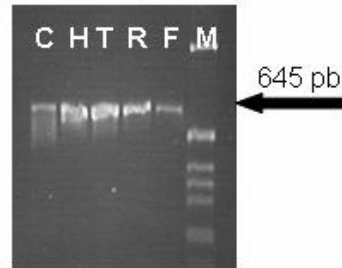


Figura 5. Detección por la técnica de la PCR de la bacteria *C. michiganensis michiganensis* en extractos de diversos tejidos de una planta de jitomate con síntomas de cáncer bacteriano. C) Control IFO-Cmm; H) Hoja; T) Tallo; R) Raíz; F) Fruto; M) Marcador molecular de 1Kb (Bandas de 1Kb a 250 pb).

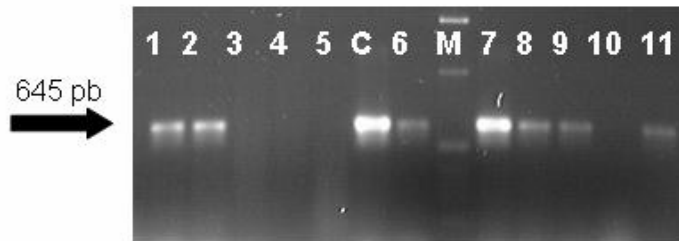


Figura 6. Análisis por PCR de suelos colectados de diferentes parcelas e infestado artificialmente con diferentes concentraciones de *C. michiganensis michiganensis*. 1) 10^6 ufc, 2) 10^5 ufc, 3) Suelo de jardín 4) Suelo del IPICYT, 5) Suelo del Cedral, C) Control IFO Cmm1µg/µl, 6) Suelo Villa de Arista, M) Marcador Molecular de 1Kb. 7) Extracto fruto de jitomate con síntomas de Cáncer bacteriano de Villa de Arista, 8) Extracto de semillas obtenidas del fruto jitomate de Villa de Arista, 9, 10 y 11) Extracto de diferentes semillas de jitomate proporcionadas por productores de Villa de Arista.

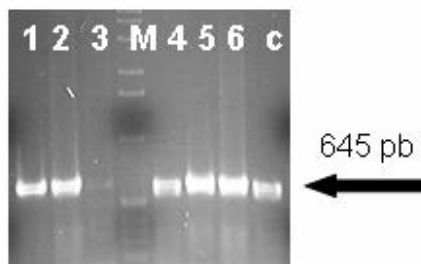


Figura 7. Detección de *C. michiganensis michiganensis* en extractos de raíz de muestras de jitomate con síntomas de Cáncer bacteriano. 1, 2, 3 y 4) Muestras de Villa de Arista; M) Marcador Molecular de 1Kb. 5 y 6) Muestras de Moctezuma, C) Control IFO Cmm (1µg/µl).

de 100% de la producción. Además de observar en las plantas los síntomas típicos que éstos patógenos provocan como el amarillamiento intenso del follaje, formación excesiva de yemas vegetativas (blastomanía), pigmentación rojiza-violácea y el aborto de flores; se constató la presencia de poblaciones altamente densas del psílido *Bactericerca (=Paratrioza) cockerelli*, en todos sus estadios de desarrollo (Figura 8), el cual ha sido identificado como el vector de este patógeno (Garzón-Tiznado, 2002).

Con la técnica de PCR anidado, utilizando los oligos R16mF2/R16mR1 como oligonucleótidos externos y R16F2n/R16R2 como internos, se detectó un fitoplasma tanto en las muestras de la región de Arista como en las del Huizache. En la electroforesis de los productos de PCR directo (Fig. 9A carril 2 y 3) de algunas muestras se pudo observar la amplificación de un producto de PCR de aproximadamente 1400 pb. La amplificación directa es posible al encontrarse cantidades suficientes de ADN del patógeno en la hoja (nervaduras y pecíolos). Cuando la concentración de ADN es muy baja, en ocasiones no es posible observar la amplificación del producto de PCR por lo cual existe la necesidad de realizar una segunda amplificación con iniciadores que tienen su sitio complementario dentro del primer producto de PCR (PCR anidada). Con la PCR anidada el tamaño de los productos es aproximadamente de 1250 pb. En la Figura 9A, se observa para la muestra del carril 1 la banda obtenida en la primera reacción (1400 pb banda tenue) y el producto de la PCR anidada (1250 pb). Algunas muestras (2 y 3) amplifican con el primer par de oligos (PCR directo) y dan un barrido con el segundo, o bien algunas presentan bandas inespecíficas (4 y 5) con la PCR directa y en el anidado amplifican específicamente. En otras (6) se observa un barrido con la PCR directa y una amplificación específica después de diluir el producto de PCR.

La etiología fitoplásmica para algunas muestras de jitomate colectadas en el Huizache y en la región de Arista, fueron confirmadas por la Dra. Norma Elena Leyva López del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, IPN. Unidad Sinaloa, quien obtuvo por PCR los productos esperados para

la enfermedad diagnosticada (Figura 10). Los iniciadores empleados en este trabajo han sido ampliamente utilizados por Leyva-López y col. (2002) para diagnosticar la



Figura 8. Estadios del psílido relacionado con la fitoplasmosis. **A)** Adulto del psílido *Bactericerca* (=Paratrioza) *cockerelli* y **B)** estadios ninfales en muestras colectadas en el Huizache, Villa de Guadalupe

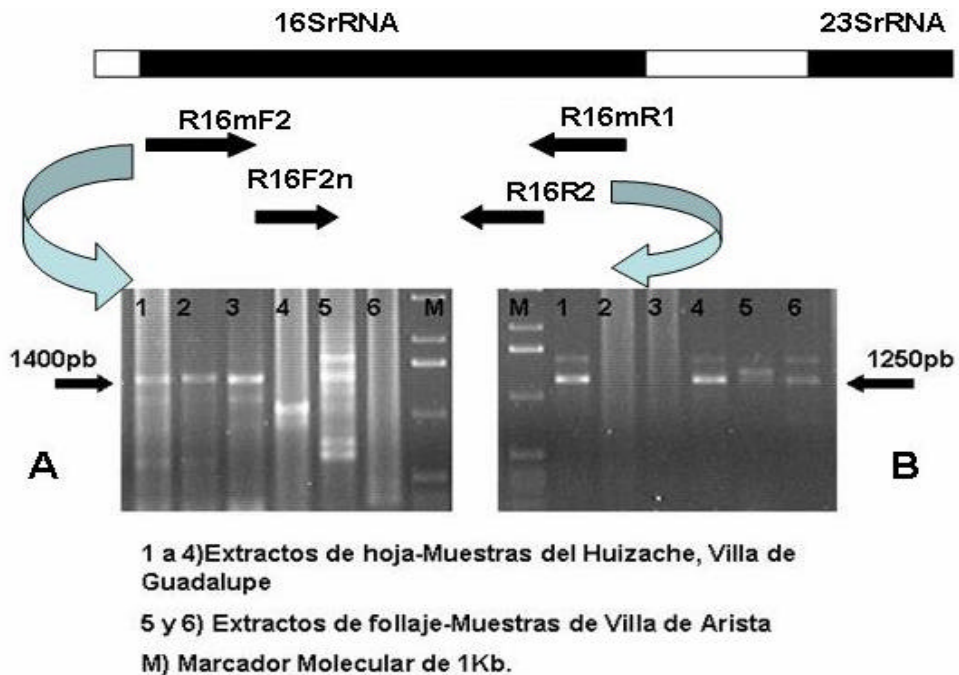


Figura 9. Detección de fitoplasmas en extractos de jitomate con síntomas característicos, por PCR convencional y anidada. **A)** Primera reacción con los oligos universales R16mF2/R16mR1, para extractos de hoja-muestras del Huizache y Villa de Guadalupe; **B)** PCR anidada con los oligos R16F2n/R16R2 de las muestras de la primera reacción mostradas en el panel A.

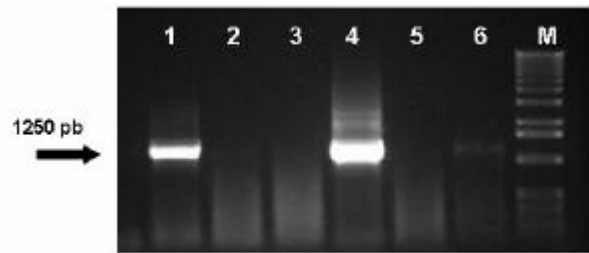


Figura 10. Productos de la segunda reacción del PCR anidado específico para fitoplasmas con los oligos R16mF2/R16mR1 y R16F2n/R16R2. Extractos de muestras de jitomate de: 1) Huizache, 2) Cedral, 3) Vanegas, 4) Control Positivo clona de *Vinca rosea*, 5) Control negativo, 6) Región de Arista (Resultados de la Dra. Norma Leyva-López).

presencia de fitoplasmas en papa. De modo similar, se constató la ausencia de este patógeno en cultivos de Cedral y Vanegas por los resultados negativos en muestras procedentes de esas localidades (Fig. 10).

En el caso de Cedral y Vanegas la situación fue diferente y la única enfermedad que se diagnosticó fue el tizón temprano causado por *Alternaria solani*, para esto se tomó en cuenta la sintomatología característica como es la presencia de manchas conformadas por anillos concéntricos de color café claro con bordes oscuros. En estas localidades la severidad fue menor debido a que los tallos, ramas y frutos no fueron afectados. Se corroboró la etiología por la observación al microscopio (en cortes manuales de tejido de hojas), de las conidias obclaviformes, oscuras, con septos transversales y longitudinales; así como por el tamaño de la banda de ADN, aproximadamente de 600 pb obtenido por PCR con los oligos ITS1/ITS4 (Fig. 11). La incidencia fue del 10% y el patrón de distribución heterogéneo.

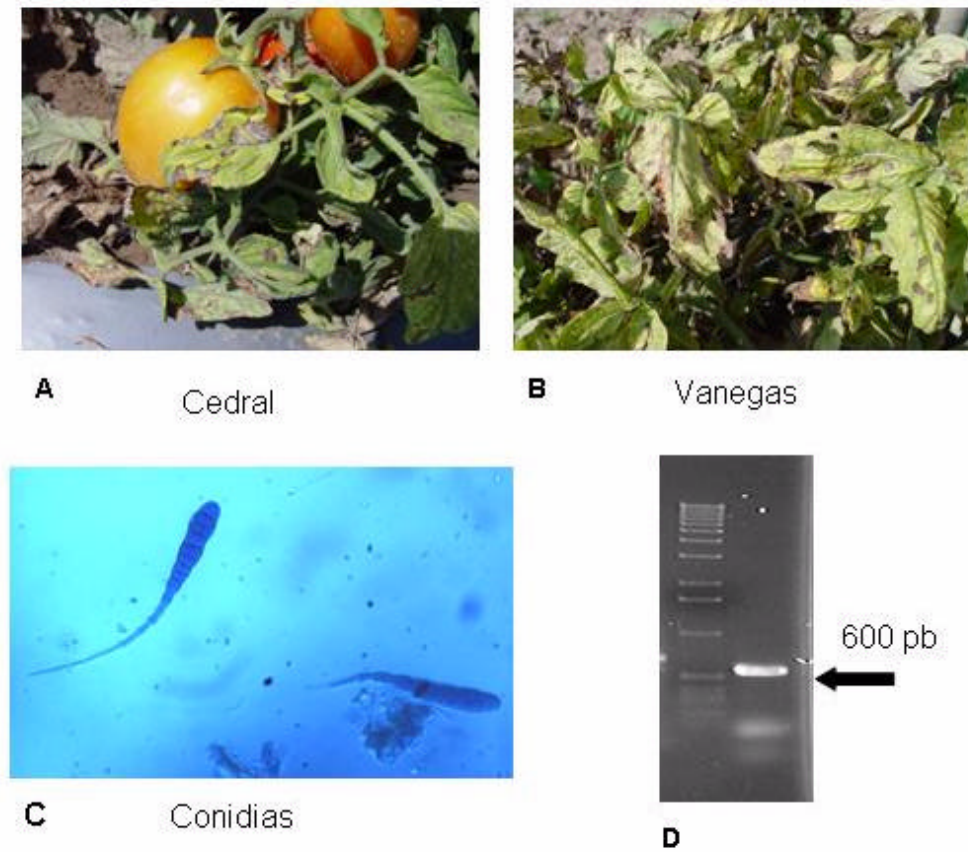


Figura 11. Diagnóstico de Tizón temprano. **A y B)** Manchas necróticas, foliares y en fruto características del Tizón temprano del jitomate presente en dos localidades del Altiplano Potosino; **C)** Conidias oblongas septadas de *Alternaria solani* en cortes directos de las manchas foliares de las muestras colectadas; **D)** Producto de amplificación por PCR obtenida con los oligos ITS1-ITS4, a partir de extracto de hoja.

3.2. Diagnóstico de enfermedades en Chile por PCR

En general, en el cultivo de Chile, en las regiones de Arica, (el Cedral, Villa de Guadalupe y Vanegas), predominó el marchitamiento causado por hongos. En la mayoría de los predios la enfermedad se presentó principalmente con un patrón localizado debido a que esa zona del campo de cultivo se caracteriza por una alta humedad en el suelo, no obstante, en otros sitios la distribución fue localizada como manchones dispersos en el campo.

Los síntomas observados fueron amarillamiento, marchites, defoliación, caída de flores y en algunos casos frutos momificados. La incidencia encontrada varió entre un 5 y un 10%. En todas las muestras analizadas por PCR, se detectó la presencia del hongo *Rhizoctonia solani* por la presencia del producto de PCR esperado de aproximado 700 pb (Figura 12). En una localidad de Villa de Arica se identificó a *Phytophthora capsici*, cuyos síntomas característicos son un necrosamiento muy marcado de los tejidos externos e internos del tallo y raíz. En los frutos se encontraron manchas acuosas hundidas, momificación de los mismos y crecimiento interno y externo del hongo. Al microscopio se observó la presencia de oosporas esféricas de pared gruesa y lisa, además, al realizar la reacción de PCR se observó un producto de PCR de 900 pb, aproximadamente (Figura 13).

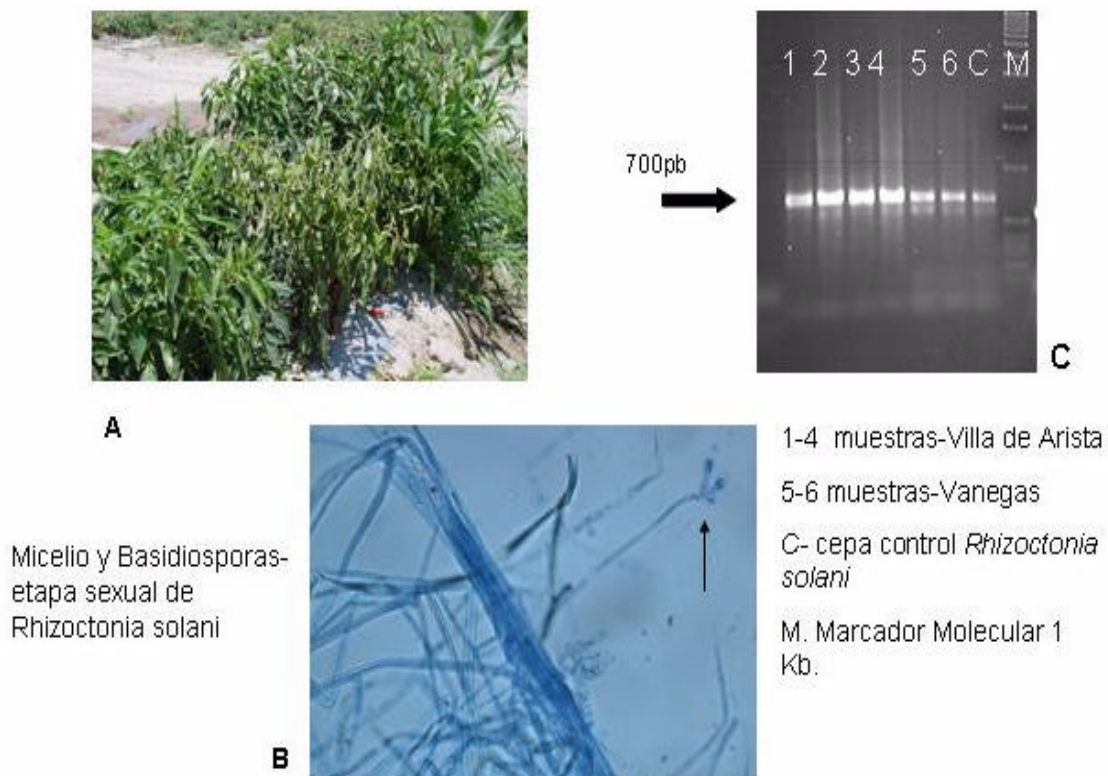


Figura 12. Diagnóstico de la Marchitez por *Rhizoctonia solani*. A) Clorosis y marchitez causada B) Morfología microscópica de la etapa sexual de *R. solani* (*Thanatephorus cucumeris*), C) Productos de PCR de 700pb, obtenidos con los oligos ITS1-ITS4 a partir de extractos de raíz de chiles con marchitez.

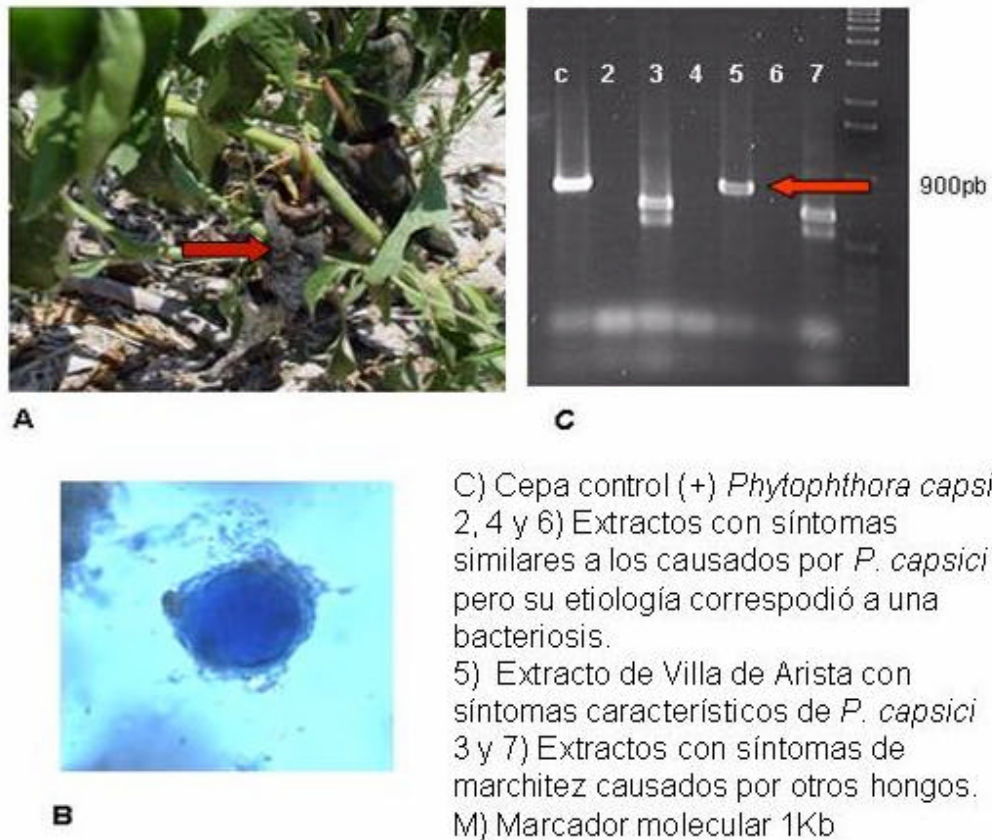


Figura 13. Diagnóstico de la Marchitez por *Phytophthora capsici* **A)** Frutos momificados de chile-daño ocasionado por *P. capsici*, **B)** Morfología microscópica de la estructura de resistencia de *P. capsici*-Oospora **C)** Extractos de chile con marchitez, analizados con los oligos ITS1-ITS4 para detección de *P. capsici* Solamente en la muestra de Villa de Arista se obtuvo la banda de 900 pb, de tamaño similar al control.

En Cedral y Vanegas se encontraron plantas con un marchitamiento originado por el complejo de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* Estos hongos se identificaron por PCR en extractos de raíz, los productos obtenidos fueron de 700 pb y 600 pb. Se constató que estas bandas correspondían a los géneros respectivos al inducir su desarrollo en las raíces de las plantas enfermas y hacer cortes de tejido y observar la morfología al microscopio. *Rhizoctonia* se caracteriza por presentar un micelio de color oscuro septado, con las ramificaciones inclinadas en un ángulo de 45° de la dirección de crecimiento de la hifa madre y siempre presenta una constricción en su punto de origen; en tanto que *Fusarium* se reconoce por las macroconidias que comúnmente se forman en la superficie de las plantas muertas (Figura 14).

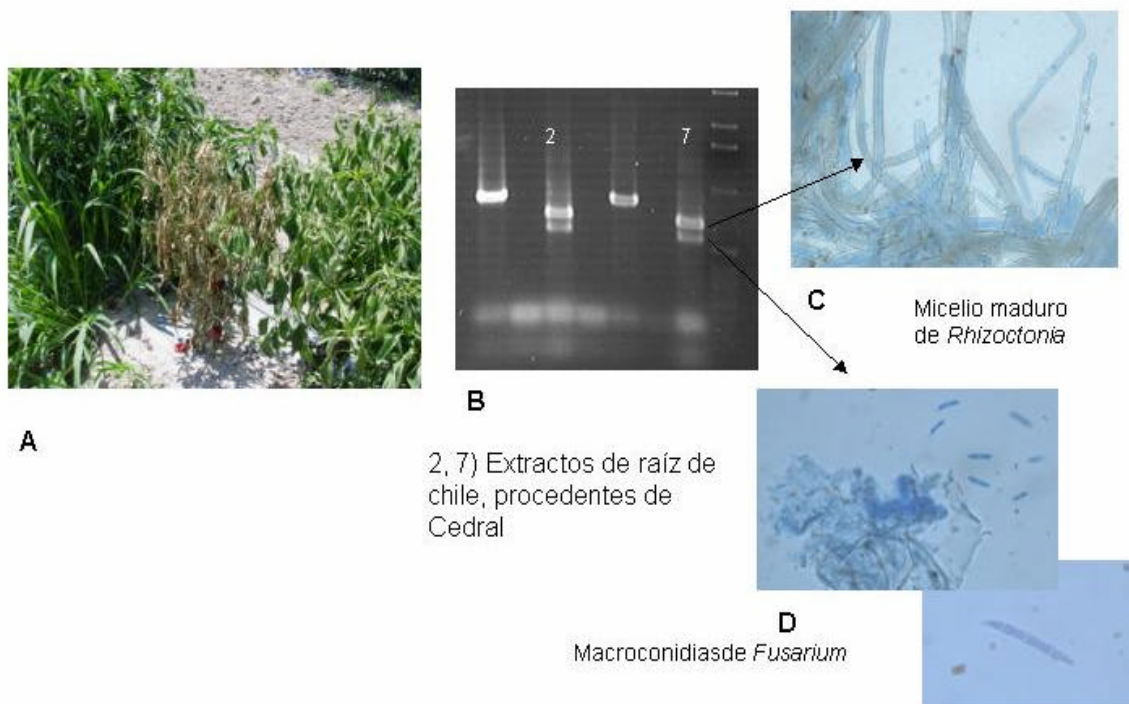


Figura 14. Marchitez del chile por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* **A)** Sintomatología **B)** amplificación conjunta del ADN de 700 y 600 pb, con los oligos ITS1-ITS4 a partir de extractos de raíz, **C)** Micelio característicos de la etapa asexual de *R. solani*, **D)** Micelio y macroconidias típicas de *Fusarium*.

3.3. Identificación de hongos por clonación y secuenciación

Se clonaron y se secuenciaron tres productos de PCR obtenidos con los oligos ITS1-ITS4 de extractos de chile y jitomate. El análisis de las secuencias obtenidas (Cuadro 7) de los fragmentos clonados, reveló que en los marchitamientos que afectan al chile, efectivamente están involucrados los hongos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, y en el caso del jitomate una de las clonas (Jit 20) correspondió a *Alternaria arborescens*, el producto de PCR se obtuvo de un extracto de raíz de plantas con una enfermedad que se presentó en el ciclo 2003, con una incidencia hasta del 50%, y que se caracterizó por síntomas de marchitamiento, cáncer y pudrición basal de color casi negro en el tallo (Fig 15 A) (Simmons, 1999).

La secuencia de la clona Jit 20-a, tiene una similitud de 99.78% con *Alternaria arborescens* (GenBank No. Acceso AY154706). La clona Jit-10a, resultó también ser *Alternaria arborescens* pero sólo el fragmento hasta 365 pb, el resto tiene similitud con el ADN ribosomal del jitomate. La clona 28 a resultó ser también el rDNA del jitomate (secuencia no mostrada) por lo que dedujimos que los oligos ITS1/ITS4 pueden amplificar el rADN vegetal bajo ciertas condiciones. La relación filogenética entre las diferentes especies de *Alternaria* así como con *P. capsici* y *R. solani* se puede observar en la Figura 15 B.

La secuencia de la clona Ch 16- a por un análisis de Blast, fue similar a *P. capsici* Australia (Gen Bank no. acc AF266787); y a un aislamiento de *P. capsici* de Tlacotepec, Puebla (Gen Bank no. acc AY726623), con 98.7% y 95.3% respectivamente. El árbol filogenético de comparación de la secuencia obtenida con tres aislamientos de *P. capsici* y con otras especies de *Phytophthora* se muestra en la Figura 16.

La secuencia de la clona Ch 27-a analizada por Blast, indicó que ésta tiene una alta similitud con las secuencias depositadas en el Gen Bank de algunos

aislamientos de *Thanatephorus cucumeris*, que corresponde a la etapa sexual (teleomorfa) de *Rhizoctonia solani*. El % de similitud con *T. cucumeris* de Brasil fue de 97.0, y se puede observar en el árbol filogenético su relación con otros aislamientos de *T. cucumeris* (Fig. 17), con alto grado de similitud.

Cuadro 7. Secuencias del ADN amplificado con los oligos ITS1-ITS4 de los hongos fotopatógenos y el resultado del análisis tipo Blast de las secuencias obtenidas.

CLONA: Ch16a, pR, pBS-SK, CD, 03 DE JUNIO DEL 2004			
SITIO: Xbal, TCTAGA, POSICION: 1-6			
<p>TCTAGATCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAATTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTT GGGGGTCTTGTACCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCCGGGCGAGTAGCTTTTTGTTTTAAACCCATTTACAATTC TGATTACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATG AAGAACGCTGCGGACTGCGATACGTAATGCGAATTGCGAGATTGAGTGCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCG GGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTCCTCCGTGTAGTCCGGTGGAGGATGTG CCAGATATGAAGTGTCTTGCCTGTTGTCTTCCGGTCCGGTCCGAGTCTTTTAAATGTAAGTGAACCTGACTTCTCTTTGCTC GAAAGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCCGGCAGCCGGTTTGTCTGCTGCGGGCTTTAAAGGA GGAGTGTTCGATTGCGGGTATGTTGGCTTCCGGTGAACAGGCGCTTATTGAATGCTTTTCTGCTGTGGCGTATGGGCTG GTGAACCGTAGCTGTGTTGGCTTGGCTTTGAATCGGCTTGTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCCGGCTGTCGAGGGT CGA</p>			
Sequences producing significant alignments: (Bits) Value N			
qi 62147397 emb AJ854285.1 	Phytophthora capsici 18S rRNA gen...	<u>554</u>	3e-155 -1
qi 62147396 emb AJ854284.1 	Phytophthora capsici 18S rRNA gen...	<u>554</u>	3e-155 -1
qi 38707329 emb AJ555612.1 PCA555612	Phytophthora capsici par...	<u>554</u>	3e-155 -1
qi 62147398 emb AJ854286.1 	Phytophthora capsici 18S rRNA gen...	<u>551</u>	1e-154 -1
qi 62147399 emb AJ854287.1 	Phytophthora capsici 18S rRNA gen...	<u>546</u>	6e-153 -1
qi 13160061 emb AJ299733.1 PTR299733	Phytophthora tropicalis ...	<u>533</u>	3e-149 -1
qi 51814037 qb AY726623.1 	Phytophthora capsici 18S ribosomal...	<u>533</u>	4e-149 -1
CLONA: Ch27a, pR, pBS-SK, CD, 03 DE JUNIO DEL 2004			
SITIO: Xbal, TCTAGA, POSICION: 1-6			
SITIO FINAL: EcoRI, GAATTC, POSICION: 644-649			
<p>TCTAGATCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAATGTAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCCCTAATTAACCTGG GGGCATGTGCACACCTTTCTCTTTTCATCCCATACACCTGTGCACCTGTGAGACAGATGTTTTCTAGAGGGGAAGGAACCTT ATTGGACCTACTCTTCTTGGACTCTGTCTACTTAATCTATATAAACTCAATTTATTTTAAATGAATGTAATGGATGTAACACATC TAATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GAATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGTGCCGCCGAAGCGGA CTTGTGGGGGGTTTAGAGGCAGGACGCCGAGGACTCCCAATGCGAGGCGAATGCTACTGCGCAAAGGAGAGGGCCCTTCG GGTCCGCCACTGGTTTTAGGGGCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGCCACAGGGGCTCGAGGGTTGAAACGACGCT CGGACAGGCATGCCTCCAGGATACTGGAAGGCGCCATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTC</p>			
Sequences producing significant alignments: (Bits) Value N			
qi 51872666 qb AY684924.1 	Thanatephorus cucumeris strain Rol...	<u>256</u>	7e-66 -1
qi 47934216 qb AY615882.1 	Uncultured ascomycete clone 7.5 in...	<u>253</u>	9e-65 -1
qi 21702251 emb AJ492873.1 PCU492873	Plectosphaerella cucumer...	<u>251</u>	2e-64 -1
qi 66096656 qb DQ021450.1 	Thanatephorus cucumeris isolate Rh...	<u>249</u>	8e-64 -1
qi 47934214 qb AY615880.1 	Uncultured Hypocreales clone 5.1 i...	<u>249</u>	8e-64 -1
qi 52182437 qb AY726622.2 	Thanatephorus cucumeris 18S riboso...	<u>244</u>	3e-62 -1
qi 30266093 qb AY152703.1 	Thanatephorus cucumeris isolate TO...	<u>236</u>	1e-59 -1
qi 30266092 qb AY152702.1 	Thanatephorus cucumeris isolate TO...	<u>236</u>	1e-59 -1
qi 33641500 qb AY270001.1 	Thanatephorus cucumeris isolate SJ...	<u>234</u>	3e -1

Continuación Cuadro 7. Secuencias del ADN amplificado con los oligos ITS1-ITS4 de los hongos fotopatógenos y el resultado del análisis tipo Blast de las secuencias obtenidas.

CLONA: Jit10a, pU, pBS-SK, CD, 03 DE JUNIO DEL 2004
 SITIO: EcoRI, GAATTC, POSICION: 1-6

GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTA
 CCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
 GTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA TTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGAT
 CAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGGTA
 ATCCCGCCTGACCTGGGGTCCGGTCCGGAGCGCCTGGTGAGGCGCGGTGAGGGTCCGGGAGTCCGGACGCGCGACGGGCT
 GTAGCCGCGACAACAAGAGAGAGTTGAGTTTCAACCACCACCTTCCGCGACGTCCTCGTCCGACTCGCATTTAGGCCGG
 CCGCGCGCTCGGGGCGCACGGGAGGCCAGCTTCCGCCCCGCGCTAAAGCCTTGGCGGCTGCGAGGGGGCGACGCGATGC
 GTGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCAATGGCTTCCGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCGATGGTACGCGGGATTCT
 GCMAWTCACACCAAGTATCGCATTTGCTACGTTCTTATCGATGCGAGAGCCGAGATA

Sequences producing significant alignments:	Score	E (Bits)	Value	N
gi 45385106 gb AY552528.1 Lycopersicon esculentum 18S riboso...	<u>327</u>		5e-87	-1
gi 19153 emb X52265.1 LE17S25S Tomato 17S-25S ribosomal DNA spac	<u>212</u>		2e-79	2
gi 11182339 emb AJ300201.1 LES300201 Lycopersicon esculentum ...	<u>292</u>		1e-76	-1
gi 7533167 gb AF244747.1 Lycopersicon esculentum internal tr...	<u>282</u>		1e-73	-1
gi 11182344 emb AJ300208.1 LPE300208 Lycopersicon peruvianum ...	<u>270</u>		6e-70	-1
gi 11191820 emb AJ300202.1 LCH300202 Lycopersicon cheesmanii ...	<u>269</u>		1e-69	-1
gi 11140028 emb AJ300196.1 LPI300196 Lycopersicon pimpinellif...	<u>252</u>		2e-69	2
gi 11322494 emb AJ300206.1 LCH300206 Lycopersicon chmielewski...	<u>146</u>		6e-62	2
gi 11182338 emb AJ300200.1 LES300200 Lycopersicon esculentum ...	<u>242</u>		2e-61	-1
gi 24528214 emb AJ492429.1 NMI492429 Nicotiana miersii 5.8S r...	<u>137</u>		3e-44	5

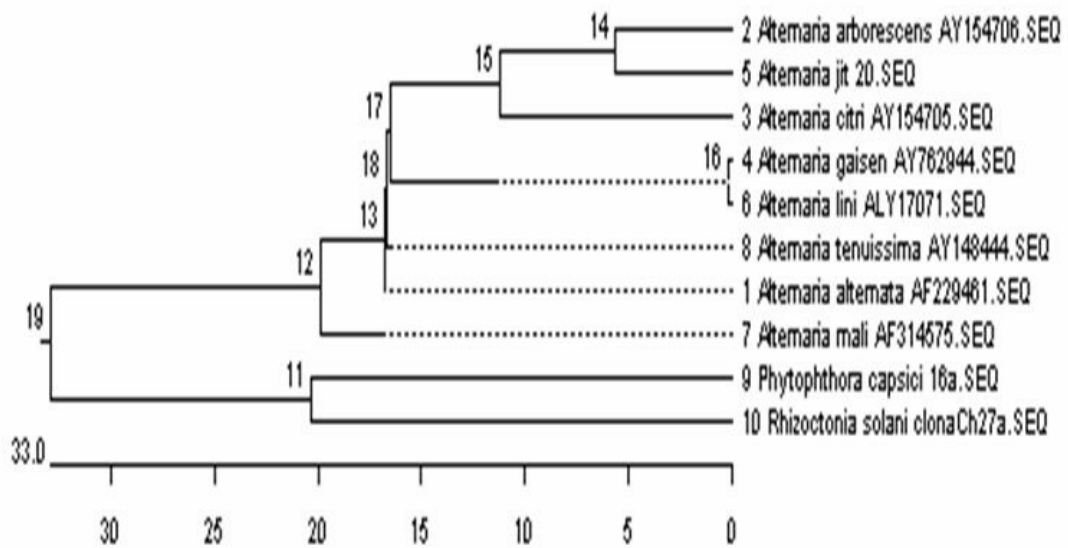
CLONA: Jit20a, pU, pBS-SK, CD, 03 DE JUNIO DEL 2004
 SITIO: EcoRI, GAATTC, POSICION: 1-6
 SITIO FINAL: EcoRI, GAATTC, POSICION: 297-302

GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTCGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTA
 CCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
 GTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGAT
 CAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATTC

Sequences producing significant alignments:	Score	E (Bits)	Value	N
gi 54300523 gb AY762944.1 Alternaria gaisen strain EGS90-051...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394884 gb AY154706.1 Alternaria arborescens 18S ribosom...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394883 gb AY154705.1 Alternaria citri 18S ribosomal RNA...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394877 gb AY154699.1 Alternaria sp. IA249 18S ribosomal...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394876 gb AY154698.1 Alternaria sp. IA248 18S ribosomal...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394872 gb AY154694.1 Alternaria sp. IA244 18S ribosomal...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 32394860 gb AY154682.1 Alternaria alternata 18S ribosomal...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 15209133 gb AF314581.1 AF314581 Alternaria gaisen strain A...	<u>233</u>		2e-59	-1
gi 54111961 gb AY751455.1 Alternaria tenuissima strain EGS34...	<u>188</u>		1e-58	2
gi 54111962 gb AY751456.1 Alternaria alternata strain EGS34-...	<u>188</u>		2e-58	2



A Lesión cancerosa de color oscuro en la parte basal del tallo



B

Figura 15. Sintomatología del Cáncer del tallo y relación filogenética de las cepas de *Alternaria* **A)** Cáncer del tallo por *Alternaria arborescens*. **B)** Relación filogenética de las cepa de *Alternaria* del jitomate, detectadas en la región de Arista, SLP con diferentes especies de *Alternaria*.

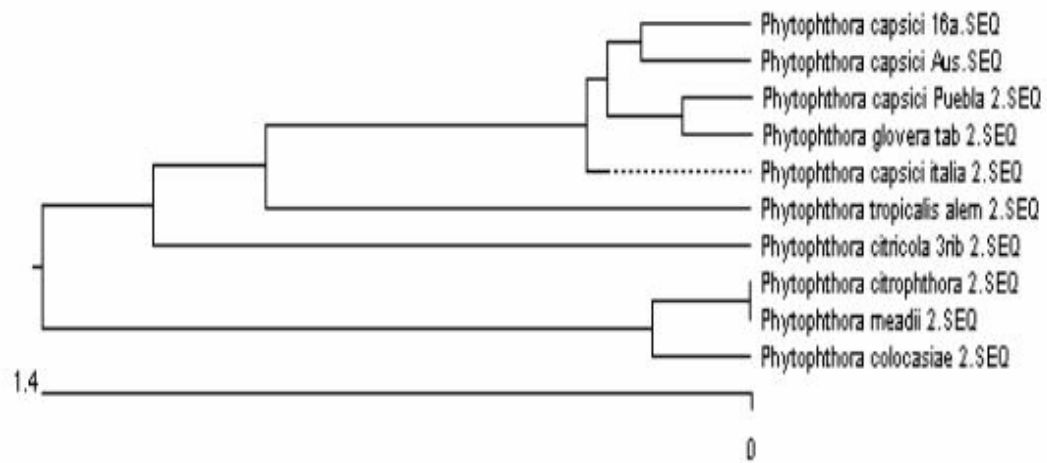


Figura 16. Relación filogenética de *Phytophthora capsici* de la muestra de Chile de Villa de Arista, con otros aislamientos de *P. capsici* y otras especies de *Phytophthora*

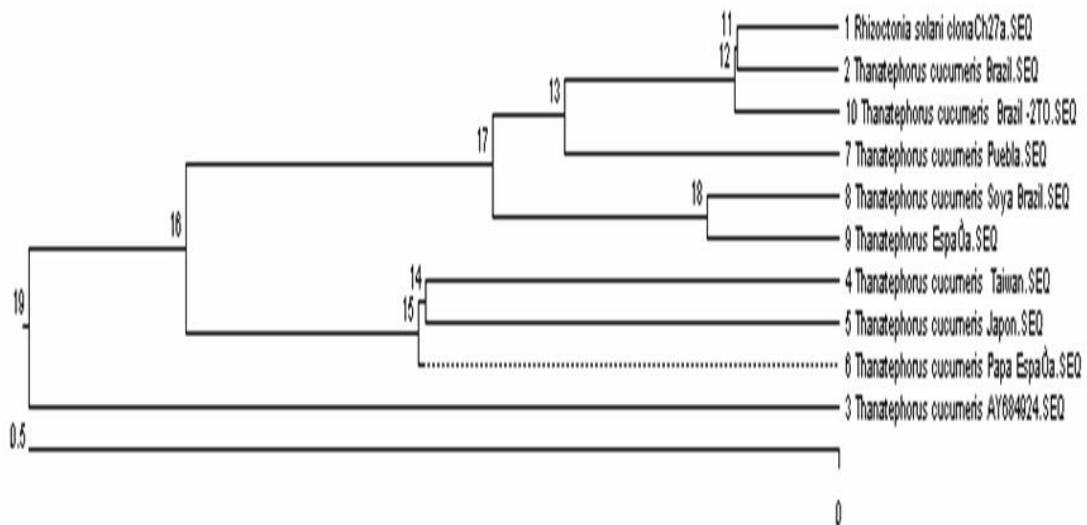


Figura 17. Relación filogenética del aislamiento de *Rhizoctonia solani* de la muestra de Chile del Altiplano Potosino (*R. solani* 27a) con diferentes aislamientos de *Thanatephorus cucumeris*.

IV. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se corroboró que en el Altiplano Potosino inciden diversos problemas fitosanitarios en los cultivos de jitomate y chile, los cuales dependen, en buena medida, de las condiciones climáticas que prevalezcan durante el ciclo de cultivo. La superficie de esta región que está en riesgo de ser afectada por las enfermedades epidémicas es aproximadamente de 2500 ha. Para el ciclo 2005 se tiene prevista la siembra de aproximadamente 1700 ha con jitomate, que es una superficie mucho menor que la sembrada en el ciclo 2000. La reducción del área cultivada se debe al impacto que tuvieron las enfermedades de este cultivo en los ciclos anteriores, lo que también ha inducido a los productores a sembrar ahora un mayor número de hectáreas con chile, el cual es menos susceptible que el tomate a las enfermedades (comunicación personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal-Zona Altiplano de San Luis Potosí).

Durante el ciclo 2004 los problemas fitosanitarios generados por el cáncer bacteriano, el tizón temprano y fitoplasmas, provocaron pérdidas globales del 65%, y en algunos predios hasta del 95%, en la producción de jitomate. Esta situación no es privativa del estado de San Luis Potosí, ya que en otras regiones productoras de hortalizas como las del estado de Guanajuato, la superficie dañada por problemas fitosanitarios actualmente oscila entre un 40 % y un 50 % de la superficie sembrada. Los problemas son diversos, desde los causados por hongos y bacterias, hasta los originados por virus y fitoplasmas (Comisión Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A. C.; www.cesavegorg/scv.html).

4.1. Cáncer bacteriano

En la región de Arista se observaron en los campos de cultivo de jitomate síntomas característicos, indicadores tanto de infecciones locales (tizones marginales y manchas en los folíolos), como de infecciones sistémicas (cáncer en las ramas y tallo, y marchitez) por *Cmm*, lo que define el comportamiento

epidémico del cáncer bacteriano en la región. También se logró detectar a la bacteria por PCR en el suelo de cultivo de esta localidad y en semillas que los productores utilizaron durante el ciclo 2003. Esta situación es alarmante debido a que la bacteria se transmite por semilla y plántulas y sobrevive en el suelo por dos a tres años, por lo cual se considera una fuente de inóculo importante.

El cáncer bacteriano es una enfermedad muy destructiva que en condiciones climáticas favorables causa pérdidas económicas hasta del 80%. Es uno de los principales problemas fitosanitarios en todas las regiones productoras de jitomate del mundo, debido a que no se cuenta todavía con variedades resistentes ni métodos de manejo efectivos. El manejo de la enfermedad está enfocado principalmente a evitar la introducción del patógeno a los campos de cultivo y asegurar la producción de plántulas sanas en los invernaderos (de acuerdo al Ing. Juan José Cortéz, de la empresa Certiz, se necesitó de un plan con diversas medidas aplicadas a lo largo de dos años para erradicar problemas por *Cmm* en sus invernaderos). Boudyach y col. (2001) identificaron cepas bacterianas antagonistas de *Cmm* y la mayoría de éstas redujeron la infección cuando se aplicaron como tratamiento a semilla y a la raíz de las plántulas antes del trasplante. En 2002, *Cmm* se aisló de lotes de semillas de jitomate producidos comercialmente en Java, Indonesia (Anwar y col., 2004). Durante el ciclo 2003, en el sistema de producción de jitomate en invernadero, se detectó por primera vez a *Cmm* en la región Mediterránea de Turquía causando pérdidas hasta del 65% (Basim y col., 2004). Para evitar el surgimiento de epidemias por *Cmm* a nivel mundial, existen normas internacionales de regulación cuarentenaria, las cuales restringen la importación y exportación a tolerancia cero para Canadá, Estados Unidos de América y la Unión Europea (Bach y col., 2003). En relación con esto, hay dos aspectos de suma importancia que deben de abordarse: uno es la certificación de las semillas y las plántulas, ya que a través de experimentos de campo se determinó que una proporción tan pequeña como el 0.01% de transmisión de la bacteria por semilla puede originar una severa epidemia. Por ejemplo, una semilla infestada en 10,000 podría dar como resultado 100 ± 25 focos de

infección en una siembra directa, lo que después se traduciría en miles de plantas con infección sistémica latente. Por otro lado los residuos de cosecha infectados que permanecen en el suelo, pueden iniciar epidemias en los subsecuentes ciclos de cultivo (Gitaitis y col., 1991). En Iowa se produjeron pérdidas económicas hasta del 27% por una epidemia originada a partir de residuos de cosecha (Gleason y col., 1991). En la región de Arista, SLP, varios productores no tienen la práctica de eliminar los residuos vegetales enfermos, lo que nos podría explicar el incremento en la propagación y presencia de *Cmm* en esta región. Esto pone de manifiesto la importancia de contar con técnicas de diagnóstico que evalúen la calidad fitosanitaria de las semillas y plántulas, que sean una herramienta para la valoración de los métodos que se utilicen para el saneamiento de los suelos infestados, como los de la región de Arista, SLP, los de la costa Mediterránea de Turquía, y en áreas productoras de Palestina (Tokgonul y Cinar, 2003; Sansour y col., 2003)

Normalmente *Cmm* se identifica por aislamiento de la bacteria en medios semiselectivos, pruebas de patogenicidad en la planta hospedera, reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa*, además de FAME (fatty acid methyl ester), y técnicas de inmunodiagnóstico como microscopía de inmunofluorescencia y ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Estas técnicas consumen mucho tiempo y son inadecuadas para evaluar la fitosanidad de la semilla y de las plántulas a gran escala (Dreier y col., 1995). Además de que pueden dar falsos negativos al inicio de la infección por su baja sensibilidad.

Durante el desarrollo de este trabajo se montó una técnica basada en la PCR, con la cual pudimos detectar a *Cmm* en todos los tejidos de la planta, en semilla, en suelos infestados natural y artificialmente, sin aislamiento previo ni enriquecimiento del patógeno en los tejidos de la planta. Los iniciadores que utilizamos fueron el CM3 y CM4 desarrollados en el Instituto de Biotecnología de Lyngby, Dinamarca, los cuales amplifican selectivamente una región única del ADN de *Cmm*, y fueron evaluados rigurosamente en investigaciones realizadas por Alvarez y Kaneshiro (1999), quienes encontraron que tienen un mayor grado de confiabilidad que otros iniciadores como CM5 y CM6 (Dreier y

col., 1994), para detectar tanto cepas virulentas, hipovirulentas, como avirulentas. Independientemente del tipo de cepa que se detecte, la presencia de *Cmm* resulta ser un problema potencial grave, debido a que los factores de patogenicidad pueden ser transferidos de una cepa virulenta a una hipovirulenta o avirulenta y desencadenar posteriormente una epidemia (Kaneshiro y Alvarez, 2003).

En cuanto a la sensibilidad para la detección de la enfermedad, nuestros resultados son acordes con lo señalado por Alvarez y Kaneshiro (1999), así como con los de Dreier y col. (1995), en relación a que los límites de detección por PCR son de 10^3 a 10^4 ufc/ml en extractos de semilla y de tejidos vegetales infectados artificialmente, y nuestro límite fue de 10^5 ufc/m, lo cual es aceptable, considerando que nosotros detectamos a *Cmm* en extractos de una matriz compleja como el suelo y que muchas bacterias pueden quedar adsorbidas en los coloides del suelo. Sin embargo, la sensibilidad de nuestro procedimiento difiere significativamente de la reportada por Sousa-Santos y col. (1997), que lograron amplificar el ADN obtenido de semillas infestadas artificialmente en la gama de 4×10^8 hasta 4×10^1 células ml^{-1} . Los métodos no son directamente comparables ya que el procedimiento de infestación artificial y de extracción de ADN usado por estos investigadores difieren mucho de los que nosotros utilizamos. En primera instancia ellos utilizaron un método altamente artificial de "infestación" en el que preparan primero los extractos de las semillas y posteriormente adicionan la suspensión de bacterias que contiene 2.5% de PVP. Se obtiene la pastilla bacteriana por centrifugación y ésta se resuspende en 150 μl de NaOH al 0.05 M, calentando luego la suspensión a ebullición por 10 min. Obviamente de esta manera las bacterias no se adhieren a ningún componente del tejido vegetal y probablemente con este método la lisis bacteriana sea más efectiva, lo cual se refleja en la mayor sensibilidad. Sin embargo, en investigaciones referentes a la detección de bacterias en suelo como la de Yung-An y Chi-Chung (2000) para *Ralstonia solanacearum*, los resultados son similares a los nuestros ya que amplificaron el ADN en

suspensiones bacterianas de 10^4 a 10^6 ufc/ml, y en suelo infestados artificialmente con el mismo tipo de suspensiones, la detección fue en el rango de 10^5 y 10^6 ufc/ml. También es importante mencionar que con esta técnica se detectó a *Cmm* en muestras de jitomate que resultaron negativas por la técnica de ELISA (resultados no mostrados), que pone de relieve la mayor sensibilidad de los métodos moleculares.

En otro aspecto, la modificación del método de extracción de ADN de Vázquez-Marrufo y col. (2002) que se utilizó para la detección de *Cmm* en suelo, dio buenos resultados con suelos de la región que tienen las propiedades características de los terrenos de zonas semiáridas. Vázquez-Marrufo y col. (2002) utilizaron su método para la extracción de ADN de hongos a partir de suelo forestal. El punto fundamental es el uso del cloruro de bencilo (BC) en la primera etapa del protocolo, que actúa promoviendo la lisis celular y extrayendo los ácidos húmicos y otros contaminantes orgánicos que pueden inhibir la PCR. BC interactúa con los radicales hidroxilos de los carbohidratos de las paredes celulares de hongos, bacteria y plantas, razón por la cual también se utiliza para la extracción de ADN de hongos con alto contenido de polisacáridos.

La técnica mostró ser altamente consistente, produciendo resultados positivos en todas las muestras provenientes de plantas con síntomas característicos de cáncer bacteriano. No obstante su baja sensibilidad comparada con la técnica de PCR-Taq Man tiempo real (Bach y col., 2003), que es también mucho más costosa, la técnica modificada que hemos establecido se puede utilizar como herramienta rutinaria para el diagnóstico de cáncer bacteriano.

4.2. Fitoplasmosis

Otra enfermedad del jitomate que se diagnosticó por sintomatología y PCR anidado en la región de Arista y el Huizache, fue de etiología fitoplásmica. La técnica de PCR anidado y los oligos universales externos R16MF2/R16MR1 e internos R16F2N/R16R2 que utilizamos, probablemente han sido los más

ampliamente usados para la detección de fitoplasmas en diversos cultivos y en diferentes regiones geográficas (Bertaccini y col., 1996; Lee y col., 1997; Martini y col., 1999; Waterworth y Mock, 1999; Stanilius y col., 2000; Leyva-López y col., 2002). Resultados análogos a los que nosotros obtuvimos, en relación a que algunas muestras producen con el primer par de oligos (PCR directo) una banda de 1400 pb, y otras en cambio dan un barrido o bien presentan bandas inespecíficas, han sido obtenidos por los investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical, al detectar e identificar a un fitoplasma que afecta a la yuca en Colombia (CIAT, 2002), y por Saumatally y col.(s/f) del Instituto de Investigaciones de la Industria del Azúcar, en Mauritania, quienes identificaron un fitoplasma que causa severas pérdidas en el cultivo de la caña de azúcar. Leyva-López (comunicación personal) señala que se pueden presentar amplificaciones inespecíficas por temperaturas de alineamiento menores a los 55°C y que si esto sucede es conveniente incrementarlas a un máximo de 60-65°C. En el cultivo del jitomate solamente se han identificado dos enfermedades causadas por fitoplasmas, una es la “yema grande” o “Big bud” (Schneider y col., 1999) y la otra el amarillamiento del *Aster-Aster Yellow*. Estos patógenos son miembros del grupo Aster Yellow y tienen una extensa gama de hospederos que incluyen al chile, soya, zanahoria, etc (Jones y col., 1993). Los síntomas de estas enfermedades son muy similares a los observados en las regiones de Villa de Arista y El Huizache, sin embargo, los insectos transmisores (*Circulifer tenellus* y *Macrostelus fascifrons*) no estaban presentes, por lo que se puede inferir que se trata de un fitoplasma diferente. En contraste, en estas regiones se observaron grandes poblaciones de un insecto cuyas características corresponden a la del psílido de la papa y el tomate *Bactericerca* (= *Paratrioza*) *cockerelli* (Sulc.) (Homoptera: Psyllidae) (Liu y Trumble, 2004). La mayoría de los investigadores coinciden en señalar que las ninfas, pero no los adultos, de este insecto inyectan una toxina cuando se alimentan de la hoja. Esta toxina causa muerte de plántulas, y en plantas en prefloración origina un enrollamiento de las hojas, acortamiento de entrenudos, hojas pequeñas en las yemas axilares, apariencia de roseta, frutos muy pequeños y en ocasiones

achaparramiento. Este daño se conoce como amarillamiento por psílidos (psyllid yellows), y para producir los síntomas descritos se requiere la presencia de al menos 30 ninfas por planta. El psílido tiene una amplia gama de hospederos pero las solanáceas son sus preferidas. Daniels (1945) citado por Liu y Trumble (2004), reporta que también los adultos pueden inyectar la toxina. La sintomatología del amarillamiento por el psílido es muy similar a la originada por los fitoplasmas, y en relación a esto Garzón-Tiznado (2002) refiere que en México el psílido es el agente transmisor de un fitoplasma y que este último es el que ha diezmando la producción de jitomate en un 45%, lo cual coincide con los resultados que se obtuvieron en este trabajo. En San Luis Potosí, México, este es el primer reporte de detección del patógeno por PCR, además, esta enfermedad no ha sido estudiada ampliamente y es importante dilucidar el efecto de la toxina entomógena y el daño que realmente origina el fitoplasma, por lo que se plantea como perspectiva establecer una colonia de psílidos libres de fitoplasmas, y realizar transmisiones seriadas de fitoplasmas de plantas infectadas a plantas sanas por injerto y en ausencia de insectos; y por otro lado alimentar los psílidos libres de fitoplasmas en plantas sanas de jitomate. Esto nos permitiría corroborar el efecto directo de la toxina y la severidad de los síntomas asociados, y de igual forma se confirmaría la etiología fitoplásmica y los síntomas exclusivos que este patógeno induce. Actualmente, de acuerdo a las referencias citadas, se podría decir que en la región de Villa de Arista y el Huizache, la enfermedad que destruyó el 90% de la superficie cultivada se pudo deber tanto al fitoplasma como al efecto de la toxina entomogénica, ya que las poblaciones del psílido eran muy grandes. El patrón de distribución de la enfermedad apoya la noción de que el psílido puede ser el transmisor del fitoplasma detectado por PCR anidado. Una perspectiva importante de este trabajo es detectar por técnicas moleculares al fitoplasma en el insecto transmisor, determinar el tipo de transmisión e identificar el fitoplasma por secuenciación y patrón de restricción, para definir a que grupo taxonómico corresponde.

4.3. Diagnóstico de hongos fitopatógenos por PCR con los oligonucleótidos ITS1-ITS4

Los iniciadores diseñados por White y col. (1990), han sido los más utilizados para la amplificación de la región ITS de hongos fitopatógenos. Maes y col. (1998) citados por Martin y col. (2000), clasificaron un número limitado de especies de oomicetos y de ascomicetos basándose en el tamaño de los productos de PCR obtenidos con los ITS1/ITS4. La variabilidad de la región ITS también se ha aprovechado para diferenciar especies de un mismo género, Cooke y Dunca (1997) analizaron la región ITS de 18 especies de *Phytophthora*, la cual se amplificó con los oligos ITS1/ITS4 y posteriormente se obtuvieron los patrones de restricción con enzimas específicas. Además la secuenciación de la región ITS de diversas especies de hongos ha permitido el diseño de oligos específicos a nivel de género y a nivel de especie. La región ITS de *Pythium* y *Phytophthora* amplificada con los ITS1/ITS4 tiene el mismo tamaño, por lo que para diferenciar a estos géneros se ha diseñado un iniciador específico para *Phytophthora*, el cual se combina con el universal ITS 1. En el presente trabajo se detectaron hongos fitopatógenos en los tejidos de plantas de jitomate y chile por la amplificación de la región ITS1, 5.8S, ITS2 y una porción del gen 18S, con los oligos universales ITS1-ITS4. Se realizó la identificación por comparación del tamaño del ADN amplificado y separado en un gel de agarosa, respecto a productos análogos derivados de cepas control, y por clonación y subsecuente secuenciación del ADN amplificado. Aunque se puede considerar que esta metodología tiene la ventaja de detectar a cualquier hongo fitopatógeno porque utiliza oligos universales, no permite en todos los casos diferenciar aquellos géneros cuyos productos de PCR migran a una distancia similar en el gel de agarosa. Se puede distinguir claramente por el tamaño del producto de PCR a *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y *Fusarium* (Figura 18), siendo más difícil distinguir a *Fusarium* (550 a 570 pb) de *Alternaria* y *Verticillium* cuyos productos de PCR tienen un tamaño aproximado de 600 pb.

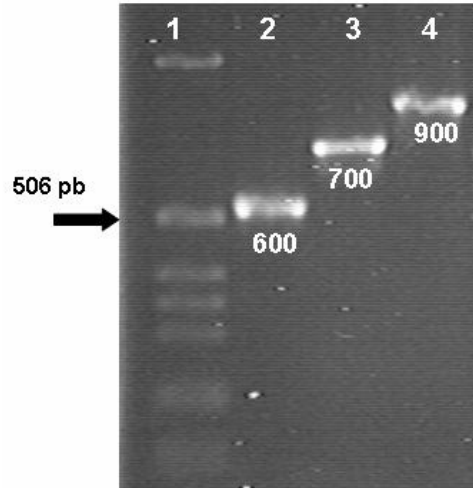


Figura 18. Movilidad electroforética diferencial de los productos de PCR obtenidos con los oligos ITS1/ITS4 para algunos hongos fitopatógenos. 1) Marcador molecular 1Kb, 2) *Fusarium oxysporum*, 3) *Rhizoctonia solani*, Marcador molecular 1Kb, 2) *Fusarium oxysporum*, 3) *Rhizoctonia solani*, 4) *Phytophthora capsici*.

Una limitante del uso de oligos universales es que pueden amplificar bajo ciertas condiciones el ADN ribosomal de origen vegetal, tal como aconteció en este trabajo, en el que se amplificó en un caso el 18S rRNA del jitomate. Existen situaciones contrarias, como el resultado de Muir y Schlötterer (1999), que utilizaron oligos universales para amplificar la región ITS de la hoja de roble (*Quercus petraea* Matt.) y amplificaron de manera preferencial la secuencias ITS de endosimbiontes y endoparásitos. Al parecer existen secuencias cortas comunes en las regiones ITS del rDNA en las plantas y en organismos eucariotes inferiores como los hongos, que son reconocidas y amplificadas por los oligos universales de ambos orígenes. Una revisión más exhaustiva de la literatura nos permitió conocer que se han diseñado nuevos iniciadores universales para la detección de hongos en tejidos vegetales, como ITS5/ITS4B

de Salazar y col. (2000), que demostraron no amplifican DNAr de tomate bajo condiciones de PCR muy diversas.

Es importante recalcar que las características principales a considerar en el desarrollo de los protocolos de diagnóstico con PCR son la especificidad, la sensibilidad y la rapidez. En cuanto a la especificidad, este requisito se puede cumplir diseñando iniciadores complementarios a secuencias que divergen entre géneros o especies de hongos. Las regiones ITS son variables en composición nucleotídica por lo cual se han utilizado con éxito para generar oligonucleótidos específicos que amplifican selectivamente el ADN entre y dentro de las especies de hongos fitopatógenos. La secuencia de la región amplificada con los oligos ITS1/ITS4 ha sido base para el desarrollo de una gran cantidad de iniciadores específicos. Bryan y col. (1995), desarrollaron oligos específicos que diferenciaron a los géneros *Gaeumannomyces* y *Phialophora*. Abd-Elsalam y col. (2003) amplificaron con los ITS1/ITS4 la región ITS y obtuvieron la secuencia de varios aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, la cual utilizaron para diseñar los oligos ITS-Fu-f and ITS-Fu-r altamente específicos para el género *Fusarium*. En múltiples trabajos también se han identificado y diferenciado especies de hongos, algunas íntimamente relacionadas. Por ejemplo, Nazar y col. (1991), así como Moukhamedov y col. (1994) diferenciaron especies de *Verticillium*. Schilling y col. (1996) distinguieron a las especies *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *F. avenaceum*. Moricca y col. (1998), diseñaron oligos para identificar específicamente a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, Moller y col. (1999) diferenciaron a *F. moniliforme* de *F. subglutinans*; y O'Donnell (1992) encontró que los productos de PCR obtenidos con el uso de iniciadores especiales a partir de aislamientos de *F. sambucinum* mostraron alta divergencia en secuencia.

La perspectiva de este trabajo es enfocarse en la secuencia de la región ITS de hongos de la región, para el diseño de iniciadores específicos que

puedan usarse para identificar los hongos más importantes que inciden en el altiplano potosino. La amplificación selectiva de un taxón sin reacciones cruzadas, es la mejor forma de aprovechar al máximo esta estrategia de identificación molecular de hongos. Un ejemplo de lo citado es el trabajo realizado por Trout y col., (1997), en el que se amplificó un ADN blanco a través de PCR con cebadores específicos para *Phytophthora infestans*. También es importante considerar que el diseño de oligos específicos es fundamental para la identificación de especies con una alta similitud en la región ITS, como es el caso de las especies de *Alternaria* (Konstantinova y col., 2002; Pryor y Michailides, 2002).

Los productos de PCR que se obtuvieron a partir de extractos de raíces de plantas de jitomate y chile colectadas en el altiplano potosino, se clonaron y secuenciaron tomando en cuenta el tamaño antes referido para los hongos *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* (obtenido con las cepas control del IFO). Nosotros identificamos a los hongos *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* por comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST y el método Clustal (MegAlign, DNA Star software, Madsison, WI); encontrando una concordancia entre el tamaño del producto y el género. Esto también es factible para *Alternaria arborescens* que fue el otro hongo identificado, con la salvedad de que hay una similitud entre los tamaños de los productos de PCR de *Fusarium* y *Alternaria*

4.3.1. Hongos involucrados en la Marchitez del chile

En el Altiplano Potosino se diagnosticó por PCR y se identificó por secuenciación a tres hongos, los cuales están involucrados en la enfermedad conocida como marchitez del chile. Estos hongos son *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp* y *Phytophthora capsici*, e infectan la raíz solos o en complejos. Este hallazgo coincide con otros estudios que muestran que esta enfermedad

es causada principalmente por un complejo de hongos que incluyen a *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia solani* (Duran-Ortiz y col., 2001; Guigón y González, 2001; Rico-Guerrero y col., 2001; López-Vazquez y col., 2002), o bien a *Phytophthora capsici* y *Fusarium* sp (González-Chavira y col., 2002). Esta enfermedad se encuentra presente en todo el mundo, y en México está ampliamente distribuida en los estados productores de chile donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo, particularmente en Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Sonora, Chihuahua y San Luis Potosí.

El agente etiológico dominante en esta región fue *Rhizoctonia solani*. Existen algunas discrepancias respecto a la patogenicidad de este hongo como causante de marchitez. González-Chavira y col. (2002), concluyen que *R. solani* es solo un hongo oportunista que se alimenta de tejido muerto. Este resultado puede ser un caso particular del aislamiento con el que trabajaron estos autores, debido a la complejidad de *R. solani*, en la cual existe una gran variabilidad genética entre los aislados. Dicha variabilidad se manifiesta en la existencia de cepas patógenas, no patógenas, así como virulentas e hipovirulentas (Vilgalys y Cubeta, 1994). Velásquez-Valle y Medina Aguilar (2003) probaron la patogenicidad de 21 aislamientos de *Rhizoctonia* sp procedentes de Aguascalientes, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. Con la excepción de un aislamiento, las cepas resultaron patógenas y exhibieron diferentes grados de severidad que oscilan entre 1.2 y 5.0, de acuerdo a la escala de Abawai y Pastor-Corrales (1990). Otros aspectos que deben considerarse son la reducción de la susceptibilidad a *R. solani* a medida que la planta se desarrolla (Benson y Baker, 1974) y las observaciones que indican que el desarrollo de síntomas moderados o severos pueden depender tanto de la temperatura de crecimiento del hongo, como del patosistema del que se trate (Mazzola y col., 1996). Estos criterios apoyan los resultados obtenidos, en relación a que en el Altiplano Potosino, *R. solani* es el agente causal principal de la marchitez del chile. Elías-Medina y col. (1997) encontraron que los aislamientos de *R. solani* obtenidos de muestras de chile procedentes de San

Luis Potosí se ubicaron en el grupo de anastomosis AG-4, y corresponden a patógenos virulentos que causan pudrición en semillas, por lo que se consideraría probable que algunos aislamientos identificados en este trabajo pertenezcan a este grupo. En otras regiones productoras de Chile como la del Baje, también han diagnosticado a los hongos *Rhizoctonia*, *P. capsici* y *Fusarium*, solos o en complejos de ellos, como causantes de la marchitez del Chile. *Rhizoctonia* fue el hongo que se aisló en todas las muestras y todas las localidades en una proporción del 75%, *Fusarium* en 29% y *P. capsici* en 9% (Pérez-Moreno y col., 2002). Estos resultados son similares a los que se obtuvieron en este trabajo. Vásquez-López y col. (2002), aportaron resultados análogos al determinar la etiología y proporción de patógenos que afectan al Chile en el Valle Central de Oaxaca. *Rhizoctonia* estuvo presente en todas las localidades muestreadas y con el mayor porcentaje de 57.89%, después *Fusarium* con 27.10% y *P. capsici* no se detectó en todas las localidades y el porcentaje fue de 17.38%. González-Chavira y col. (2002), encontraron que el complejo *Fusarium-Rhizoctonia* provoca en el Chile amarillamiento, defoliación, caída de flores y finalmente la muerte a los 60 días de expresar los primeros síntomas, lo cual coincide con el diagnóstico establecido por PCR y microbiológico del patosistema *Fusarium-Rhizoctonia*-Chile en Cedral.

Durante la realización de este trabajo se identificó inicialmente a *R. solani* por el tamaño de la banda del producto de PCR (aproximadamente de 700pb) obtenido con los oligos ITS1/ITS4, lo cual concuerda con los resultados de Mazzola y col. (1996), que realizaron una investigación sobre la virulencia de *R. solani* AG-8 y *R. oryzae* en trigo. Ellos primero amplificaron la región ITS con los oligos ITS1/ITS4 y el tamaño de los productos obtenidos para todos los aislamientos de nueve grupos de anastomosis de *R. solani* fue de 680 pb. El tamaño para *R. oryzae* fue de 650 pb. Esta diferencia no es suficiente para distinguir ambas especies por lo que se obtuvieron las secuencias de esta región y en base a ella se diseñaron los oligos específicos para *R. oryzae* denominados RO1/RO2. De igual forma para los aislamientos dentro de un mismo grupo de anastomosis importante por sus características de

patogenicidad (AG-4), los fragmentos amplificados con los oligos ITS1/ITS4 variaron de 650 a 750 pb, los cuales se caracterizaron por el patrón de restricción, encontrando que la virulencia de 16 aislamientos se puede relacionar con el tamaño de la banda y el patrón de restricción (Huang y Tschen, s/f). Esto confirma la variabilidad de la región ITS para subespecies.

Si bien en la mayoría de las investigaciones citadas la marchitez del chile por *P. capsici* fue la de menor incidencia, es indudable que este patógeno es muy importante para el cultivo del chile, desde que se diagnosticó por primera vez en Nuevo México por Leonina (1922). En nuestro país se informó de su presencia en 1944, por el Servicio Cuarentenario de los Estados Unidos de América, al detectar a este hongo en chiles procedentes de México. Galindo (1960), confirma la presencia de esta enfermedad y señala que es causada por *P. capsici*. Actualmente este hongo no solo es un serio problema para el chile, sino también para cultivos como las cucurbitáceas y el jitomate (Tian y Babadoost, 2004; Mendoza-Zamora, 1996; Romero-Cova, 1988). Este patógeno representa uno de los problemas potenciales más graves debido a que en condiciones favorables puede causar pérdidas devastadoras al afectar del 60 al 100% de la superficie cultivada. En relación a las técnicas de diagnóstico González-Chavira y col. (2002) identificó a *P. capsici* mediante la técnica de ELISA y por PCR. Con respecto a esta última, ellos utilizaron una técnica diferente a la utilizada en este trabajo, por que amplificaron específicamente un fragmento del gen de la cutinasa de *P. capsici*. No así Tian y Babadoost (2004) que detectaron a *P. capsici* por amplificación de la región ITS, modificando la técnica desarrollada por Ristaino y col. (1998). Estos investigadores diseñaron un oligo específico, en base a la secuencia de la región amplificada con los oligos ITS5/ITS4 de varias especies de *Phytophthora*, al cual denominaron PCAP, y el cual combinan con el ITS5. Con esta técnica confirmaron los hospederos de *P. capsici* y además establecieron nuevas especies infectadas por este hongo como son *Beta vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Brassica rapa*, *Spinacia oleracea* y *Abutilon theophrasti*. Este método resultó ser rápido y

sensible al detectar a *P. capsici* en las etapas tempranas de la infección. Existe otro juego de iniciadores específicos para la detección de *P. capsici* en suelo y en tejido vegetales, el cual se diseñó de un fragmento de ADN de 2401 pb que contiene una región específica para la especie *capsici*, estos oligos se identifican como PC22E3/PC22H3 y no amplifican otras especies de *Phytophthora* (Song y Kim, 2000).

4.3.2. Cáncer del tallo por *Alternaria arborescens*

El ADN del hongo identificado por secuenciación como *Alternaria arborescens* (Simmons, 1999), el cual también se conoce como *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Grogan y col., 1975), se obtuvo de plantas de jitomate colectadas en Villa de Arista, las cuales presentaban síntomas de marchitamiento, cáncer y pudrición basal de color casi negro en el tallo, así como marchitez. Estos síntomas son semejantes a los descritos para la enfermedad denominada cáncer del tallo por *Alternaria arborescens*, en particular en los cánceres café oscuros a negros cerca del nivel del suelo, y a lo largo del tallo. Los síntomas foliares se caracterizaron por epinastía, enrollamiento y manchas necróticas irregulares que llegan eventualmente a necrosis total de la hoja, pero que a diferencia de *A. dauci* no produce círculos concéntricos (Bruna, 1993). Esta enfermedad no es de las más importantes para el cultivo del jitomate, debido a que prácticamente se ha confinado a ciertas regiones productoras de Grecia (Smith y col., 1988), California, EUA (Grogan y col., 1975) y Pakistán. Sin embargo, debe considerarse que cuando llega a presentarse, los daños que provoca son de importancia económica, como lo sucedido en la región de Arista en SLP. El hongo sobrevive en el suelo por incorporación de los restos de tejidos infectados. La infección ocurre cuando las esporas se diseminan por el viento y se depositan sobre las plantas, o cuando éstas se ponen en contacto con el suelo infestado. Las condiciones que se requieren para el desarrollo de esta enfermedad son agua libre sobre los tejidos, lo cual es necesario para que las esporas germinen y se lleve a cabo la

infección. La diseminación se favorece por la lluvia, rocío y riegos pesados; así como temperatura aproximada de 25°C (Davis y col., 2003). En los campos de cultivo en los que detectamos esta enfermedad, prevalecieron las condiciones antes descritas por las lluvias intensas y la acumulación de la humedad en la parte basal del tallo debido al sistema de producción con acolchado plástico.

Alternaria arborescens es uno de los hongos necrotróficos que producen una toxina que se ha considerado específica o selectiva del hospedero, denominada AAL, la cual es el principal mecanismo de patogenicidad de este hongo. La toxina AAL está relacionada estructuralmente con otro grupo de toxinas conocidas como fumonisinas. Las isoformas T_A y T_B son las más activas. Los síntomas originados involucran muerte celular programada equivalente a la apoptosis, en respuesta a la toxina secretada por el hongo. La toxina se produce desde que las esporas germinan sobre el tejido de la planta y tienen un papel preponderante en la patogénesis inicial. La cantidad de T_A y T_B en las esporas después de 24 h de germinación fue de 0.25 pg por espora. Esta cantidad es suficiente para causar daño a varias células adyacentes a la espora. Además esta toxina parece ser importante en el establecimiento del patógeno en los cultivares susceptibles (Kodama y col., s/f). Spassieva y col., (2002) demostraron que la toxina AAL inhibe la biosíntesis de esfingolípidos, que el blanco de esta toxina es la esfinganina N-acetiltransferasa y que la susceptibilidad de los cultivares (por ejemplo, Earlypak 7 y First) es el resultado de una señal o señales derivadas de la alteración en la vía metabólica de la biosíntesis de la ceramida. Aún no se establece claramente la relación entre el metabolismo de la ceramida y la muerte celular programada en las plantas. La susceptibilidad o resistencia del jitomate al hongo y la sensibilidad o insensibilidad a la toxina AAL está determinada por un solo *locus* Asc en el cromosoma 3. Esta toxina no se comportó propiamente como una "Host-specific toxin" (HST) por que no actuó específicamente en los cultivares susceptibles de jitomate, sino que también actúa en otras especies de solanáceas como *Solanum lyratum*, *S. septemlobum* and *S. Scabrum*, las cuales resultaron tan sensibles como *L. esculentum* (*asc/asc*) (Mesbah y col., 2000).

4.3.3. Tizón temprano

Prácticamente al final del ciclo del cultivo del jitomate, en la región de Arista y el Huizache, se presentó el tizón temprano por *Alternaria solani*. Las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de esta enfermedad con carácter epidémico prevalecieron en las regiones afectadas (períodos húmedos cortos interrumpidos por otros secos, temperatura entre 25 a 30°C), así como otras condiciones como alta densidad de plantas sembradas, y sobre todo plantas debilitadas por las enfermedades cáncer bacteriano y Fitoplasmosis. El hongo es un patógeno débil que solamente causa problemas cuando se presentan las condiciones antes descritas (Sánchez-Castro, 1990). Es importante considerar que en las circunstancias en las que se llevó a cabo la producción, los productores no aplicaron ningún tratamiento para esta enfermedad y por la incidencia y severidad de daños, la densidad de conidias debió ser muy alta. Las conidias son capaces de sobrevivir a condiciones adversas y permanecer viables, de un año para otro, constituyéndose en el inóculo inicial de nuevas epidemias, especialmente donde se realiza el monocultivo de la especie. El número de esporas presentes en el aire, puede servir para predecir los brotes epidémicos y racionalizar la protección en cantidad y oportunidad. Herzog y col. (s/f) demostraron la existencia de una alta correlación entre la cantidad de esporas atrapadas y la cantidad de sitios de infección (enfermedad potencial). Podemos concluir que el monocultivo de tomate favorece las posibilidades de epifitias de *Alternaria solani* y que la cantidad de esporas se puede utilizar como parámetro de predicción y toma de decisión para la implementación de estrategias preventivas de manejo.

Los trabajos de Pryor y Gilbertson (2000) fundamentan el uso del análisis de la secuencia de la región ITS para resolver la clasificación en especie-grupo que correlacione la morfología conidial y la diferenciación entre especies relacionadas dentro del mismo grupo. Se reconocen los principales grupos que son *alternata*, *tenuísima*, *arborescens*, *porri* e *infectoria*; sin embargo, la divergencia entre los aislamientos de los cuatro primeros grupos es menor que

la que exhiben los aislamientos del grupo de la especie *A. porri*. Con estos resultados, aún no queda resuelta la relación entre los aislamientos del taxón *Alternaria*, por lo que se requiere una evaluación más completa de la utilidad de la región ITS para resolver este taxón (Pryor y Michailides, 2002). El árbol filogenético obtenido para nuestro aislamiento identificó claramente su relación con *A. Arborescens*, y mas alejada de *A. alternata*. *Alternaria solani*, corresponde al grupo de *A. porri*.

CONCLUSIONES

1. Con las modificaciones mencionadas a los métodos de extracción de ADN, se detectó *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) mediante la técnica de PCR utilizando los oligos CM₃ y CM₄, en tejidos vegetales infectados, semillas y suelo de regiones semiáridas infestados naturalmente. Esta técnica resultó ser más sensible que la técnica de diagnóstico ELISA.
2. El porcentaje de incidencia del cáncer bacteriano ocasionado por *Cmm* en la región de Arista en el ciclo agrícola 2004 fue de 100%, siendo esta enfermedad una de las más importantes respecto a pérdidas producidas en el Estado de SLP.
3. Se detectó por primera vez en el estado de SLP, por medio de técnicas moleculares, una fitoplasmosis del jitomate transmitida por el psílido *Bactericerca* (= *Paratrioza*) *cockerelli*, en la región de Arista y el Huizache, San Luís Potosí. Esta fue devastadora y su etiología es diferente al *Big budy Aster yellow*.
4. Basándose en el tamaño de banda del producto de amplificación de la región ITS del rDNA, y por su secuencia, se identificaron a los hongos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* responsables de la marchitez del chile, y al hongo *Alternaria arborescens* responsable del cáncer del tallo del jitomate.
5. Se detectaron por PCR con los oligos ITS1/ITS4 y por análisis microbiológico, un síndrome de marchitez causado por un complejo *Rhizoctonia solani-Fusarium sp*, y el Tizón temprano por *Alternaria solani*. Este problema se presentó con más frecuencia en regiones del Huizache y Cedral causando pérdidas considerables.

Este es el primer trabajo de diagnóstico molecular de enfermedades de hortalizas desarrollado en un centro de investigación de San Luís Potosí.

REFERENCIAS

- Abawi, G. S., y Pastor-Corrales, M. A. (1990). Root rot of beans in Latin America and Africa: Research Methodologies, and Management Strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali Colombia. 114p.
- Abd-Elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel-Satar, M. A., Khalil, M. S. y Verreet, J. A. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (4): 82-85.
- Aggiehorticulture. (2004). Enfermedades del Cultivo del tomate. www.Cruzdelsuragro.com.ar.
- Agrios, G. N. (1996). Fitopatología. 2ª ed. Editorial Limusa, S. A. de C. V. México. p 428.
- Ahrens, U., y Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies sequences of the 16S rRNA gene. Phytopathology 82: 828-832.
- Alvarez, A. M. (s/f). Validation of rapid diagnostic test for the bacterial canker pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Department of Plant Pathology, University of Hawaii. <http://www.stalabs.com/seminar/tomsem3.htm>
- Alvarez, A. M., y Kaneshiro, W. S. (1999). Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. Seed Health Symposium. Proceedings of the 3rd international seed testing association plant disease committee. Ed. International Seed Testing Association and Iowa State University.
- Anaya, S. R., Bautista N. M., y Domínguez B. R. (1992). Manejo Fitosanitario de las hortalizas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.
- Andersen, M. T., Beever, R. E., Gilman, A. C., Liefting, L. W., Balmori, E., Beck, D. L., Sutherland, P. W., Bryan, G.T., Gardner, R. C., y Foster, R. L. S. 1998. Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. Plant pathology 47: 188-196.
- Anwar, A., van der Zouwen, P. S., Ilyas, S., y van der Wolf. (2004). Bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) of tomato in commercial seed produced in Indonesia. Plant Disease 88:680. Bach, H. J., Jessen, I., Schloter, M., y Munch, J. C. (2003). A TaqMan-PCR protocol for quantification and

differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. Journal of Microbiological Methods 52:85-91.

Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H. C., Y Gilbertson, R. L. (1994). Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var *fuscans*, using the polymerase chain reaction. Phytopathology 84: 1185-1192.

Bach, H. J., Jessen, I., Schloter, M., y Munch, J. C. (2003). A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. Journal of Microbiological Methods 52:85-91.

Bagsic, R. D., Fegan, M., Li, X., y Hayward, A. C. (1995). Construction of species-specific primers for *Pseudomonas andropogonis* based on 16s rDNA sequences. Letter Applied Microbiology. 21:87-92.

Bahnweg, G., Schulze, S., Möller, E. M., Rosenbrock, H., Langebartels, C., y Sandermann, Jr. H. (1998). DNA isolation from recalcitrant materials such a tree roots, bark, and forest soil for detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. Annals of Biochemik 262:79-82

Balesdent, M. H., Jedryczka, M., Jain, L., Mendes-Pereira, E., Bertrand, J., y Rouxel, T. (1998). Conidia as substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of components of the *Leptosphaeria maculans* species complex. Phytopathology 88:1210-1217.

Basim, E., Basim, H., Dickstein, E. R., y Jones, J. B. (2004). Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. Plant Disease 88:1048.

Benson, D. M., y Baker, R. (1974). Epidemiology of *Rhizoctonia solani* preemergence damping-off of radish: Inoculum potential and disease potential interaction. Phytopathology 64:957-962.

Berg, M., y Seemüller, E. (1999). Chromosomal organization and nucleotide sequence of the gene coding for the elongation factor G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. Gene 226: 103-109.

Bertaccini, A., Mittempergher, L., y Vibio, M. (1996). Identification of phytoplasmas associated with decline of European hackberry (*Celtis australis*). Annals of Applied Biology 128:245-253.

Blancard, D. (1996). Enfermedades del tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España.

Boudyach, E. H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E. , y Ait Ben Aoumar, A. (2001). Selection of antagonistic bacteril *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Science and Technology* 11: 141-149.

Bruna, A. (1993). Cancro del tallo en tomate causado por *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* II Congreso Nacional de Fitopatología. *Simiente* 63(1):42-63.

Bryan, G.T., Daniels, M. J., y Osbourn, A. E. (1995). Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequence. *Applied Environmental Microbiology* 61: 681-689.

Bustamante, E. y Gamboa, A. (2003). Mancha bacteriana de la hoja y fruto de chile y tomate. *Revista Manejo Integrado de Plagas* No. 58. Ed. Turrialba. CATIE.

Castello, J. D., Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M., Rogers, S. O., Bachand, G. D., Jagels, R., Carlisle, R. J. J., y Liu, Y. (1995). Detection of infectious tomato tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology* 85:1409-1412.

Chen, J., Sako, N., Ohshima, K y Watanabe, Y. (1996). Specific detection of the rakkyo strain of tobacco mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Annals Phytopathological Society Japan* 62: 513-516.

Chen, J., WeiZhen, H., JiaLing, Y., y ChengGuí, H. 1996. Rapid detection of tomato ringspot virus by the reverse transcription polymerase chain reaction. *Chinese Journal of Virology* 12: 190-192.

CIAT. (2002). Detection of a phytoplasma associate with frogskin disease in cassava (*Manihit esculenta* Crantz) in Colombia. *In: Improved Cassava for the Developing World*. Ed: H. Ceballos, M. Fregene, E. Alvarez, y A. C. Belloti. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Comisión Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A. C. www.cesavegorg/scv_html

Correll, J. C., Gordon, T. R., y Elliot, V. J. (1987). Host range, specificity, and biometrical measurements of *Leveillula taurica* in California. *Plant Disease* 71: 248-251.

Cooke, D. E., y Duncan, J. M. (1997). Phylogenetic análisis of *Phytophthora* species based on the ITS 1 and ITS 2 sequences of ribosomal DNA. *Mycological* 1001: 667-677.

Darrase, A., Priou, S., Kotoujansky, A., y Bertheau, Y. (1994). PCR and restriction fragment-length polymorphism of *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in

relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2180-2187.

Davis, R., Miyao, M. G., Subbarao, K. V., y Stapleton, J. J. (2003). UC IPM Pest Management Guidelines: Tomato Disease. UC IPM online www.ipm.ucdavis.edu/PGM/r78310/3111.html

Deng, S., y Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.

Depasrasis, J., y Roth, D. A. (1990). Nucleic acid probes for identification of phyto bacteria – identification of genus-specific 16S ribosomal-RNA sequences. *Phytopathology* 80:618-621.

Dreier, J., Bempohl, A., Eichenlaub, R., (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462-468.

Drygin, Y. F., Korotaeva, S. G., y Dorokhov, Y. L. (1992). Direct RNA polymerase chain reaction for TMV detection in crude cell extract. *FEBS Letters* 309: 350-355.

Duran-Ortiz, L. J., Pérez-Moreno, L., y Sánchez-Pale, J. R. (2001). Identificación de los hongos que ocasionan la marchitez del chile en la región del bajo. XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. p. F-13. Querétaro, Qro.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G., y Alabouvette., C. (2001). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soil in France. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 61-71.

Eichenlaub, R., Meletzus, D., Bempohl, A., Dreier, J., y Bahro, R. (1992). Molecular analysis of the pathogenic interaction of the bacterium *Clavibacter michiganensis* with the host plant. p 17-25. in: *Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals*. K. Ono, K. Oouo, T. Hirabayashi, S. Kikuchi, H. Handa, y K. Kajiwara, eds, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan.

Elías-Medina, R., Ponce-González, F., y Romero-Cova, S. (1997). Grupos anastomóticos de *Rhizoctonia solani* Kuhn que atacan papa, frijol y haba en cuatro municipios del estado de México y chile en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Micología* 13:33-40.

Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C., y Porter, I. J. (1999). Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology* 89:392-397.

Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clere, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannine, P., Nesme, X., y Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the

extraction of DNA from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5409-5420.

Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., y Tooley, P. W. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans* : chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77:653-661.

Galindo, A. J. (1960). Estudio preliminar sobre la marchitez de las plantas de Chile en México y su agente causal *Phytophthora capsici* Leonina. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México. 42p.

Garzón-Tiznado, A. (2002). El papel de la *Paratizioa cockerelli* en la transmisión del fitoplasma del tomate. Fundación Produce Sinaloa A. C.

Gitaitis, R. D., Dowler, C. C., y Chalfant, R. B. (1998). Epidemiology of tomato spotted wilt in pepper and tomato in Southern Georgia. *Plant Disease* 82: 752-756.

Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., y Voloudakis, A. E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75:834-838.

Gitaitis, R. D., McCarter, S., y Jones, J. (1992). Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease* 76:651-656.

Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton, W. M., y Peterson, R. H. (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato. *Phytopathology* 81:1519-1523.

Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., y Ricker, M.D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease* 77(11): 1069-1076.

Goldbach, R., y Kuo, G. (1996). Introduction: The proceedings of the International Symposium on tospovirus and thrips of floral and vegetable crops. *Acta Horticulture* 431:21-26.

González-Chavira, M. M., Torres-Pacheco, I., y Guzmán-Maldonado, H. (2002). Patógenos involucrados en la marchitez del Chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12.

Gordon, T.R., y Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35:111-128.

Green, M. J., y Thompson, D. A. (1999). Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 83:482-485.

Grogan, R.G., Kimble, K. A., y Misaghi, I. (1975). A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 65, 880-886.

Guigón, C. y González, P. A. (2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annum* L.) y su comportamiento temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1):49-56.

Gundersen, D. E., y Lee, I. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.

Guthrie, J. N., White, D. T., Walsh, K. B., y Scott, P. T. 1998. Epidemiology of phytoplasma-associated papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Diseases* 82:1107-1111.

Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., y Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2879-2884.

Harrison, N. A., Richardson, P. A., Tsai, J. H., Ebbert, M. A., y Kramer, J. B: (1996). PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease* 80: 263-269.

Hartung, F., Werner, R., Mühlbach, H. P., y Büttner, C. (1998). Highly specific PCR diagnosis to determine *Pseudomonas solanacearum* strains of different geographic origins. *Theoretical and Applied Genetics* 96:797-802.

Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. 29:65-87.

Herzog, L. J., Rista, L. M., Sillon, M., y Herzog, G. (s/f). *Alternaria solani*, en tomate bajo invernaderos: Relación entre nivel de esporas, enfermedad potencial/monocultivo. www.fac.unl.edu.ar/intensivos/alternaria_solani.htm
www.fac.unl.edu.ar/intensivos/alternaria_solani.htm

Huang, P. T., y Tschen, J.S.M. (s/f). Exploration of pathogenicity and DNA variation of *Rhizoctonia solani* AG. Department of Botany, National Chung Hsing University, 250 Kuokuang Road, Taichung, Taiwan 40227, R.O.C. www.nchu.edu.tw/~isr2000/total%20abstract.htm

INEGI. (1999). Anuario Estadístico del Estado de San Luis Potosí.

INEGI. (2002). <http://www.inegi.gob.mx/difusion/español/fecono.htm>/Estadística Económica.

Instituto Centroamericano de Agricultura (2001). Aster leafhopper. www.ica.gov.co/publicaciones/plagas/aster/asterendemica/aster/21.htm.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2002). *Cucumber Mosaic Virus*. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/71010000.htm.

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2002a). *Tobacco Mosaic Virus*. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/71010000.htm.

Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. y Zitter, T. A. (1991). Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, Minn.

Jones, J.P., Jones, J. B. , Stall, R. E., y Zitter, T. A. (1993). Diseases of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. Common Names of Plant Diseases. APSnet.org/online/common/names/tomato.asp.

Kageyama, K., Ohyama, A., y Hyakumachi, M. (1997). Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Disease* 81: 1155-1160.

Kaneshiro, W. S., y Alvarez, A. M. (2003). Comparison of PCR and ELISA assays for hypovirulent and non-virulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. <http://www.stalabs.com/seminar/tomsem3.htm>. University of Hawaii, Honolulu.

Katan, T., Shlevin E. y Katan, J. (1997). Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surface of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology* 87: 712-719.

Kodama, M., Akamatsu, H., Otsu, H., y Ohmoto, K. (s/f). Localization of the pathogen and *in planta* production of AAI-toxins in tomato infected with *Alternaria alternata* tomato pathotype. Faculty of Agriculture and United Graduate School of Agriculture, Tottori University, Japan. Kodama [www. Bspp.org.uk/icpp98/1.3/20html](http://www.Bspp.org.uk/icpp98/1.3/20html).

Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., van Get-Pelzer, M. P. E., van der Zouwen, P., y van den Bulk, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays.

Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E., y Gundersen, D. E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Lee, I. M., Pastore, M., Vibio, M., Danielli, A., Attathom, S., Davis, R.E., y Bertaccini, A. (1997). Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *European Journal of Plant Pathology* 103: 251-254.

Lee, I M., Gundersen, D. E., Davis, R. E., y Bartoszyk, I. M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.

Leite, R. P. Jr., Minsavage, G. V., Bonas, U., y Stall, R. E. (1994). Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:1068-1077.

León, G. H. M. (1988). Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa. INIA. SARH. Sinaloa, México.

Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 12:401-408.

Ley-Flores, J. H. (1990). Virus Mosaico del Tabaco. En : Primer taller sobre enfermedades de hortalizas. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. y Escuela Superior de Agricultura. Universidad Autónoma de Sinaloa. s/p.

Leyva-López, N. E., Ochoa-Sánchez, J. C., Leal-Kleveza, D., y Martínez-Soriano, J. P. (2002). Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 1062-1068.

Lindqvist, H., Koponen, H., y Valkonen, J. P. T. (1998). *Peronospora esparsa* on cultivated *Rubus arcticus* and its detection by PCR based on ITS sequences. *Plant Disease* 82:1304-1311.

Liu, D., y Trumble, J. (2004). Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 97(3):1078-1085.

López-Vázquez, M.A., González-Chavira, M. M., Torres-Pacheco, I., Delgadillo-Sánchez, F., y Guevara-González, R. G. (2002). Patógenos involucrados en la pudrición de raíz del chile. XXIX Congreso Internacional de Fitopatología. p. F155. Monterrey, N. L.

Llauger, R., Rohde, W., Cueto, J. R., Becker, D., Oropeza, C., Peralta, E., González, V., y Ramírez, I. (2001). Diagnóstico y caracterización de la enfermedad

de Amarillamiento Letal del cocotero en Cuba. 2001 Caribbean Division Meeting Abstracts. June 11-15, 2001-La Habana, Cuba.

Louws, F. J., Rademaker, J. L. W., y Bruijn, F. J. (1999). The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection and disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology 37: 81-125.

Luna-Esquivel, G., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., y Martínez-de la Vega, O. (2004) Primer Reporte del Fitoplasma Pigeon Pea Witches Broom en Altamirano, Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología Vol. 22:125-128

Maes, M., Garbeva, P., y Crepel, C. (1996). Identification and sensitive endophytic detection of the FIRE blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. Plant Pathology. 45:1139-1149.

Martin, R. R., Delano, J. y André Lévesque C. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Annual Review of Phytopathology 38: 207-239.

Martini, M., Murari, E., Mori, N., y Bertaccini, A. (1999). Identification and epidemic distribution of two flavescence doree-related phytoplasmas in Veneto (Italy). Plant Disease 83: 925-930

Matsumoto, C., Kageyam, K., Suga, H., y Hyakumuchi, M. (1999). Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. Mycoscience 40:321-331.

Mazzola, M., Oitak. Wong, y Cook, R.J. (1996). Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. Phytopathology 86:354-360.

Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., y Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71:491-499.

Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J., y Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology 175:2131-2136.

Mendoza-Zamora, C. (1996). Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 24-26p.

Mesbah, L. A., van der Weerden, G. M., Nijkamp, H. J. J., y Hille, J. (2000). Sensitivity among species of Solanaceae to AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Plant Pathology*. 49(6):734-741.

Miller, D. N., Bryant, J. E. , Madsen, E. L., y Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4715-4724.

Mills, D., Russell, B. W. y Hanus, J. W. (1997). Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequence isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology* 87: 853-861.

Moller, E. M., Chelkowski, J., y Geiger, H. H. (1999). Species-specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. *Journal of Phytopathology*. 147: 497-508.

Monreal-Vargas, C. T. (1992). Detección, hospederas y distribución de *Fusarium* en San Luis Potosí. *Tecnología y Ciencias Agropecuarias* 1(2):87-94.

Monreal-Vargas, C. T. (1994). Enfermedades del jitomate en Villa de Arista, SLP. Cuarta Reunión Científica y Tecnológica Forestal y Agropecuaria. p 45.

Moricca, S., Ragazzi, A., Kasuga, T., y Mitchelson, K.R. (1998). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*. 47: 486-494.

Moukahmedov, R., Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J. (1994). Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequence for diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84: 256-259.

Muir, G., y Schlötterer, C. (1999). Limitations to the phylogenetic use of ITS sequences in closely related species and populations- a case study in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. In *Tools for Biodiversity*. Gillet, E. M. (Ed.) <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/wichmarker/index.htm>

Mumford, R.A., Baker, I. y Wood, K. R. (1994). The detection of tomato spotted wilt virus using polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 57: 109-115.

Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., and Tsuchizaki, T. (1993). Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase reaction. *Phytopathology* 83:786-791.

Narayanasamy, P. (2001). *Plant pathogen detection and disease diagnosis*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 518 p.

Navot, N., Zeidan, M., Picheraky, E., Zamir, D., y Czosneck, H. (1992). Use of the polimerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* 82:1199-1202.

Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., y Robb, J. (1991). Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiology of Molecular Plant Pathology*. 39: 1-11.

O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetic* 22: 213-220.

Orgram, A. (2000). Soil molecular microbial ecology ata ge 20: methodological challenges for the future. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1499-1504.

Pérez-Moreno, L., Durán-Ortíz, L. J., y Sánchez-Pale, J. R. (2002). Identification of fungi that cause "pepper wilt", in the Bajío region. Proceedings of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12.

Plaats-Niterink, A. J. van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, No 21. Centraalbbureau Voor Schimmelcultures, Baam, Netherlands.

Plyler, T. R., Simone, G. W., Fernández, D., y Kistler, H. C. (1999). Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary Isnad date palm wilt pathogen. *Phytopathology* 89:407-413.

Pohronezny, K. y Volin, R. B. (1983). The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. *Hort. Science* 18(1): 69.

Polston, J. E., y Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.

Pozo-Campodónico, P. (1994). El tratamiento integrado de virosis en el cultivo del chile. *Revista de la Universidad Cristóbal Colón* 11:65-91.

Pryor, B. M., y Gilbertson, R. L. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycology Research* 104: 1312-1321.

Pryor, B. M., y Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416.

Ramírez-Villapudua, J. (1990). Pudrición de la corona y raíz del jitomate. En: Primer taller sobre enfermedades de hortalizas. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. y Escuela Superior de Agricultura. U.A.S. s/p.

Ramírez Villapudua, J. y García-Estrada, R. S. (1990). Marchitez por *Fusarium*. En: Primer taller sobre enfermedades de hortalizas. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Escuela Superior de Agricultura. U.A.S. s/p

Ramírez -Villapudua, J., García-Estrada, R. S. y Ley-Flores, J. H. (1990). Virus de la Marchitez Manchada del Tomate. En: Primer taller sobre enfermedades de hortalizas Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. y Escuela Superior de Agricultura. U.A.S. s/p.

Ramírez- Villapudua, J. y Rodríguez- Báez, M. E. (1990). Marchitez del chile. En : Primer taller sobre enfermedades de hortalizas. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Escuela Superior de Agricultura. U.A.S. s/p

Retes-Cazares, J. E. (1982). Evaluación del sistema "Hyre" en la predicción del tizón tardío *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en el norte de Sinaloa. Agric. Tec. Méx.8 (2):105-108.

Rico-Guerrero, L., Guerrero-Aguilar, B. Z., López-Vázquez, A., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R. G., Torres-Pacheco, I., y González Chavira, M. M. (2001). Búsqueda de resistencia natural en plantas de chile (*Capsicum spp.*) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. p. F-134. Querétaro, Qro.

Ristaino, J. B., Trout, C. L., y Gregory, P. (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. Applied and Environmental Microbiology 64: 948-954.

Rodríguez, R. R. (1997). Cultivo moderno del tomate. Ed. Mundi-Prensa. España. p139- 140

Romero-Cova, S. (1988). Hongos fitopatógenos. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Ruey-Fen, L., Chung-Pin, L., Kuo-Ching, T., Fuh-Jyh, J., y Shyi-Dong, Y. (2003). Overview of newly-developed detection and monitoring techniques for invasive plant pathogens. Ed. Department of Plant Pathology, National Taiwan University. Taipei.

Salazar, O., Julián, M.C., Rubio, V. (200). Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia* Mycol. Res. 104:281-285.

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez-Castro, M. A. (1990). Enfermedades fungosas del tomate en Sinaloa. En : Primer taller sobre enfermedades de hortalizas. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. y Escuela Superior de Agricultura. U.A.S. s/p.

Sánchez-Castro, M. A. (1983). La cenicilla del tomate causada por *Oidiopsis taurica* (Lev) Salmon: Una nueva enfermedad en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 2(1):3-6

Sansour, M. A., Iraki, N. M., Eichenlaub, R., Manulis, S., y Barash, I. (2003). Implementation of PCR methods for the detection of the phytopathogenic bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Erwinia herbicola* pathovar *gysophila* in Palestinian agriculture. <http://www.move-in.org/unesco/sansour2.doc-tamano>

Saumtally, S., Aljanabi, S., Parmessur, Y., y Dookun-Saumtally, A. (s/f). Detection of a phytoplasma associate with yellow leaf syndrome of sugar cane. Mauritius Sugar Industry Research Institute.

Schaad, N. W. (1998). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Second edition, American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H. (1996). Polymerase chain reaction-based assays for specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology 86: 515-522.

Schneider, B., Gibb, K. S., Padovan, A., Davis, R. I., Rue, S. S. y de la Rue, S. (1999). Comparison and characterization of tomato big bud- and sweet potato little leaf-group phytoplasmas. Journal of Phytopathology 147: 31-40.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., y Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology, Vol 1 (Eds. Razin and Tully). Academic Press, 369-380.

Seal, S. E., Jackson, L. A., y Daniels, M. J. (1992). Use of transfer-RNA consensus primers to indicate subgroup of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. Applied and Environmental Microbiology 58: 3759-3761.

Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P. W., y Daniels, M. J. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood-disease bacterium by partial 16S-ribosomal-RNA sequencing. Construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal General of Microbiology* 139: 1587-1594.

Sharma, R., Mahla, H: R:, Mohapatra, T., Bhargava, S. C., y Sharma, M. M. (2003). Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:43-50.

Simmons EG, (1999). *Alternaria* themes and variations (236–243). Host-specific toxin producers . *Mycotaxon* 70, 325-369.

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., y Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16 S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.

Smith, I.M., Dunez, J., Lelliot, R.A., Phillips, D.H., Archer, S.A., eds., (1988). *European Handbook of Plant Diseases*. Oxford: Blackwell Scientific.

Sneh, B., Burpee, L., y Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Spassieva, S. D., Markham, J. E. y Hille, J. (2002). The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *The Plant Journal* 32(4): 561.

Song, J. Y., y Kim., H. G. (s/f). Selection of species-specific primers for detection of *Phytophthora capsici*. MOON NAM. College of Agriculture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea. www.ipp-ips.de/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=30

Sousa Santos, M., Cruz, L. , Norskov, P., y Ramussen, O. F. (1997). A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Seed Science and Technology* 25:581-584.

Staniulis, J. B., Davis, R. E., Jomantine, R., Kalvelyte, A., y Dally, E. L. (2000). Single and mixed phytoplasma infections in phyllody- and dwarf-diseased clover plants in Lithuania. *Plant Disease* 84:1061-1066.

Takeuchi, T., Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. (1997). Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. *Ann Phytopathol. Soc. Jon.* 63:455-462.

Tian, D., y Babadoost, M. (2004). Host range of *Phytophthora capsici* from Pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant Disease* 88:485-489.

Tokgonul, S. y Cinar, O. (2003). Studies on determination of bacterial canker of tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on commercial tomato seeds and its control possibilities.

Toth, K. I., Avrova, A. O., y Hyman, L. J. (2001). Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribe spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4070-4076.

Toth, I. K., Hyman, L. J., Taylor, R., Birch, P. R. J. (1998). PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* var *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv *phaseoli*. *Journal Applied of Microbiology* 85: 327-336.

Trout, C. L., Ristaino, J.B., Madritch, M., y Wangsomboonde, T. (1997). Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late-blight infected potato and tomato using PCR. *Plant Disease* 81: 1042-1048.

University Central Davis-IPM (2001). Integrated pest management of aster leafhoppers and aster yellows.
<http://www.gov.mb.ca/agricultura/crops/insects/fad5/500htm>

Vázquez-López, A., Tlapal-Bolaños, B., Yáñez-Morales, M. J. y Quintos-Escalante, M. (2002). An etiology of the rate of wilting of the chile de agua variety chili pepper (*Capsicum annum* L.) in the central valleys of Oaxaca, Mexico. Proceedings of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12.

Vavrina, C. (2001). Bacterial Speck of tomato: The other bacterial disease. SWFREC Homepage. University of Florida.

Vázquez-Marrufo, G., Vázquez Garcidueñas, M. S., Gómez-Luna B.E. y Olalde-Portugal, V. (2002). DNA isolation from forest soil suitable for PCR assays of fungal and plant rRNA genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:379-390. International Society for Plant Molecular Biology.

Velásquez-Valle, R., y Medina-Aguilar, M. M. (2003). Patogenicidad de aislamientos de *Rhizoctonia spp.* Sobre plántulas de chile (*Capsicum annum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 79-82.

Velásquez, R. V. y Valle, P. G. (1999). First report of powdery mildew in pepper in north-Central México. *Plant Disease* 83: 302.

Vilgalys, R., y Cubeta, M. A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annual Review of Phytopathology 32: 135-155.

Waterworth, H. E., y Mock, R. (1999). An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. Plant Disease 83: 1047-1050

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. White, and M. Innis (Eds). Academic Press Inc. p 315-322.

Yung- An, L., y Chi-Chung, W. (2000). The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41: 121-128.

Zhou, J. M., Bruns, A., y Tiedje J. M. (1996). DNA recovery from soil of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology 62: 62: 316-322

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE BEGOMOVIRUS

RESUMEN

Los geminivirus son fitopatógenos que ocasionan considerables daños a una gran variedad de cultivos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El género *Begomovirus* es el grupo más diversificado y ampliamente distribuido de la familia Geminiviridae; estos virus poseen un genoma de DNA de cadena sencilla que usualmente está compuesto de dos moléculas diferentes (bipartita), son transmitidos por la mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Genn., e infectan exclusivamente plantas dicotiledóneas.

El descubrimiento de nuevas especies y cepas de begomovirus en los agroecosistemas de América y otros continentes ha sido un proceso continuo y creciente en la última década. El frecuente desarrollo de enfermedades epidémicas asociadas a begomovirus refleja la conjunción de factores favorables, tales como la abundancia de plantas susceptibles, las densas poblaciones del insecto vector, y una elevada eficiencia en el proceso de transmisión, así como el surgimiento de variantes virales altamente virulentas (recombinantes) que se originan por la coinfección de plantas con diferentes begomovirus. Esta compleja problemática fitopatológica ha conducido a reconocer la urgente necesidad de desarrollar nuevos y mejores métodos moleculares de diagnóstico e identificación de begomovirus, basados en el uso de iniciadores universales que amplifiquen secuencias genómicas de estos virus sin importar su origen geográfico o filogenético; al mismo tiempo, dichos métodos deben ser rápidos y de bajo costo, reduciendo la necesidad de secuenciar todos los productos amplificados. Una característica que sería también muy deseable es que algunos de los productos de amplificación tuviesen alguna utilidad adicional, como el de constituir una fuente de secuencias promotoras y terminadores para la biotecnología vegetal.

En el curso del presente trabajo hemos desarrollado una nueva metodología para el diagnóstico y descubrimiento de nuevas especies begomovirales, la cual representa un adelanto tecnológico respecto a otros métodos utilizados hasta el presente. Se diseñaron ocho oligonucleótidos degenerados presumiblemente "universales", flanqueados por sitios de restricción. Estos iniciadores o "primers" amplificaron diferentes regiones del genoma A de begomovirus representativos de América, Europa, y África. Con los iniciadores Rep-Mot/ pCPc70 se amplificó una región genómica que permite distinguir, por la simple observación de la movilidad electroforética relativa del producto de PCR, a los begomovirus de América de aquellos que provienen del Viejo Mundo, o alternativamente, a diferentes especies de un mismo continente. Esta característica hace factible una determinación preliminar de la diversidad de especies virales en una región geográfica dada. Por otra parte, demostramos que la caracterización de los productos de PCR por digestión con las enzimas *Msp1* y *Hha1* permite establecer, de modo tentativo, la identidad de los virus en

diversas muestras, disminuyendo con ello la necesidad de clonar y secuenciar todos los productos de amplificación. Además, el uso de este método de PCR-RFLP permitió detectar infecciones múltiples en algunas muestras de campo y permitió identificar variantes del *virus huasteco de chile* (PHV) en muestras de jitomate y chile. Con la combinación de iniciadores Rep-Mot/ CP-Xba I-GUS se amplificó en forma consistente un fragmento de 400 pb. que contiene a dos promotores divergentes, de tal forma que el producto de PCR resultante puede tener un uso adicional en biotecnología de plantas, como fuente de promotores virales. Los métodos para el diagnóstico e identificación de begomovirus desarrollados en el presente trabajo han mostrado ser útiles, sencillos, rápidos, de menor costo y más versátiles que otros métodos publicados.

I. INTRODUCCIÓN

Los geminivirus son una familia de fitopatógenos que ocasionan considerables pérdidas y daños en numerosos cultivos, distribuyéndose principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. Son transmitidos por insectos del orden Homóptera a una gran variedad de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, y consecuentemente, la distribución geográfica de estos virus es paralela a la de los insectos vectores (Brown y Bird, 1992; Brown, 1994)

El genoma de los geminivirus está constituido por una o dos moléculas de ADN circular de cadena sencilla (por ello denominados monopartitas y bipartitas, respectivamente), las cuales se multiplican en el núcleo de las células vegetales por un mecanismo de “círculo rodante” (Stenger y col., 1991). Su nombre deriva de la morfología de su partícula, debido a que vista al microscopio electrónico, ésta se parece a dos poliedros regulares idénticos unidos por uno de sus lados (gemini = gemelos), característica que los distingue de todo los demás virus conocidos (Zhang y col., 2001)

Aunque hay antecedentes muy antiguos de enfermedades causadas por geminivirus, no fue sino hasta 1894 que se dio a conocer un estudio sobre el mosaico de la yuca, enfermedad de importancia económica en África causada por el virus africano del mosaico de la yuca (ACMV). A principios del siglo XX se informó sobre los virus del estriado del maíz (MSV), y del enchinamiento apical del betabel (BCTV). Sin embargo la caracterización de algunos de estos virus se logró hasta la década de los 70(s). Estos trabajos sirvieron para que se reconociera oficialmente a los geminivirus como un grupo taxonómico independiente (Goodman, 1977a, b). En México, el primer trabajo sobre geminivirus describió una enfermedad en jitomate con enchinamiento de las hojas, cuyo patógeno fue denominado virus del chino del tomate (CdTV) (Gallegos, 1978).

Taxonómicamente los geminivirus constituyen a la familia *Geminiviridae*, en la que se distinguen cuatro géneros definidos en base al vector que los transmite, al hospedero que infectan y a su estructura genómica (Fauquet y col., 2003) y son los siguientes: Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus y Begomovirus (Cuadro 1). Los begomovirus constituyen el grupo más diversificado y ampliamente distribuido, infectan dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), y su genoma es generalmente bipartita (Lazarowitz, 1992; Brown, 1994).

Cuadro 1. Características de los géneros de la familia *Geminiviridae*

Género	Genoma	Plantas que infectan	Insecto vector
Mastrevirus	Monopartita	Mono-y dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas (<i>Cicadellidae</i>)
Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas saltadoras (<i>Membracidae</i>)
Begomovirus	Mono- y bipartitas	Dicotiledóneas	Mosquita blanca (<i>Aleyrodidae</i>)

1.1. Organización del genoma de los begomovirus

En lo referente a los begomovirus bipartitas, entre los que se encuentran todos los originarios del continente americano, su genoma se compone de dos moléculas de ADN, designadas componentes A (ADN-A) y B (ADN-B), cada una de las cuales miden entre 2.6 y 2.8 kb (Lazarowitz, 1992).

Ambos componentes están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica (IR), la cual contiene el origen de replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción génica en direcciones opuestas (Hanley-Bowdoin y col., 2000). Con la excepción de una secuencia de la IR de aproximadamente 200 pb, que se encuentra en ambos

ADNs virales y es denominada la “región común” (RC), los dos componentes genómicos son completamente diferentes. El componente A contiene toda la información que se requiere para la replicación y encapsidación del virus, mientras que el componente B codifica a las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula a célula, sistémico y del núcleo a citoplasma. El componente A codifica cinco genes y el B solamente dos (Lazarowitz, 1992). Las diferentes nomenclaturas para estos genes se indican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Diversos nombres de los genes ubicados en los componentes A y B de los Begomovirus

Componente A	Componente B
gen <i>Rep</i> : AC1, AL1	gen <i>NSP</i> : BV1, BR1
gen <i>Trap</i> : AC2, AL2	gen <i>MP</i> : BC1, BL1
gen <i>REn</i> : AC3, AL3	
gen <i>CP</i> : AV1, AR1	
gen <i>C4</i> : AC4,	

El producto del gen *Rep*, es una proteína multifuncional que se une a secuencias específicas de ADN, posee actividad de endonucleasa y ATPasa, interactúa con reguladores del ciclo celular, y es esencial para la replicación de ambos componentes genómicos (Gutiérrez, 2000). La proteína *Trap* (proteína activadora de la transcripción) es el producto del gen *Trap* o *AC2*, y está involucrada en la regulación de los genes virales que se expresan en etapas tardías de la infección (*CP* y *NSP*), y actúa además como un supresor del mecanismo del silenciamiento de plantas (Sunter y Bisaro, 1991; van Wezel y col., 2002). El gen *Ren* o *AC3* codifica la proteína potenciadora de la replicación (*Ren*), la cual interactúa con *Rep* para hacer más eficiente la replicación (Hanley-Bowdoin y col., 2000). El producto del gen *CP* es la proteína de la cápside y es indispensable para la transmisión por el insecto vector (Azzam y col., 1994). El gen *NSP* o *BV1* codifica la proteína de transporte nuclear, la cual facilita el movimiento del ADN viral del núcleo hacia el citoplasma (Sanderfoot y Lazarowits, 1996), en tanto que el producto del gen *MP* o *BC1* es la proteína de

movimiento, funciona como una proteína de movimiento clásica, promoviendo un incremento en el límite de exclusión de los plasmodesmos (Ward y Lazarowitz, 1999). En el caso de monopartitas, el gen C4 codifica una proteína que probablemente esté involucrada con el desarrollo de síntomas y con el movimiento del virus pero en lo bipartitas se desconoce su función.

La organización genómica del *virus Huasteco del chile* (PHV) ilustra las características típicas de los begomovirus bi partitas, en tanto que la del virus del *enrollamiento amarillo de la hoja del tomate* (TYLCV) ejemplifica a la de los monopartitas (Figura 1).

1.2. Replicación de los begomovirus

Los begomovirus replican su genoma en el núcleo de las células vegetales a través de un mecanismo de círculo rodante (CR), usando las DNA polimerasas celulares. La transcripción se realiza por la RNA polimerasa II a partir de la forma replicativa (RF) de doble cadena que se genera por la acción de la maquinaria molecular del hospedero (Gutiérrez, 2000).

La proteína Rep es la única proteína que es esencial para la replicación. Esta proteína inicia la replicación por CR al introducir en la cadena +, un corte ("nick") dentro de la secuencia noamérica TAATATT*AC, universalmente presente en todos lo miembros de este género (Heyraus-Nitschke y col., 1995). El corte genera un grupo 5'fosforil al que la proteína se une covalentemente, y un grupo hidroxilo 3' que presumiblemente sirve como cebador para la síntesis de una nueva cadena viral. Una vez que una copia del genoma viral se ha generado, ésta se libera en una reacción catalizada por la propia proteína Rep, en la que el extremo 5' fijado a la misma se transfiere al nonúmero de la cadena recientemente sintetizada (Laufs y col., 1995).

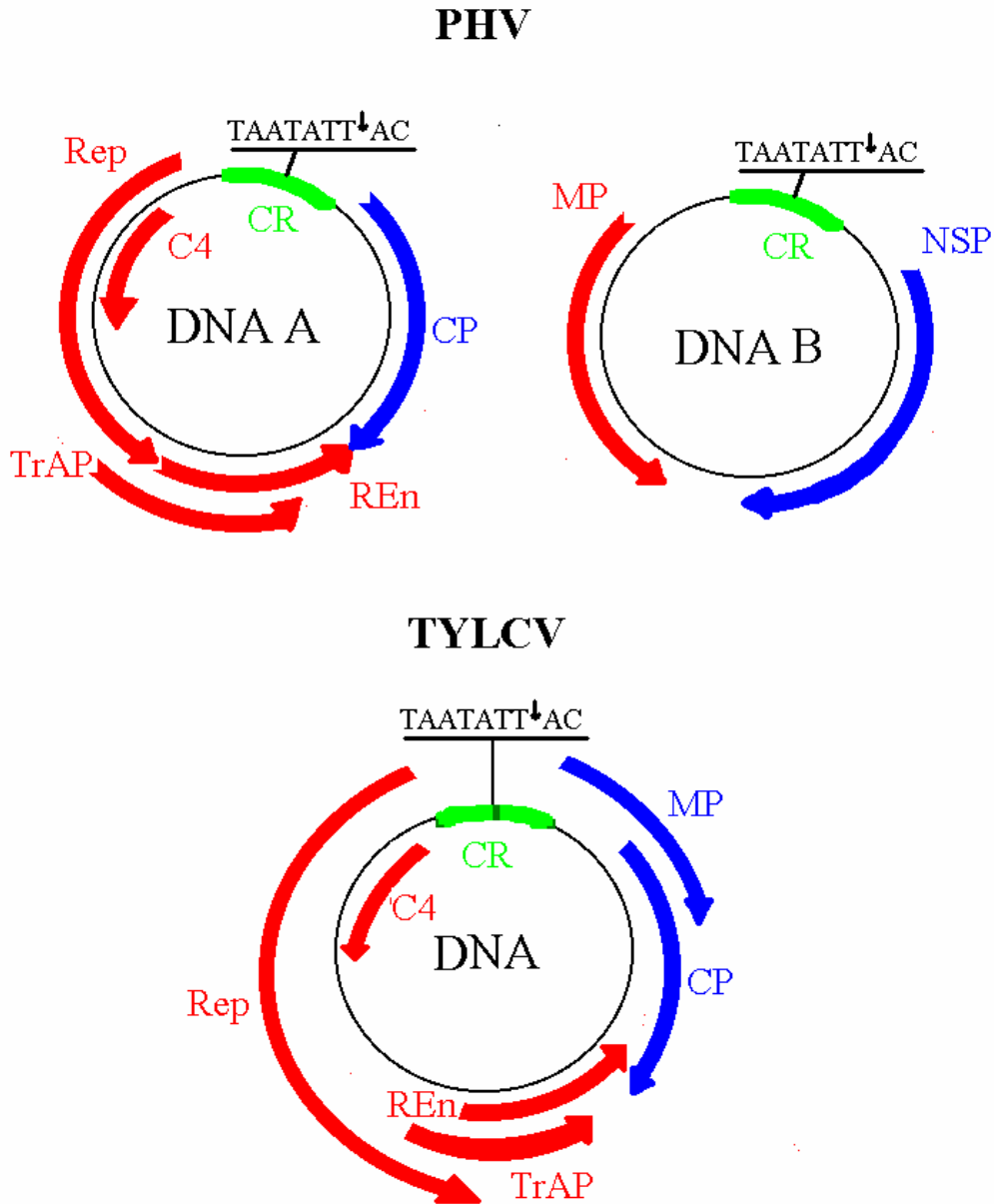


Figura 1. Organización genómica de un begomovirus bipartita típico como el PHV y un monopartita como el TYLCV. Proteínas codificadas: Rep, proteína de replicación; TrAP, proteína activadora de la transcripción; REn, proteína potenciadora de la replicación; CP proteína de la cápside; MP, proteína de movimiento y NSP, proteína de transporte nuclear; C4 proteína que puede ser funcional en monopartitas pero no en bipartitas y CR, región común. La secuencia TAATATTAC es el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante.

1.3. Daños causados por begomovirus a cultivos de jitomate y chile, así como su distribución en América.

Hasta inicios de los años 80(s), los geminivirus transmitidos por la mosquita blanca fueron un problema relativo para la producción de leguminosas en el hemisferio occidental, sin embargo, éstos se han convertido en el principal grupo de patógenos de las hortalizas en el subtrópico y trópico de dicho hemisferio. En aquella época solo existían informes dispersos sobre problemas causados por geminivirus en jitomate, pero actualmente la situación es diferente, pues desde los últimos años de la década de los 80(s), la mayoría de las regiones productoras (Florida, el Caribe, México, América Central, Venezuela y Brasil) de jitomate, chile y cucurbitáceas han sido afectadas por elevadas incidencias de enfermedades causadas por begomovirus y tienen un impacto devastador sobre la producción (Brown, y col., 1995 b).

Estudios completos sobre las pérdidas económicas que originan estas virosis se han realizado en la República Dominicana, en donde se han estimado pérdidas de \$50 millones de dólares en el período de 1988 a 1995 (Álvarez y Antún, 1995). Los daños causados por los begomovirus se consideran en las diferentes regiones productoras de hortalizas como una limitante. En Venezuela la superficie cultivada de jitomate se redujo a un 50% (Polston y Anderson, 1997).

1.3.1. Begomovirus en Estados Unidos de América

En Florida, los begomovirus no fueron considerados un problema para la producción agrícola, hasta la aparición del virus del moteado del tomate (ToMoV) en 1989 (Kring y col., 1991). La producción agrícola en Florida fue supervisada durante más de 40 años, por lo que es poco probable que no se detectara un brote de enfermedades causadas por begomovirus. La mosquita blanca *B. tabaci* ha estado presente en Florida, por lo menos, desde finales de

1800 y se sabe además de la existencia de varias malezas con síntomas del mosaico dorado, desde los años 50(s), las cuales a inicios de 1980 se reconocieron como hospederas de estos virus (Hiebert y col., 1995). Sin embargo, los problemas se iniciaron en 1987, cuando se informó acerca de plantaciones de tomate con altas poblaciones de mosquita blanca y con plantas que expresaban síntomas virales. Posteriormente, al suroeste de Florida, en los cultivos de primavera de 1989, y en los de otoño de ese mismo año, se registró una incidencia elevada de este daño (Kring y col., 1991). Pocos meses después, el agente causal de la enfermedad se identificó como un geminivirus transmitido por mosquita blanca, y en un año, se determinó la secuencia del virus, la cual fue única y correspondió al ToMoV (Abouzid y col., 1992). Aunque se realizaron estudios en un amplio ámbito de hospederas, no se identificaron malezas importantes (McGovern y col., 1994; Polston y col., 1993a). En algunas plantaciones la incidencia de plantas infectadas con ToMoV llegó a 100%, después de varios ciclos de cultivo (Polston y col., 1996; Polston y col., 1993b).

Se considera que el ToMoV se originó en Florida; sin embargo, este virus también se encontró en algunas plantas en Virginia, fue epidémico en Carolina del Sur y Tennessee. Actualmente esta presente en forma endémica en Puerto Rico (Brown y col., 1995a; Hiebert y col., 1995; Polston y col., 1995), y su presencia en este país puede ser resultado del traslado de plántulas de tomate infectadas desde Florida.

Las epidemias causadas por el virus Texano del chile (TPV) en Estados Unidos de América (EUA), ocurrieron por primera vez en Texas en 1987, afectando tanto al jitomate como al chile. En contraste con otras regiones, las epidemias por este virus en esta localidad perduraron pocos años, lo cual no aconteció en el caso del estado de Tamaulipas, al noroeste de México, en donde las epidemias son comunes en las hortalizas antes mencionadas (Torres-Pacheco y col., 1996).

El PHV se detectó afectando al chile en EUA, también desde 1987 (Stenger y col., 1990), y de la misma forma que el TPV, el PHV es capaz de infectar jitomate. Posiblemente, estos virus se encuentren en este cultivo en

Texas, aunque existen pocos informes acerca de epidemias. Una enfermedad que pudo ser causada por el TPV o PHV, se presentó en la primavera de 1997 en jitomate cultivado en invernadero, cerca de Davis, California. Una situación similar ocurrió en Arizona, donde se detectó el TPV en Chile. Aunque ambos virus son capaces de afectar al jitomate, no se han informado de epidemias en Arizona.

1.3.2. Begomovirus en América del Sur

Brasil fue el país de América en el que se reconoció por primera vez a un begomovirus como la causa de una enfermedad del jitomate transmitida por mosquitos blancos. Este virus, conocido como virus del mosaico dorado del jitomate (TGMV), constituye un problema en la producción de jitomate en ese país desde inicios de los años 60 (Flores y col., 1960). En 1975, el TGMV se purificó y se observaron partículas geminales (Matys y col., 1975); y fue uno de los primeros geminivirus cuyo genoma completo fue secuenciado (Hamilton y col., 1984).

Desde 1994, en este país han aparecido varios begomovirus que infectan al jitomate, éstos han sido detectados en todas las localidades en que se examinaron plantas con síntomas de mosaico y amarillamiento (Bezerra y col., 1996; Ribeiro y col., 1994; Zerbini y col., 1996). En el estado de Minas Gerais, se identificaron dos begomovirus bipartitas asociados con los síntomas de mosaico amarillo, su secuencia fue distinta y están relacionados íntimamente con el virus mosaico dorado del frijol (BGMV) de Brasil y el TGMV. Considerando a todos los estados productores donde se han detectado begomovirus afectando al cultivo del jitomate, éstos representan más del 75% de las pérdidas en su producción, tanto de los frutos para procesamiento como para su venta como vegetal fresco.

En Venezuela se identificó por primera vez en la década de los 70(s), una enfermedad del jitomate causada por el virus del mosaico amarillo del tomate (TYMV) (Debrot y Dao, 1963; Lastra y Uzcátegui, 1975; Uzcátegui y Lastra,

1978). Este virus produce en el jitomate un mosaico amarillo brillante característico y constituyó una limitante para la producción de ese cultivo en esa década, debido a que casi el 100% de las plantas examinadas durante la floración mostraron los síntomas característicos del TYMV (Lastra y Uzcátegui, 1975).

En este mismo país, en 1997, una cepa del virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) se identificó en plantas de jitomate con síntomas característicos de virosis (Guzmán y col., 1997). La secuencia de este virus fue distinta a la del PYMV caracterizado en papa en el decenio de los 80(s) (Roberts y col., 1988). La distribución del virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) en el cultivo del jitomate, parece ser amplia y podría continuar expandiéndose. El PYMV se describió por primera vez en papa en 1986, en Venezuela (Coutts y col., 1991, Roberts y col., 1988). En 1992, por primera ocasión, se observaron en la isla de Martinica, en el cultivo del jitomate, plantas con síntomas semejantes a los del virus moteado clorótico (distorsión y rizado de la hoja); y en 1993, estos síntomas aparecieron también en la isla de Guadalupe (Hostachy y Alex, 1993; 1994). En estas islas rápidamente se detectó una alta incidencia de plantas de jitomate sintomáticas y el análisis de las secuencias de los virus detectados en ambas islas reveló que éstas eran idénticas y estaba estrechamente relacionado con el PYMV de Venezuela. El PYMV, con una secuencia prácticamente idéntica a la del virus encontrado en Martinica y Guadalupe, también fue determinado en jitomates sintomáticos en Puerto Rico, Trinidad y Tobago, en donde, durante los últimos años han ocurrido epidemias con alta incidencia de plantas infectadas. No se conoce cómo el PYMV se propagó tan ampliamente y en tantos lugares, y además con tan poca variación del genoma.

1.3.3. Begomovirus en la región del Caribe

En la República Dominicana, en 1992, se detectaron los síntomas correspondientes al virus del enrollamiento foliar amarillo del tomate (TYLCV), (Polston y col., 1994a). El TYLCV se describió por primera vez en 1964 en

Israel, donde continúa siendo el principal factor limitante de la producción de jitomate (Cohen y Antignus, 1994). Probablemente el TYLCV se introdujo, sin saberlo, por un productor de jitomate de la región noroeste de la República Dominicana. Este productor de jitomate en invernadero utilizó un cultivar para consumo fresco que sólo estaba disponible para trasplante en Israel. En 1994, el virus se identificó como TYLCV-Is mediante una prueba de hibridación, PCR y secuenciación parcial del genoma (Nakhla y col., 1994a; Polston y col., 1994a). El TYLCV se identificó más tarde en Jamaica y Cuba (González y Valdés, 1995; McGlashan y col., 1994; Ramos y col., 1996). También se encontró en huertos caseros y en malezas y parece haberse establecido en el agroecosistema del Caribe (González y Valdés 1995; Serra y col., 1995). De igual forma, el TYLCV se disemina de regiones del Caribe al sur de México. Prácticamente el TYLCV es el único ejemplo conocido de un begomovirus introducido del Viejo Mundo al Nuevo Mundo. Todos los otros begomovirus que afectan jitomate y chile, tienen su origen en el Nuevo Mundo.

Hasta 1992 todos los begomovirus que se encontraron infectando jitomate en América eran bipartitas, pero con la introducción del TYLCV al continente esta situación cambió. Este virus monopartita se ha diseminado en los cultivares de jitomate de varios países, incluyendo México (Ascensio-Ibañez y col., 1999).

1.3.4. Begomovirus en México

En México, desde 1970 (Ley-Flores, 1975) se observaron plantas de jitomate con síntomas causados por un virus transmitidos por mosquita blanca, el cual posteriormente se identificó como virus del chino del tomate (CdTV), en el estado de Sinaloa, al noreste de México (Brown y Nelson 1988; Gallegos 1978). En esta región se presentaron epidemias entre 1970 y 1983, y anualmente desde 1988; asociadas a la presencia de altas poblaciones de *B. tabaci* (Brown y Nelson, 1988). Los síntomas del CdTV en jitomate son muy severos comparados con los de la mayoría de los geminivirus y su ámbito de hospederas es amplio (Brown y Nelson 1988). En Sinaloa, el virus se puede

detectar tanto en plantaciones de jitomate como de chile. Este virus también se encontró en otras áreas productoras del país, por ejemplo en los estados de Chiapas, Morelos y Tamaulipas (Torres-Pacheco y col., 1996). Posteriormente se descubrió que el virus del chino del tomate coexiste, con al menos, otros dos begomovirus, el PHV y el TPV.

Las epidemias del TPV ocurren rutinariamente en jitomate y chile en el estado de Tamaulipas, en el noreste de México (Torres-Pacheco y col., 1996). Una raza de este virus se detectó afectando al jitomate en Sinaloa y al chile en otros estados de México (Torres-Pacheco y col., 1996). Las dos cepas varían en distribución geográfica, expresión de síntomas y posiblemente, en el ámbito de hospederos (Stenger y col., 1990; Torres-Pacheco y col., 1996).

El virus PHV tiene una distribución amplia en México y ha sido detectado tanto en chile como en jitomate en los estados de Guanajuato, Quintana Roo, Sinaloa y Tamaulipas. (Torres-Pacheco y col., 1996). Es el begomovirus de mayor incidencia en la región del Golfo de México. Una nueva cepa del PHV se encontró en Sinaloa en cultivos de jitomate (Hou y col., 1996; Torres-Pacheco y col., 1996).

En resumen, los begomovirus que afectan los cultivos de jitomate y chile en nuestro país se encuentran a menudo en infecciones mixtas, y las combinaciones virales cambian entre épocas de producción y localidades.

1.3.5. Begomovirus y nuevo biotipo de *Bemisia tabaci*

A mediados de los años 80(s), los únicos begomovirus identificados como causantes de infecciones en jitomate en América fueron TGMV, TYMV y CdTV, pero justamente cuando apareció un nuevo biotipo de mosquita blanca identificado como biotipo B, comenzaron a surgir en los cultivos de jitomate epidemias causadas por begomovirus en todas las zonas tropicales del continente americano (Brown y col., 1996).

Actualmente, se conoce que existen diferencias biológicas significativas entre poblaciones de *B. tabaci* de diferentes regiones (Bedford y col., 1994; Brown y col., 1995b; Byrne y col., 1990). Aunque no existe información específica para la mayoría de los países de América, parece ser que hasta mediados de los años 80, muchos biotipos de *B. tabaci* se alimentaron y reprodujeron en jitomate y chile en forma muy limitada, minimizando la transmisión de begomovirus hacia y desde plantas de estas hortalizas. No obstante, a mediados de los años 80, un nuevo biotipo o especie de mosquita blanca se introdujo en el hemisferio Occidental, proveniente del Mediterráneo, posiblemente por el traslado de plantas ornamentales infestadas. Aunque esta mosquita no muestra diferencias morfológicas con respecto a los biotipos de *B. tabaci* ya existentes, hay diferencias biológicas significativas. Una de ellas es que la nueva mosquita blanca se alimenta muy bien y se reproduce abundantemente en jitomate y chile (Schuster y col., 1990), y es menos selectiva en sus hospederos. Esta mosquita blanca se designó como el biotipo B, para distinguirla del biotipo A, el cual ya estaba presente en el suroeste de los Estados Unidos antes de la introducción del biotipo B (Brown y col., 1995b).

Después de su introducción, se ha considerado que el biotipo B se ha dispersado en América por el traslado de plantas ornamentales (Brown y col., 1995b). Para finales de los años 80, este biotipo se había establecido y desplazado a las poblaciones nativas de *B. tabaci* en Texas y Florida (Brown y col., 1995b; Schuster y col., 1990). En 1990, una situación similar ocurrió en Arizona y California. El biotipo B fue identificado posteriormente en Antigua, Barbados, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, St. Kitts y Nevis; y en 1990 ó 1991 en México (estado de Quintana Roo) (Brown, 1994). En 1992, éste biotipo se encontró al oeste de México, en Sonora, además en Belice y Nicaragua (Brown, 1995b). En 1993, también se informó de su presencia en casi toda América Central y además se había desplazado a Brasil (Brown y col., 1995b). En 1994, el biotipo B se encontró en Venezuela, y en el norte de México (estados de Sinaloa y Tamaulipas) (Brown,

1994); y recientemente se identificó en Colombia. Esta especie de mosca blanca se dispersó a lo largo del hemisferio y continúa invadiendo nuevas áreas, principalmente en América del Sur. Después de un período de 2 a 5 años de la aparición de este biotipo, surgieron uno o más begomovirus que no se habían registrado anteriormente, lo cual se asocia a la aparición de este transmisor (Polston y Anderson, 1997)

1.4. Identificación de Begomovirus

Aunque al presente se han depositado en el GenBank las secuencias de cerca de 200 geminivirus, en su mayor parte begomovirus, el número de los que aún no se caracterizan se estima en varios cientos, y su diseminación en los campos agrícolas es cada vez más amplia. Ésta se puede explicar por cambios recientes en las condiciones agronómicas, entre ellos el incremento de las poblaciones de insectos vectores, la introducción al continente americano de un nuevo biotipo de mosca blanca, la aparición de vectores con resistencia a insecticidas, cambios en el patrón de cultivos que favorecen la presencia de cultivos susceptibles durante todo el año e impiden que se rompa el ciclo del vector, etc. Sin embargo, una pregunta importante es: ¿de dónde provienen los begomovirus que se están descubriendo continuamente?.. Una posibilidad es que cada región tenga una población endémica desconocida de begomovirus restringidos principalmente a malezas, y sólo recientemente han encontrado las condiciones para invadir cultivos comerciales. La otra alternativa es la introducción interregional de begomovirus. Existen hallazgos que apoyan ambas posibilidades, por un lado, se han caracterizado molecularmente varios begomovirus y se ha verificado que éstos no están presentes en ninguna otra área del mundo. Sin embargo, también se ha observado que algunos de estos begomovirus se han estado diseminando en diferentes áreas, por ejemplo, en nuestro país se ha observado en algunos casos reemplazos en las poblaciones locales de begomovirus. Por ejemplo, PHV fue primero detectado en

Tamaulipas en cultivos de chile, mientras que en Sinaloa los cultivos de jitomate eran afectados por otros virus (chino del tomate). Recientemente se ha detectado a PHV en todas las regiones tomateras de Sinaloa como virus principal en infecciones mixtas. Esto sugiere que PHV se ha adaptado a este cultivo y ha ido desplazando o formando complejos con los virus previamente identificados en Sinaloa. También se debe considerar el surgimiento de variantes virales altamente virulentas (recombinantes) que se originan por la coinfección de plantas con diferentes begomovirus. Esta dinámica compleja torna necesaria la identificación de los nuevos begomovirus presentes tanto en los agroecosistemas como en los ecosistemas naturales.

Se han desarrollado diversos métodos para la identificación de los begomovirus. Una de las primeras y más precisas es la prueba de identificación de cuerpos de inclusión (Christie y col., 1986). Los geminivirus producen grandes inclusiones nucleares, las cuales se tiñen de azul con el colorante Azur A. Estas inclusiones, que son características de los begomovirus, pueden observarse mediante un microscopio de luz. El tejido de tomate es relativamente fácil de procesar, y se producen numerosas inclusiones en tejido foliar y flores infectadas, no obstante, una limitante es que se requiere experiencia para su reconocimiento. Se han producido anticuerpos policlonales y monoclonales contra la proteína de la cápside de diversos begomovirus, los cuales se utilizan en pruebas de detección y diferenciación de los mismos (Cancino y col., 1995; Givord y col., 1994). La selección de anticuerpos puede determinar la especificidad de la prueba y puede ser utilizado para detectar una amplia gama de especies y variantes begomovirales.

Otros métodos comúnmente usados se basan en la detección del ácido nucleico de los begomovirus más que en la proteína de la cápside. Los métodos de hibridación usan el ADN viral clonado y marcado con una sustancia reveladora (i.e., biotina, ³²P, digoxigenina) que hibrida con el ADN viral "blanco" que se encuentra unido covalentemente a una membrana de nylon. La

especificidad de estos métodos puede ser controlada mediante la selección del ADN utilizado como “sonda” y las condiciones de temperatura y fuerza iónica utilizadas en el proceso de hibridación y lavado de las membranas.

Una poderosa técnica desarrollada a fines de los 80(s), es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ésta utiliza sólo pequeñas cantidades de tejido infectado fresco, desecado o liofilizado, y es extremadamente sensible. Su especificidad depende de oligonucleótidos sintéticos que funcionan como “iniciadores” (“primers”) y de las condiciones de temperatura y concentración de iones Mg^{2+} utilizados en el proceso de amplificación. La identificación de las especies virales se realiza principalmente por secuenciación parcial o total del genoma, pero se carece de un método general para la diferenciación preliminar de las variantes (“aislados” o “razas”) de un virus. Existen dos regiones del genoma del componente A que son de interés particular para estudios de taxonomía: el gen de la proteína de la cápside (CP) y la región intergénica. Dos son los métodos basados en PCR más comúnmente utilizados para el escrutinio de múltiples muestras. El primero consiste en la amplificación de una región de 576 pb del gen que codifica la proteína de la cápside (método de Wyatt y Brown, 1996) pero este método presenta las siguientes limitaciones:

- La región amplificada está muy conservada entre los begomovirus y por consiguiente no proporciona suficiente información sobre la identidad del virus.
- El tamaño del producto de PCR es prácticamente el mismo para todos los begomovirus conocidos, sin importar su origen geográfico. Por lo tanto, no se obtiene información preliminar de la diversidad viral en muestras de una región dada.
- Todos los productos de PCR deben ser secuenciados para la identificación preliminar del virus.

El segundo método de amplio uso fue establecido por Rojas y col., (1993), quienes diseñaron un juego de iniciadores universales degenerados, basándose en regiones altamente conservadas identificadas en el componente A. Estos

oligos amplifican un fragmento que comprende parte del gen *Rep*, la IR y una porción del gen *CP*. Además, el uso del juego de iniciadores en antisentido permite la amplificación de dos grandes regiones genómicas, que juntas cubren la totalidad del genoma A de los begomovirus.

Las ventajas de este método son:

- Tiene una aplicación general para la amplificación del componente A de los begomovirus originarios de ambos hemisferios, los cuales se pueden distinguir porque los begomovirus del Nuevo Mundo amplifican un fragmento de 1.1kb, en tanto que para los del Viejo Mundo el tamaño es de 1.3 kb.
- Los productos de PCR obtenidos se pueden someter a un análisis de restricción enzimática (RFLP), lo cual permite la caracterización de los begomovirus y la demostración de infecciones mixtas en una planta sintomática. Sin embargo, los autores del método no definieron un conjunto de enzimas de restricción apropiadas para obtener patrones característicos para cada begomovirus.

Algunas limitaciones del método son las siguientes:

- El tamaño de la región amplificada no contribuye con información preliminar sobre la variabilidad entre los begomovirus originarios de un mismo hemisferio.
- La identidad viral solo se puede establecer por clonación y secuenciación de la región o regiones amplificadas.
- Las dos grande regiones genómicas amplificadas, no se sobrelapan, lo cual puede dar origen a errores cuando coexisten dos o más begomovirus en una planta, ya que puede reconstruirse un genoma A inexistente a partir de segmentos genómicos de begomovirus distintos.

De lo expuesto en la sección precedente, se hace evidente la necesidad de desarrollar nuevos y mejores métodos moleculares de diagnóstico e identificación de begomovirus, los cuales deberán reunir, idealmente, características como las siguientes:

- a) Que se basen en el uso de iniciadores universales, para hacer factible la amplificación de la mayor parte de los begomovirus conocidos, y también la de muchos otros aún sin descubrir, diseminados en todos los continentes del mundo.

- b) Que el método haga posible un diagnóstico rápido y a bajo costo, y que incluya estrategias que reduzcan la necesidad de secuenciar los productos amplificados, lo cual es especialmente importante cuando se analiza un gran número de muestras.

- c) Que las secuencias virales amplificadas proporcionen información suficiente para la identificación preliminar del virus presente en los tejidos infectados.

- d) Que al menos algunos de los productos de PCR puedan ser utilizados para otros fines, además de la identificación del patógeno; por ejemplo, como fuente de secuencias con uso potencial en biotecnología vegetal (v.gr. promotores, terminadores transcripcionales, orígenes de replicación, etc.). De esta manera, se le daría un valor científico agregado a los productos del método, que usualmente tienen un valor restringido al diagnóstico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una metodología basada en la técnica de la PCR, que haga posible la identificación rápida y precisa de begomovirus, así como la recuperación del genoma A completo de cualquier begomovirus, sin importar su origen geográfico. Y como instrumento diagnóstico, el método debe superar a otros ya existentes, en términos de sensibilidad, rapidez, precisión, bajos costos y economía de labor humana por muestra.

Objetivos específicos

- 1) Diseñar oligonucleótidos sintéticos que funcionen como iniciadores “universales” para la amplificación de diferentes regiones genómicas de los begomovirus.
- 2) Examinar experimentalmente la utilidad de los nuevos oligonucleótidos para la amplificación de una variedad de begomovirus, tanto de América como del Viejo Mundo.
- 3) Establecer una estrategia para la identificación preliminar de estos virus basada en el tratamiento de productos de amplificación con enzimas de restricción específicas (identificación por PCR/ RFLPs).
- 4) Realizar la amplificación e identificación de begomovirus presentes en muestras de campo por medio de la metodología desarrollada.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de Oligonucleótidos Universales

Los oligonucleótidos (“primers”) que se utilizaron en el presente trabajo fueron diseñados en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT, bajo la dirección del Dr. Argüello Astorga, con la excepción de los denominados “Rep-WAR” y “Rep-WAR rev” denominados formalmente PAL1v1978 y PAR1c496 que corresponden a dos de los iniciadores de Rojas y col., (1993). Para el diseño de los iniciadores universales se alinearon las secuencias del genoma A de más de 100 begomovirus, se identificaron bloques de secuencia nucleotídica altamente conservadas, y se determinó la secuencia consenso de los bloques mayores a 15 nt. para definir las características de los oligonucleótidos susceptibles de uso como “primers” universales. Se tomaron en cuenta parámetros como las temperaturas de alineamiento similares para evitar formar dímeros o estructuras secundarias. A cada uno de ellos se le adicionó un sitio de restricción para que los productos amplificados por PCR se pudiesen insertar en vectores de clonación convencionales. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen.

2.2. Begomovirus

Para el ensayo preliminar de todos los juegos de iniciadores, se empleó el componente A (clonado en diversos plásmidos) de begomovirus de diferentes orígenes geográficos y representativos de América, Europa y África como: PHV (*virus Huasteco del chile*), PYMV-Gpe (*virus del mosaico amarillo de la papa*), TYLCV (*virus del enchinamiento amarillo de la hoja del tomate*), ACMV (*virus africano del mosaico de la yuca*), ToMoV (*virus del moteado del tomate*) y TToMoV (*virus taino del moteado del tomate*), y TPV (*virus Texano del chile*); adicionalmente, se utilizó una región genómica de dos begomovirus

parcialmente caracterizados, IpoGV (geminivirus de Ipomoea) y OYMV (*virus del moteado amarillo* de la okra),

2.3. Extracción de ADN

Se probaron diferentes protocolos de extracción de ADN genómico y se adoptó finalmente un método único para las muestras de tejido vegetal (principalmente chile y jitomate). Este se basó en el método utilizado por Green y Thompson (1999) que no utiliza nitrógeno líquido y consiste en moler 0.5 g de tejido con 2ml del buffer de extracción CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) compuesto por Tris 100 mM- pH 8.0, NaCl 1.4M, EDTA 50mM- pH8.0, CTAB 2.5%, polivinilpirrolidona 1% y 2-mercaptoetanol 0.2%. Se llevó a cabo el protocolo indicado en el Cuadro 3.

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para todos los juegos de oligonucleótidos, la composición de la mezcla de reacción para PCR (50 μ L volumen total) fue la misma y consistió en: Buffer *Taq* DNA polimerasa 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1 μ M, *Taq* polimerasa 2.5 UT, DNA 1 μ g. Con excepción del juego de oligonucleótidos YMAC For-YMAC Rev, las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94°C/2min, y 35 ciclos conformados por 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min, con una extensión final de 72°C/7min. Para los YMAC For-YMAC Rev el único cambio en las condiciones fue el tiempo de extensión (72°C/3min) debido a que los productos de PCR son más largos. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1- 1.5%.

Cuadro 3. Protocolo de extracción de ADN-modificación del método de Green y Thompson (1999).

1. Incubar 500µl del homogeneizado a 65 °C /30min
2. Centrifugar a 13,000 rpm/5 min
3. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio, adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 13,000 rpm / 10min
4. Separar la fase acuosa y volver a adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 13,000 rpm / 10min
5. Pasar la fase acuosa a un tubo de eppendorf limpio y agregar 2 µl de RNAasa 25µM e incubar a 37°C/30 min
6. Precipitar el ADN con un volumen igual de alcohol isoamílico e incubar en hielo por 5min
7. Centrifugar a 13,000 rpm/10min y eliminar el sobrenadante
8. Lavar la pastilla con 450µl de etanol al 70%
9. Centrifugar a 13,000 rpm/2min y eliminar el sobrenadante
10. Secar al aire y resuspender en 40µl de TE (Tris. HCl 10mM y EDTA 1mM) pH 8.0

2.5. PCR anidado

Algunos de los juegos de oligonucleótidos llegan a amplificar una cantidad baja de ADN viral, la cual se puede incrementar con una reacción de PCR anidado; dicha reacción además asegura la especificidad para la región de ADN amplificada. En nuestro trabajo los juegos de oligonucleótidos que se diseñaron se pueden utilizar para realizar PCR(s) anidados. Con el juego de oligonucleótidos denominados YMAC For-YMAC Rev se puede amplificar todo el genoma del componente A de un begomovirus, ya sea en forma directa o por

PCR anidado, en esta última situación, estos oligonucleótidos funcionan como oligonucleótidos externos en combinación con todos los juegos de oligonucleótidos aquí utilizados.

Para analizar los diferentes tamaños del ADN de la región Rep Mot 1/ CPc70 para los diversos begomovirus, se amplificó dicha región por PCR anidado utilizando para la primera reacción los oligonucleótidos Rep DGRSAR/pCP c70 y en la segunda Rep-Mot /pCP c70

2.6. Caracterización de la región Rep Mot 1/CPc70 por patrón de restricción (RFLP)

Además de la diferenciación de los begomovirus por el tamaño de la banda de ADN correspondiente al fragmento Rep Mot 1/ CP-c70, éstos se pueden distinguir e identificar también por el patrón obtenido con enzimas de restricción específicas. Primero se analizó esta parte del genoma A para una gran cantidad de begomovirus utilizando el programa Mapdraw (DNASTar), en relación a sitios de corte para enzimas de restricción que poseen sitios múltiples de reconocimiento dentro de esa región viral, y que por lo tanto pueden generar patrones complejos y distintivos. Para ensayos preliminares se seleccionaron las enzimas *Ssp1*, *EcoNI109*, *Msp1* y *Hha1*. Las enzimas seleccionadas, tomando en cuenta también su menor costo fueron *Msp1* y *Hha 1*. Considerando la amplia distribución de PHV en México, y su variabilidad genética, se eligieron también las enzimas *Hind III* y *Hinc II* para caracterizar algunas variantes de este virus. Los productos digeridos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2.5%. Las enzimas fueron de New England BioLabs.

2.7. Clonación y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos de las muestras de campo se purificaron con el kit comercial QIQquick PCR purification kit de QIAGEN, según las indicaciones del proveedor. La ligación se efectuó en pBS (pBluescript II SK +,

vector de clonación de Stratagene, Inc). La transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 se realizó por choque térmico y las transformantes fueron seleccionadas en base al color de las colonias (blancas / azules) en medio de LB/ampicilina/IPTG/X-gal. La extracción del ADN plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento modificado de Birnboim (Sambrook y Russell, 2001). Los productos clonados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del CINVESTAV, Irapuato, y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST y el método Clustal (MegAlign, DNA Star software, Madison, WI).

III. RESULTADOS

3.1. Diseño y síntesis de “iniciadores” universales.

Se diseñaron ocho oligonucleótidos degenerados flanqueados por distintos sitios de restricción. Estos se alinean en las diferentes regiones altamente conservadas que se identificaron en el gen Rep y en el gen CP de una gran cantidad de begomovirus originarios de varios continentes, incluyendo a begomovirus representativos de América, de Asia, de Europa, de África y Australia. Los iniciadores fueron designados, por lo general, por una secuencia de aminoácidos corta y característica que es codificada por la secuencia de DNA correspondiente a los oligonucleótidos (v.gr: YMAC, DGRS, etc.), así como por el sentido del iniciador con respecto a la dirección de replicación del virus, que se indica con los identificadores “For” y “Rev” (Cuadro 4). Los dominios DGRSAR y WAR se ubican en el gen Rep y el YMAC en el gen que codifica la proteína de la cápside.

En la Figura 2 se muestra la región del genoma A que se puede amplificar con las diversas combinaciones de los oligos diseñados; el tamaño indicado corresponde al componente A del PHV, el cual se tomó como entidad de referencia para predecir dicho tamaño. Como se puede apreciar, con estos iniciadores sintéticos se amplifican regiones que incluyen en forma total o parcial la secuencia de los genes Rep, Trap, REn, CP, la región intergénica (IR); así como la secuencia completa del componente A en un solo producto o en varios fragmentos superpuestos.

Los oligos Rep-Mot y pCPc70 son de gran importancia, debido a que con ellos se amplifica la región del IRD-IR-CP70. Esta región genómica es la que proporciona, en la menor extensión de secuencia, la máxima información sobre la identidad de un begomovirus. La selección de esta región de aproximadamente 630 pb para identificar a los begomovirus se basó también en el análisis que se realizó del componente A de más de 100 virus pertenecientes a este género, originarios de América y del Viejo Mundo. Dicha región

comprende el segmento IRD del gen Rep, la región intergénica y un segmento de 70 codones del gen CP. La región Rep-IRD es un segmento de 10 codones

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores universales para amplificar el ADN-A de Begomovirus.

Oligonucleótido orientación V (sentido del virion)	Secuencia
Rep-Mot (Xbal)	<u>GAGTCTAGAT</u> GGATANGTDAGGAAATARTTCTTRGC
Rep-DGRSAR (Xbal)	<u>GAGTCTAGAT</u> GCTGACCTCCTCTAGCWGATCTGCCGTC
Rep-WAR (XhoI)	<u>AGAGCTCGAG</u> CCACATYGTCTTYCCNGT
YMAC-For (EcoRI)	<u>CGTGAATTC</u> TTATTGTAYATGGCRTGTACDCATGC
CP70-Rev (<i>Hind</i> III)	<u>GCGAAGCTT</u> GGTTGTGAAGGNCCNTGTAAGGTYCA
Oligonucleótido orientación C (sentido de la cadena complementaria)	Secuencia
pCPc70-Eco RI	<u>CGCGAATTC</u> GATTGRACCTTACANGGNCCTTCACAACC
pCP-XbaI-GUS	<u>GAGTCTAGA</u> ACGCCATGGRGCATCNCGCTTAGSCAT
Rep-DGRSAR-Rev (Xbal)	<u>GAGTCTAGAC</u> GGCAGATCWGCTAGAGGAGG
Rep-WAR-Rev (Xbal)	<u>GAGTCTAGAC</u> NGGRAAGACRATGTGGGC
YMAC-Rev (Xbal)	<u>GAGTCTAGAG</u> GRRTAGARGCATGHGTACATGCCAT

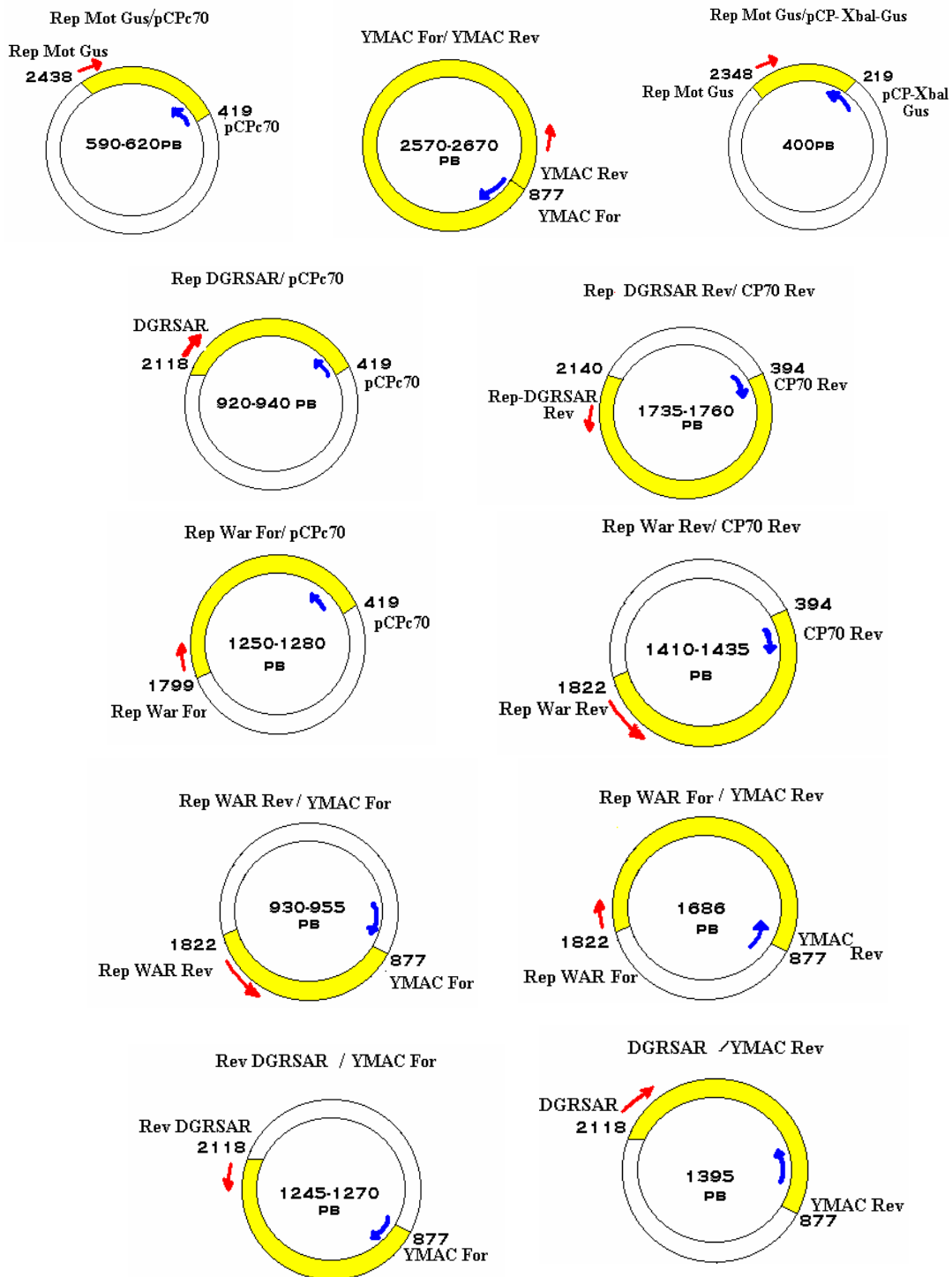


Figura 2 Oligonucleótidos universales degenerados y las diferentes regiones del componente A de los begomovirus que se pueden amplificar con ellos. Para cada juego se indica la posición de alineamiento tomando como referencia al PHV.

altamente variable y se conocen al menos 30 variantes. La región intergénica es la región del genoma viral más variable en secuencia nucleotídica (Padidam y col., 1995) y la región CP-c70 es el segmento del gen CP que presenta el mayor nivel de variabilidad entre los begomovirus. En el caso de los begomovirus de América dicha región tiene un tamaño que va de los 570 a los 610 pb, y para los del Viejo Mundo oscila entre 690 a 750 pb (Figura 3).

Con el juego de oligos Rep-MotGus /CP-X-Gus se amplifica la región intergénica y por ende se obtiene un producto que contiene los dos promotores divergentes, *CP* y *Rep*, los cuales pueden ser de gran utilidad en biotecnología, y con los oligonucleótidos YMAC-For e YMAC-Rev se puede amplificar todo el genoma A de un begomovirus, ya sea en forma directa o por PCR anidado; en este último caso, esos iniciadores funcionan como los más externos, en combinación con los demás juegos de oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Figura 4).

3.2. Evaluación de los juegos de iniciadores para la amplificación de diferentes regiones del ADN-A de los begomovirus

Los diferentes juegos de nuevos iniciadores se ensayaron con begomovirus de diferentes regiones de América (PHV; PYMV-Gpe, ToMoV, ToMoTV, IpoYMV), así como con dos representativos del Viejo Mundo (TYLCV y ACMV).

Con excepción del juego de oligonucleótidos YMAC-For/ YMAC-Rev, todos los juegos de oligonucleótidos probados (Cuadro 4) amplificaron la región del ADN-A de los begomovirus con los que se efectuó el ensayo, lo cual demostró la versatilidad de los nuevos iniciadores, y se observó que el tamaño de cada región varía dependiendo del tamaño del componente A de cada begomovirus, (Figura 5). Los oligos que dieron los resultados más consistentes fueron los juegos Rep DGRSA/ pCp70 y RepMot-GUS/ pCP-GUS. En el caso de los iniciadores YMAC For/YMAC-Rev, a pesar de que la banda de ADN rara vez llegó a ser visible en los geles, se constató que hubo amplificación al utilizar el producto del PCR obtenido como templado para un segundo PCR (anidado) con

diferentes juegos de oligonucleótidos y observar en gel la banda de ADN del tamaño esperado (Figura 6).

Región Rep- Mot1/CP-c70

Begomovirus de América (540-610 nt)



Begomovirus del Viejo Mundo (690-750 nt)



Figura 3 El tamaño variable amplificado por PCR de la región Rep-Mot1/CP c70, permite diferenciar a los begomovirus, distinguiéndose por su origen geográfico a dos grandes grupos: begomovirus del viejo mundo y begomovirus de América. IRD (segmento de 10 codones en el extremo “N” del gen Rep). Gen CP (segmento de 70 codones del gen de la proteína de la cápside). Gen MP (gen que codifica la proteína de movimiento en los begomovirus del viejo mundo).

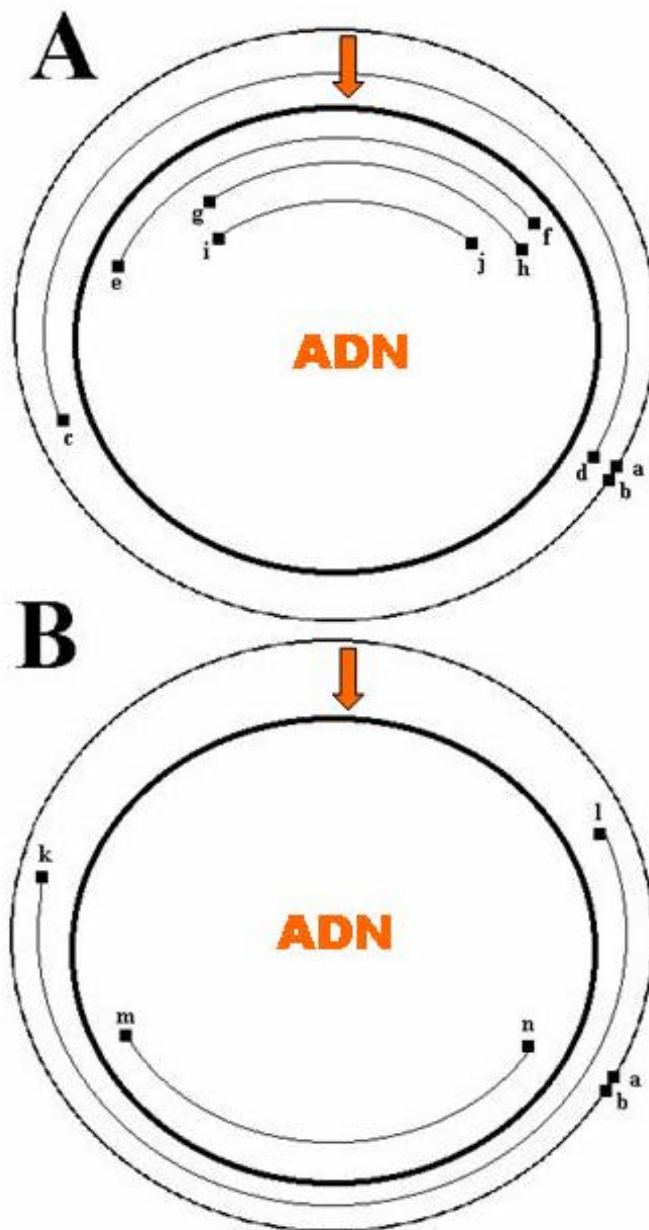


Figura 4. Regiones del ADN-A que se pueden amplificar por PCR anidado. El círculo grueso representa el ADN-A, la flecha el origen de replicación y las líneas delgadas la región amplificada por los juegos de oligonucleótidos externos e internos: A) a-b: YMAC-rev/YMAC-for; c-d: RepWAR-for/ YMAC-rev; e-f: Rep DGRS/pCPc70; g-h: Rep-Mot/pCPc70; i-j: RepMot/pCP-X-Gus. B) a-b: YMAC-rev/YMAC-for; k-l; DGRS-rev/CP70-rev; m-n: Rep WAR -rev/YMAC-for.

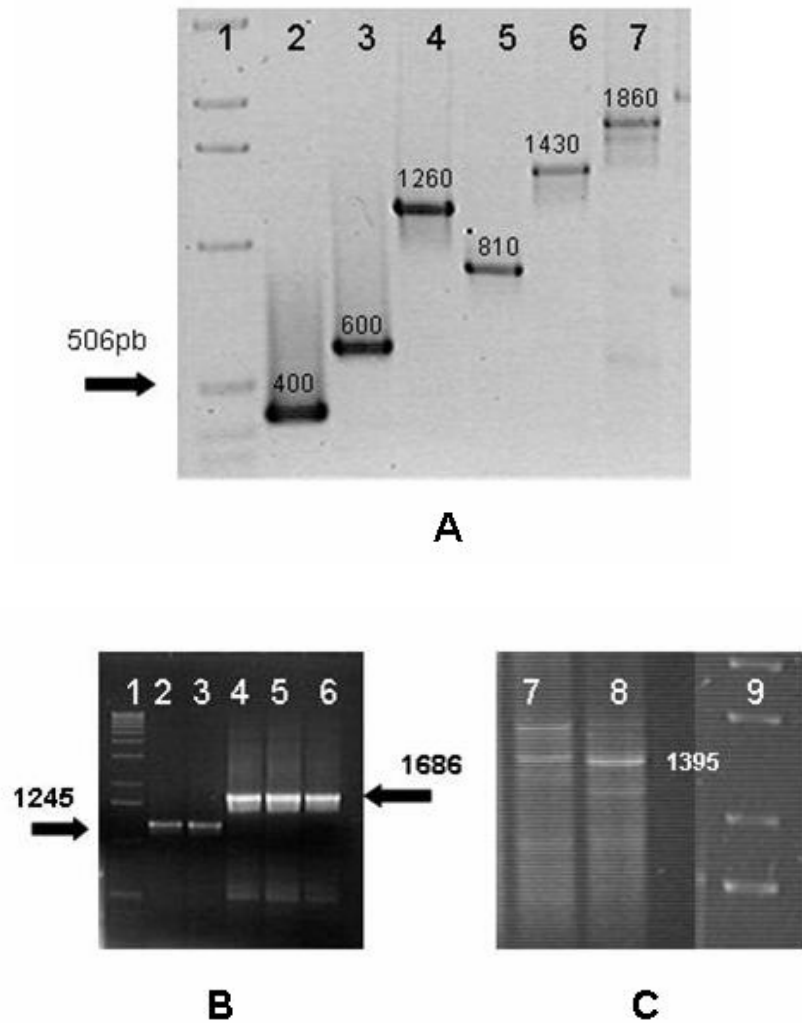


Figura 5. Amplificación de diversas regiones del ADN-A, con los diferentes juegos de oligonucleótidos ensayados. **A)** 1 Marcador de peso molecular 1Kb, 2) Rep-MotGus/pCP-X-Gus (*PHV*), 3) Rep-MotGus/pCPc70 (*IpoYMV*), 4) Rep WAR-for/ pCP c70- (*PYMV*), 5) Rep-DGRS/pCP c70- (*PYMV*), 6) Rep WAR Rev/Cp70 Rev (*TYLCV*); 7) Rep DGRS Rev/CP70 Rev (*TYLCV*). **B)** 1 Marcador Molecular 1Kb, 2) DGRS-rev/YMAC-for (*PHV*), 3) Rev DGRS/YMAC-for (*PYMV*), 4) Rep WAR For/YMAC-rev (*PHV*), 5) Rep WAR-for/YMAC-rev (*PYMV*), 6) WAR-for/YMAC-rev (*TToMoV*). **C)** 7) Rep DGRS/YMAC-rev (*PHV*), 8) Rep DGRS/YMAC-rev (*TToMoV*), 9) Marcador Molecular 1Kb

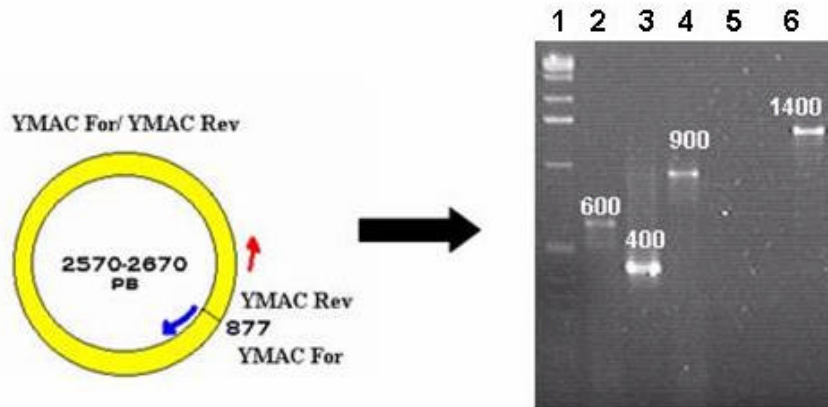


Figura 6. Diferentes regiones del ADN-A de PHV amplificadas por PCR anidado a partir del producto obtenido en la primera etapa de amplificación con los oligonucleótidos YMAC-for/YMAC-rev ((los cuales amplifican el genoma completo) con los siguientes juegos de iniciadores: 2) Rep-MotGus/pCPc70 (**600** pb), 3) Rep-MotGus/pCP-X-Gus (**400** pb), 4) RepDGRS/pCPc70 (**900** pb), 6) Rep-WAR rev/ Cp70 rev (**1400** pb). Carril 1: marcador de peso molecular (1Kb).

De acuerdo a lo predicho para la región Rep Mot 1/ CP-c70, los productos de PCR derivados tanto de los begomovirus clonados, como de extractos de plantas con síntomas virales, exhibieron variaciones en el tamaño de dicha región, lo cuales fueron visualizados por su movilidad electroforética relativa. Los begomovirus del Viejo Mundo fueron identificados fácilmente porque la banda de ADN para esta región es aproximadamente de 700 pb o mayor. (Figura 7). Los tamaños calculados para dicha región, considerando el tamaño del componente A de cada begomovirus, se presentan en el Cuadro 5. Como se puede apreciar en la figura 7, éstos coincidieron con los amplificados con los iniciadores Rep-Mot/ pCPc70.

Cuadro 5. Tamaño de la región Rep Mot 1/ CP-c70 de los begomovirus que se utilizaron en este trabajo

Begomovirus	Tamaño (pb) región Rep Mot 1/ CP-c70
PHV	616
PYMV-Gpe	580
TYLCV	754
ACMV	700
IpoYMV	595
ToMoTV	582
OYMV	593
ToMoV	586

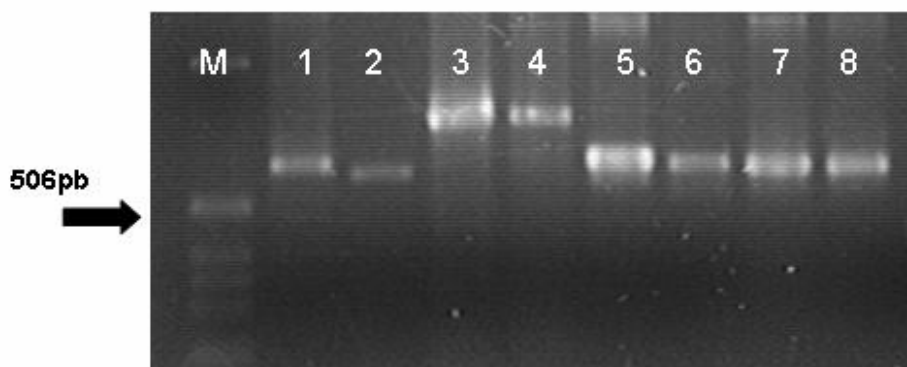


Figura 7. Tamaño variable de los productos de amplificación de la región Rep-Mot 1/CP c70 de los siguientes begomovirus: 1. PHV; 2. PYMV-Gpe; 3.TYLCV; 4. ACMV; 5. IpoYMV; 6. TToMoV; 7 y 8. Dos begomovirus (A y B) detectados en una muestra de girasol.

3.3. Caracterización de begomovirus por patrones de restricción.

Después de ensayar en forma preliminar la enzimas de restricción *Ssp1*, *Eco No109*, *Msp1* y *Hha1*, y analizar teórica y experimentalmente los patrones de restricción que se obtuvieron de la región Rep Mot 1/ CP-c70 de los siguientes virus: PHV, PYMV-Gpe, TYLCV, ACMV, IpoYMV, TToMoV, OYMV y ToMoV; se observó que los patrones generados con la combinación de las enzimas *Msp 1* y *Hha 1*, fueron característicos y diferenciales para cada uno de los begomovirus antes mencionados, por lo cual se adoptaron como modelo para este ensayo (Figura 8).

El número de fragmentos y el tamaño de los mismos coincidieron con los calculados teóricamente (Cuadro 6). La Figura 9 ilustra el tamaño de la región Rep- Mot1/ CP-c70 y el patrón de restricción diferencial que distingue a dos begomovirus representativos del Nuevo Mundo (PHV y PYMV), en comparación con los obtenidos para el TYLCV y el ACMV, que pertenecen al Viejo Mundo.

Cuadro 6. Número y tamaño de bandas obtenidas por digestión de la región Rep Mot 1/ CP-c70 de los diferentes begomovirus utilizados en este trabajo, con las enzimas *Msp I* y *Hha I*.

Begomovirus	<i>Msp I</i>	<i>Hha I</i>
PHV 616	352, 195, 44, 25	No tiene sitio
PYMV-Gpe 580	317, 203, 60	271, 215, 94
TYLCV 754	536, 218	529, 230
ACMV 700	500, 200	400, 220, 80
IpoYMV 595	215, 203, 89, 88	287, 185, 100, 23
OYMV 593	343, 192, 53	306, 104, 100, 83
TToMoV 582	320, 202	214, 202, 166
ToMoV	282, 214, 90	360, 226

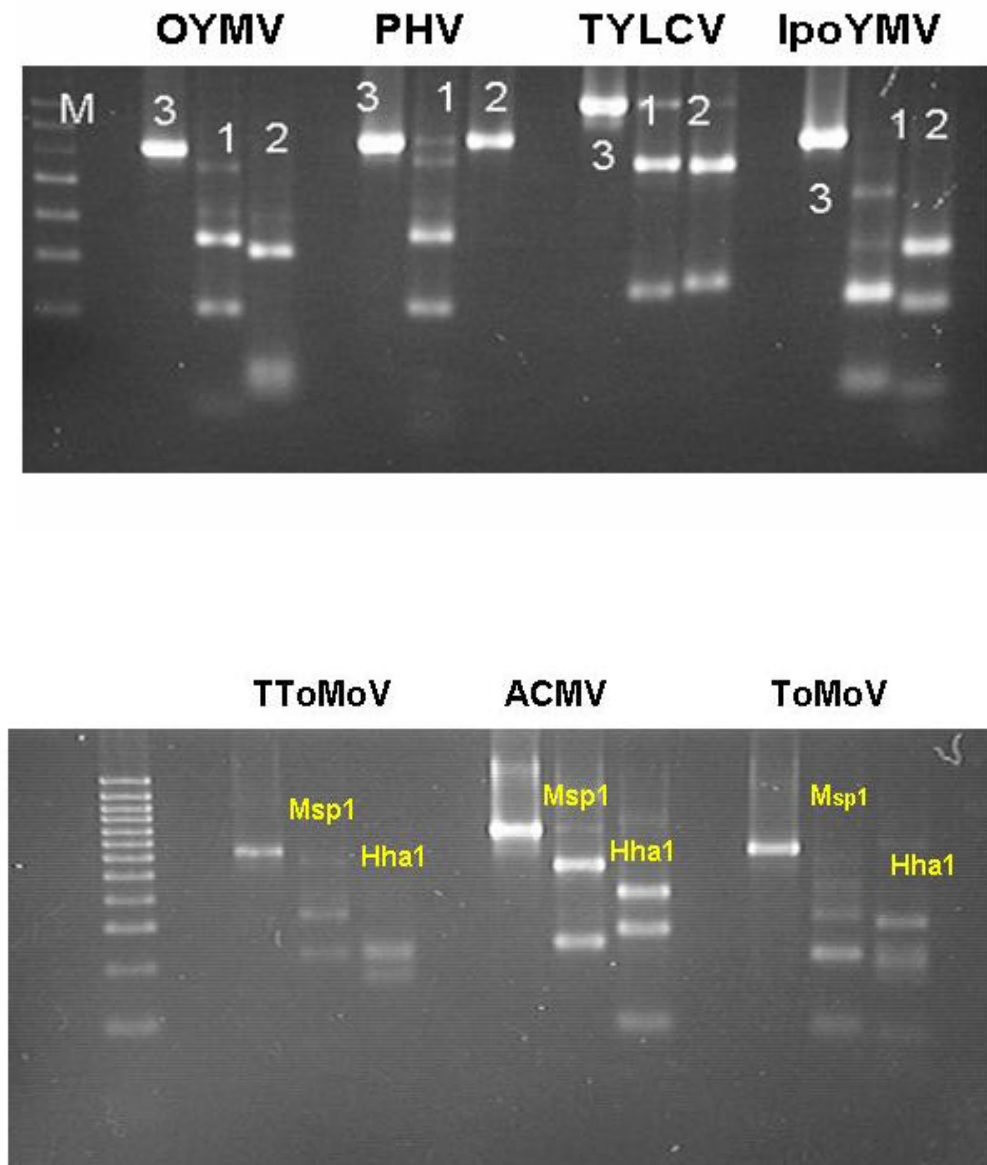


Figura 8. Patrón de restricción de la región Rep-Mot1/CP c70 obtenido con las enzimas de restricción 1) *Msp* I y 2) *Hha* I, el cual caracteriza la identidad de siete begomovirus. OYMV (*virus del mosaico y amarillamiento de la okra*) PHV (*virus Huasteco del chile*), TYLCV (*virus del enchinamiento y amarillamiento de la hoja del tomate*), IpoYMV (*virus del mosaico y amarillamiento de Ipomea*), TToMoV (*virus taino del moteado del tomate*), ACMV (*virus africano del mosaico de la yuca*) y ToMoV (*virus del moteado del tomate*). 3) ADN sin digerir. M) Marcador molecular de 100 pb

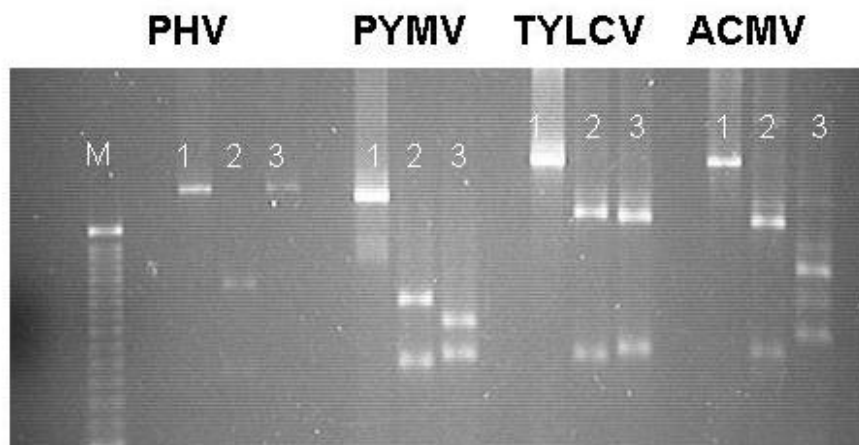


Figura 9. Patrón de restricción diferencial de dos begomovirus originarios de América (PHV y PYMV) y dos begomovirus del Viejo Mundo (TYLCV y ACMV), obtenido de la región Rep-Mot1/CP c70 con las enzimas 2) *Msp*I, 3) *Hha*I, 1) ADN sin digerir, M) Marcador molecular de 25 pb.

3.4. Identificación de begomovirus en muestras vegetales por PCR-RFLP y secuenciación

El método de detección de begomovirus por PCR con los oligos Rep-Mot/pCPc70 y diferenciación por patrón de restricción con las enzima *Msp*I y *Hha*I, se aplicó a muestras de plantas de jitomate, chile y girasol que manifestaban síntomas virales característicos de begomovirus. La procedencia de estas muestras fue: Jalisco (jitomate y chile), Campeche (chile), Sinaloa (girasol) y San Luis Potosí (chile). En el caso de las muestras de Jalisco, éstas se obtuvieron de las áreas productoras de Atoyac y Sayula. En la Figura 10 se puede apreciar que la sintomatología es diferente para las plantas de jitomate y chile. En el follaje del jitomate se expresa clorosis difusa, y clorosis intervenal, en tanto que en chile se distingue clorosis difusa, ligero amarillamiento, epinastia y enrollamiento. La incidencia en cada cultivo para esta localidad fue

aproximadamente del 50% y las pérdidas económicas también fueron de ese orden. En relación a las muestras de San Luis Potosí (SLP), Campeche y Sinaloa, la incidencia y los daños fueron menores.

Se obtuvo el patrón de restricción con las enzimas *Msp*1, *Hha*1, *Hind* III y *Hinc* II, de la región Rep Mot1/ CP-c70 amplificada para las muestras de girasol y chile de SLP. Con este método, en la muestra de girasol se pudo detectar una infección por dos begomovirus no identificados en este trabajo, los cuales se pudieron diferenciar por sus patrones de restricción disímiles (Figura 11). En la muestra de chile-SLP se identificó a PHV en base al patrón de restricción caracterizado por no poseer sitio de corte para *Hha* 1 y el número y tamaño de las bandas obtenidas con *Msp* 1, y se puede inferir que puede corresponder al PHV de la cepa "Tamaulipas" por la banda de 300 pb, aproximadamente, obtenido por digestión con la enzima *Hind* III, lo cual se debe a la ubicación característica del sitio de corte para esta enzima (Figura 12). Este método con fundamento en el patrón de restricción permite evaluar la diversidad de begomovirus presentes en un agroecosistema, distinguir nuevos begomovirus y diagnosticar infecciones múltiples en una planta, de una forma rápida y simple.



A



B

Figura 10. Sintomatología característica de begomovirus A) Clorosis difusa e intervenal que expresan las plantas de jitomate. B) Planta de chile con clorosis difusa, epinastia y enrollamiento. Ambas muestras procedentes de Jalisco.

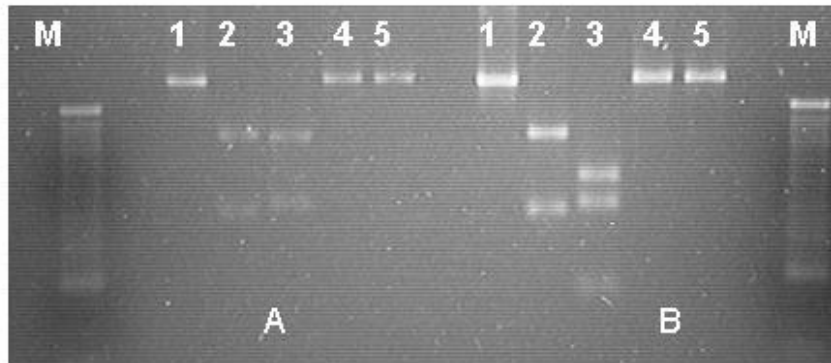


Figura 11. Diferenciación de dos begomovirus (A y B) en una muestra de girasol por el patrón de restricción de la región Rep-Mot1/CP c70 con las enzimas *Msp*I (carril 2), *Hha*I (3), *Hind*III (4), *Hinc*II (5). El ADN sin digerir está en el carril 1. M= Marcador de peso molecular 25 pb.

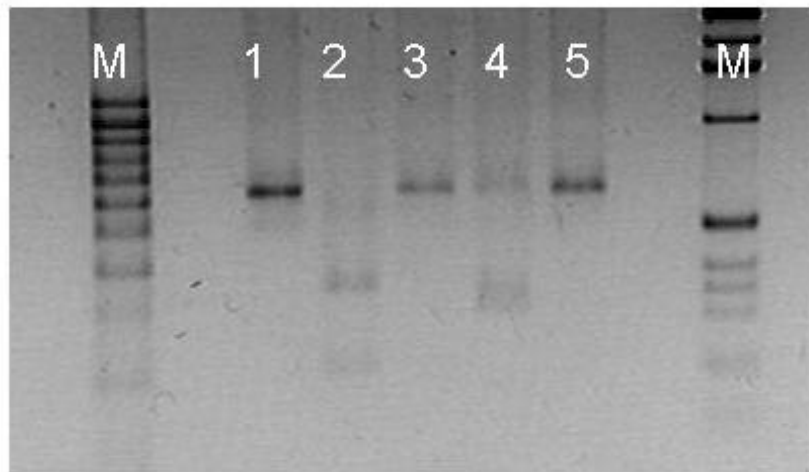


Figura 12. Patrón de restricción obtenido con las enzimas *Msp*I (carril 2), *Hha*I (3), *Hind*III (4), *Hinc*II (5), que identifica a PHV originario de Tamaulipas. 1) ADN sin digerir. M) Marcadores moleculares de 100 pb y 1Kb.

Los productos de PCR de la región Rep Mot 1/ CP-c70 derivados de las muestras de Jalisco y Campeche se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias respectivas se presentan en el Cuadro 7. La comparación de estas secuencias con las disponibles en la base de datos del GenBank reveló que tanto la muestra de Chile de Campeche como las de Chile y jitomate de Jalisco, son similares a la del *Pepper huasteco yellow vein virus*, cepa Sinaloa (GenBank acc.no. AY044162), y el porcentaje de similitud con este virus fue de 87.6%, 93.2% y 96% respectivamente. Entre los virus del Chile y jitomate de Jalisco el porcentaje de similitud fue de 95%. Comparando el virus del Chile de Campeche con el de Jalisco, el porcentaje de similitud fue de 86.3%, en tanto que para el virus del jitomate, el resultado fue de 88.4%. Estos porcentajes de similitud y las diferencias evidentes encontradas entre las secuencias de la IR, nos permiten señalar que los virus identificados son variantes del PHV. En el caso de la muestra de Campeche, ésta no posee el sitio *Hind III* que caracteriza al PHV de Tamaulipas, y en cambio tiene un sitio *Hinc II* que no existe en la variante mencionada. Esto se probó experimentalmente y se llegó a la conclusión de que tales secuencias se pueden considerar características diferenciales para las variantes de PHV. Las secuencias obtenidas en este trabajo son nuevas y serán depositadas en el GenBank.

En el dendrograma de la Figura 13, se establece la relación filogenética entre las variantes de PHV, y su relación con otros begomovirus. Debido al porcentaje de similitud con el PHV de Sinaloa y con el PHV de Tamaulipas y como se aprecia en el árbol filogenético, se puede considerar que las variantes de Campeche y Jalisco son suficientemente divergente para considerarse “cepas” o “razas” del PHV, pero sería necesario secuenciar el genoma A entero de los virus para establecer esto de modo definitivo.

Cuadro 7. Secuencias de las clonas obtenidas de Chile y jitomate

Clona Chile Campeche 6119

TCTAGAGGATAGGTAAGGAAATAGTTCTTGGCATTAGGACGAAACCGTTTAGGCAATGGCATATTTGTAA
 TAAGAAGGGGTGTACACCGAATTTGGAGCTCTTTAACCTGGGGCTGATTGTAATCGGTGTAATTGGTAG
 CCAATATATAGTATATGGGAGTTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGG
 ATGGCCGACCGCTTACCTTATCTCTCCGTACCGCTTTATTTGAATTAAGATGTTACTTTTATGCCATCCA
 ATGAGCGTGCGTCTGGCGAGCTTAGTTAACCGTTCAGACGTGGGGACCAAGTAGTGGACGACCACTTT
 ATTGACTGTCAGCTTTATAAATCAAATTAACAAAGTGGTCCATGTACCTTTAATCAAATGCCTAAGC
 GTGATGCTCCTTGGCGATTAACAGCGGGGACCGCAAAGATTAGCCGAACAGTTCAAGGGCTC
 TTATCATGGGCCCGAGTACTAGCAGGGCCTCAGCTTGGGTTAATCGCCCAATGTACAGGAAGCCCCGGA
 TTTATCGTATGTACAGATCTCCGGATGTGCCGAAAGTTGTGAAGGCCATGTAAGGTCAGTCGAATTCT
 CTA

Clona Chile 5-C 1

TCTAGATGGATATGTGAGGAAATAGTTCTTGGCATTAAACGAAATCGTTTAGGCAATGGCATCTTTGTAA
 AAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGCTCTTTAACCTGTGCTTATGGTATTGGTGTATCGGTAGCCAATATAT
 AGTATATGGGAGTTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCGA
 CCGCTTCCCTTATCTTTCCGTACTGCTTTAATTTGAATTAAGATGTTACTTTTATGCTATCCAATGAGCGT
 GCGTCTGGCGAGCTTAGATAACCGTTCAGACGTGGGGACCAAGTACTGTTTGACCACTTTATTGACTGG
 CAGCTTTATAAATCAAATTAACCTAAGTGGTCCATATACCTTTAATCAAATGCCTAAGCGTGATGCTC
 CTTGGCGATTAACGGCGGGGACCGCAAAGATTAGCCGAACAGTTCAAGGGCTCTAATCATGG
 GCCCGACTACCAGCAGGTCTCAGCTTGGGTTAATCGCCCAATGTACAGGAAGCCCCGGATTTATCGTAT
 GTACAGATCTCCGGATGTGCCGAAAGTTGTGAAGGACCATGTAAGGTTTCATCGGATCCTCTA

Clona Jitomate C 5

TCTAGATGGATAAGTGAGGAAATAGTTCTTGGCATTAAACGAAATCGTTTAGGCAGTGGCATATTTGTAA
 AAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGCTCTTTAACCTGGGGCTGATTGTATCGGTGTAATTGGTAGCCAATATAT
 AGTATATGGGAGTTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCGA
 CCGCTTATCTTATCTATCCGTACTGCTTTATTTGAATTAAGATGTTACTTTTATGCTATCCAATGAGCGTG
 CGTCTGGCGAGCTTAGTTAACCGTTCAGACGTGGGGACCAAGTTGTGTATGACCACTTTATTGACTGTC
 AGCTTTATAAATCAAATTAACATAAAGTGGTCCATGTACCTTTAATCAAATGCCTAAGCGTGATGCTC
 CTTGGCGATTAACGGCGGGGACCGCAAAGATTAGCCGAACAGTTCAAGGGCTCTTATCATGG
 GCCCGACTACCAGCAGGGCCTCAGCTTGGGTTAATCGCCCAATGTACAGGAAGCCCCGGATTTATCGTAT
 GTACAGATCTCCGGATGTGCCGAAAGTTGTGAAGGCCCTGTAAGGTTCAATCGGATCCTCTA

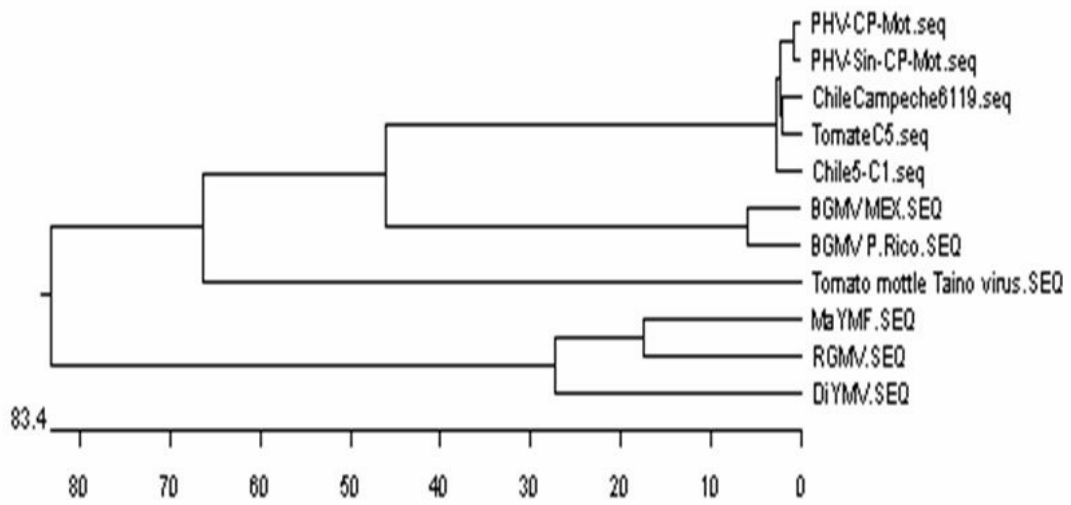


Figura 13. Variantes divergentes de PHV identificadas en muestras de jitomate y chile de Jalisco, y chile de Campeche y su relación filogenética con el PHV de Sinaloa y PHV originario de Tamaulipas. Para la elaboración del dendrograma se comparó la región genómica Rep Mot 1/ CP-c70 (600 pb).

IV. DISCUSIÓN

Los begomovirus constituyen un género muy numeroso y diverso dentro de la familia Geminiviridae, y el número de especies identificadas se incrementa día tras día, gracias en buena medida al desarrollo de más y mejores métodos de detección molecular. La emergencia de variantes más virulentas de begomovirus previamente conocidos ha sido también un fenómeno relativamente frecuente. Por ejemplo, en el cultivo del frijol el *virus mosaico dorado del frijol* (BGMV) era un patógeno de menor importancia para esta leguminosa, sin embargo, en algunas regiones de América Latina, fue suficiente una década para que éste junto con otros virus nuevos causaran severos daños en dicho cultivo. Actualmente son cinco los begomovirus que infectan al frijol en condiciones de campo, en nuestro continente, que son los siguientes: *virus mosaico dorado del frijol* (BGMV), *virus mosaico dorado amarillo del frijol* (BGMV), *virus del mosaico calico del frijol* (BCaMV), *virus del mosaico y achaparramiento del frijol*, BDMV (Potter y col., 2003).

Un caso importante desde el punto de vista fitopatológico es el del TYLCV, un begomovirus monopartita originario del Viejo Mundo, y que en 1994 apareció en el Caribe, expandiéndose desde entonces hacia otras regiones de América e infectando nuevos grupos de plantas. En Cuba, además del jitomate (Martínez Zubiaur y col., 2002) afectó también seriamente al chile (Quiñónez y col., 2001) y a la calabaza, *Cucurbita pepo* (Martínez Zubiaur y col., 2004). En el verano del 2001 y 2002 se detectaron por primera vez plantas de jitomate con síntomas característicos de TYLCV en Carolina del Norte, EUA. La secuencia de este virus fue idéntica al TYLCV de Cuba (Polston y col., 2002). En mayo del 2002 se identificó al TYLCV afectando al cultivo del jitomate en la Isla de Guadalupe, con una incidencia que osciló de 80 a 100% (Urbino y Tassius, 2003).

Recientemente en México se informó de la presencia de un begomovirus relacionado con el *virus mosaico dorado del sida* que provoca daños en la okra, el cual disminuyó el rendimiento y la producción en los estados de Morelos y Guerrero (de la Torre-Almaráz y col., 2002). En Chiapas se identificó en plantas

de tabaco al *virus mosaico dorado de Rhynchosia* (Ascensio-Ibañez y col., 2002). En el cultivo del jitomate, en las regiones productoras de Baja California Sur se han identificado al virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (TSLCV) y al PepGMV (Holguín-Peña y col., 2003; Holguín-Peña y col., 2004).

Prácticamente todos los begomovirus antes mencionados fueron identificados bajo un esquema general que implica la detección del begomovirus por técnicas de hibridación del ADN, subsiguiente amplificación por PCR de una región del componente A, clonación y secuenciación del ADN amplificado, e identificación por comparación de la secuencia obtenida con las existentes en la base de datos NCBI.

En los trabajos antes citados, para la identificación de varias especies de begomovirus de América y del Viejo Mundo, se utilizaron primero los oligonucleótidos degenerados universales diseñados por Rojas y col. (1993) para este género, los cuales amplifican un fragmento de 1.1kb y 1.4 kb del ADN-A, para los begomovirus de América y del Viejo Mundo respectivamente. Estos fragmentos se secuencian y en base a la secuencia se pueden diseñar nuevos oligonucleótidos específicos para amplificar el ADN-A completo.

Otro método comúnmente utilizado es el de Wyatt y Brown (1996), cuyo juego de digonucleótidos universales degenerados amplifican la región media del gen de la proteína de la cápside. En este caso, la región es altamente conservada y el fragmento amplificado es de 570 pb para todos los begomovirus, independientemente de su origen geográfico, por lo que es indispensable clonar y secuenciar este fragmento para establecer la identidad viral.

Para algunos begomovirus se han diseñado oligonucleótidos específicos con los cuales se amplifica un fragmento del ADN-A, o el componente A completo. Por ejemplo los oligonucleótidos diseñados por Torres-Pacheco y col. (1996) específicos para PHV, CdTV y TPV, y los diseñados para la identificación del TYLCV en la Isla de Guadalupe (Urbino y Tassius, 2003).

En el presente trabajo hemos desarrollado una nueva metodología que presenta características que la hacen más apropiada para el diagnóstico y el descubrimiento de nuevas especies virales que los métodos existentes.

En primera instancia, se diseñaron ocho diferentes “iniciadores” degenerados flanqueados por sitios de restricción, con los cuales se pueden amplificar diferentes regiones del componente A de los miembros del género *Begomovirus*, y clonarse en plásmidos de uso general como pUC19 o pBlueScript. Con estos oligonucleótidos se puede amplificar el componente A completo de cualquier begomovirus, independientemente de su origen geográfico. La versatilidad de los iniciadores se demostró experimentalmente amplificando con éxito las regiones genómicas correspondientes de begomovirus representativos de América, Europa y África. Algunos de los oligonucleótidos permiten además aislar regiones del genoma A de interés biotecnológico, como el fragmento de 400 pb que contiene a dos promotores divergentes, *CP* y *Rep*. En este caso, los productos de PCR se pueden clonar en un vector especial que contenga un gen reportero, como el gen *uidA* (GUS) de *Escherichia coli*, de tal modo que se generen dos cassettes de expresión diferentes en un sólo paso de clonación. Este sencillo método, por lo tanto, se puede utilizar para la generación de construcciones útiles para analizar la funcionalidad de una gran variedad de promotores de begomovirus, algunos de los cuales por sus características podrían ser de gran valor como herramientas moleculares en la biotecnología de plantas.

Con los oligonucleótido Rep-Mot/pCPc70 se amplifica la región Rep Mot1/CPc70 que se puede utilizar para diagnosticar e identificar tanto a virus conocidos como a nuevos begomovirus. Se constató experimentalmente que esta región es muy variable tanto en tamaño como en secuencia nucleotídica. Las diferencias en tamaño se pueden apreciar por la movilidad electroforética relativa, lo que permite distinguir fácilmente a los begomovirus originarios de América (540-610 pb) de los del Viejo Mundo (690-750 pb). Así mismo se exhibieron diferencias en los tamaños de los productos de PCR derivados de diversas especies de begomovirus americanos, como entre las del Viejo Mundo,

lo cual aporta una información preliminar acerca de la pluralidad de especies de begomovirus presentes en una región determinada, sin requerir la clonación y secuenciación de todos los fragmentos amplificados. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Wyatt y Brown (1996) cuyos oligonucleótidos AV 494/AC1048 amplifican el mismo tamaño de banda (570 pb) del gen de la cápside para los begomovirus de diferentes continentes, razón por la cual es indispensable la clonación y secuenciación de dicha región para establecer la identidad viral. Con el juego de oligonucleótido PAL1v1978 y PAR1c496 diseñados por Rojas *col.*, (1993), se puede efectuar el diagnóstico de begomovirus, pero en cuanto a la identificación, en forma preliminar solo se pueden distinguir dos grandes grupos, los de América (fragmento amplificado de 1.1 kb) y los del Viejo Mundo (1.4 kb). Sin embargo, para establecer la identidad viral es necesario realizar la clonación y la secuenciación de los fragmentos amplificados

Como ya se describió anteriormente, en la región Rep-Mot1/ CPc70 está incluida la IR, en la cual está inmersa el origen de replicación del genoma y los dos promotores divergentes. Los productos de PCR de esta región se pueden clonar y utilizar para estudiar experimentalmente la organización funcional del origen de replicación en diversos begomovirus, el cual implica no solo elementos involucrados de modo directo en la replicación del ADN, sino también elementos transcripcionales reguladores de la expresión de genes tempranos y tardíos. Dicha información se puede aprovechar en el desarrollo de vectores de expresión en las plantas, y para establecer nuevas estrategias de resistencia antiviral para una amplia gama de begomovirus, por ejemplo, las plantas de jitomate resistentes al TYLCV por silenciamiento de genes, éstas se obtuvieron utilizando la secuencia de la IR y una porción (2/5) de Rep, para la construcción de vectores de expresión que contenían a la secuencia río arriba de la región IR, en la que esta inmersa la secuencia de los iterones que son el sitio de enlace de la proteína Rep durante la replicación del virus por círculo rodante (Yang y *col.*, 2004). Además, con los segmentos genómicos amplificados de nuevos virus, que incluyen a la IR, se pueden realizar estudios evolutivos

utilizando la secuencia de los iterones, debido a que el arreglo de estas secuencias es conservado entre los grupos evolutivamente relacionados (Argüello-Astorga y col., 1994), por lo que existe la posibilidad de reconocer preliminarmente la existencia de nuevos linajes.

La variabilidad en la secuencia nucleotídica de la región Rep-Mot1/ CPc70 permitió establecer patrones de restricción característicos con las enzimas *Msp1* y *Hha1* para todos los begomovirus que se utilizaron en este ensayo, además de diferenciar dos begomovirus en la muestra de girasol e identificar a PHV en la muestra de Chile de SLP. Haber y col. (1987) demostró que el patrón de restricción es una herramienta útil para diferenciar begomovirus y la aplicó para distinguir begomovirus que infectan varias plantas colectadas en Puerto Rico. De igual forma Rojas col. (1993) seleccionó algunas enzimas de restricción y estableció un patrón de restricción para distinguir a los begomovirus conocidos hasta ese momento, de los no caracterizados. Sin embargo, estos patrones de restricción no fueron de aplicación general para diferenciar begomovirus. El análisis de las secuencias virales amplificadas con nuestros iniciadores por medio de programas computacionales que predicen el patrón de digestión con enzimas de restricción, nos permitió identificar enzimas de bajo costo que producen patrones de restricción característicos y diferenciales de especies virales, de tal forma que con ellos se puede constituir una base de datos que sirva para una identificación rápida de begomovirus, sin recurrir a la secuenciación. En base a esta información, se puede hacer una selección preliminar de aquellos begomovirus para los cuales es importante la identificación por secuenciación.

Con este método basado en el patrón de restricción con *Msp1* y *Hha1* se puede evaluar rápidamente la diversidad de begomovirus presentes en un agroecosistema, identificar a los begomovirus que participan en infecciones múltiples, y detectar nuevos begomovirus de una forma comparativamente simple. La diferencia de nuestra técnica con la técnica de PCR multiplex, la cual se aplica con la misma finalidad, es que esta última tiene el inconveniente de que requiere los oligonucleótidos específicos para el número de virus que se

pretenden identificar. Por ejemplo, Potter col. (2003) identificaron con PCR multiplex cinco begomovirus que infectan al frijol en América y el Caribe, en una sola reacción, utilizando cinco juegos de oligonucleótidos específicos (no universales).

Nuestra técnica se puede aplicar a múltiples muestras y ser de gran valor para realizar estudios epidemiológicos, por ejemplo en investigaciones sobre las interacciones de la mosquita blanca con más de un begomovirus, las cuales se pueden presentar cuando este insecto se alimenta de plantas infectadas con varios virus de este género. También en la Identificación y establecimiento de la gama de hospederos de cada begomovirus presente en una región geográfica, así como en la evaluación de variedades resistentes y susceptibles a diversos begomovirus en los programas de mejoramiento genético, evitando para ello el uso de PCR multiplex con oligonucleótidos específicos. Por ejemplo, en el programa de mejoramiento genético del cultivo del algodón en Pakistán, se evaluaron por PCR multiplex los nuevos cultivares resistentes y extremadamente resistentes a begomovirus que afectan al algodón (Rahman y col., 2002). Este método tiene el inconveniente de que solo detectará la resistencia específica para los begomovirus que se estén evaluando, a diferencia del que nosotros proponemos, el cual podría detectar otros begomovirus presentes. Otra aplicación potencial del método es en la evaluación del material vegetal de importación y el control de los begomovirus por legislación fitosanitaria; con esta técnica se puede saber que tipo de begomovirus infectan dicho material vegetal, y evitar la introducción de patógenos a una región o país, como lo acontecido en Francia, en donde se encontró que el 50% de los frutos de jitomate procedentes de la región del Mediterráneo estaban infectados con TYLCV, y además se demostró que el fruto puede actuar como reservorio del virus (Delatte y col., 2003).

Por otro lado, con la combinación de diferentes juegos de oligonucleótidos (Figura 2 y 4) se puede amplificar el componente A completo de cualquier begomovirus, pero a diferencia de las regiones obtenidas con los oligos de Roja col. (1993), los segmentos genómicos amplificados con nuestro oligos se

sobrelapan y por consiguiente no existe la posibilidad de amplificar fragmentos de dos begomovirus que infecten una planta y obtener una secuencia que erróneamente se considere como un nuevo begomovirus. Un aspecto diferente de nuestro método, al proceso de identificación de nuevos begomovirus en el cultivo de jitomate, que se llevaron a cabo en la India y Tailandia (Shih y col., 2003; Green y col., 2003) es que con nuestros iniciadores se evita la necesidad de diseñar oligonucleótidos específicos para obtener el componente A completo de cada begomovirus en estudio.

En relación al PHV identificado por secuenciación en las muestras de chile de Campeche, así como las de chile y jitomate de Jalisco, se puede considerar que este resultado concuerda con los datos obtenidos por Torres-Pacheco col. (1996 y 2002) referentes a que el PHV es el begomovirus que infecta al jitomate y chile de más amplia distribución en las diversas regiones productoras de México. Por los porcentajes de similitud obtenidos (87.6%, 93.2% y 96%) al comparar las secuencias de la región Rep Mot1/ CP-c70 de los aislamientos de chile-Campeche, chile-Jalisco y jitomate-Jalisco con la *del Pepper Huasteco Yellow Virus-Sinaloa* (GenBank acc.No. AY044162) se estableció que estos aislamientos correspondieron a variantes divergentes del PHV de Sinaloa. No es sorprendente la identificación de dichas variantes, debido a que en los begomovirus existen tres mecanismos que pueden generar variación genómica, los cuales corresponden a la mutación puntual, en segundo término a la llamada pseudo-recombinación, y finalmente a la recombinación intraespecífica e interespecífica. Se tiene conocimiento que la mutación puntual puede ser una de las causas de aislamientos divergentes de un virus determinado, además, otros cambios que incluyen inversiones y duplicaciones probablemente originan la divergencia en la evolución y propicien la emergencia de variantes y nuevas especies (Harrison y Robinson, 1999). En general la pseudo-recombinación se lleva a cabo por rearrreglo del ADN del componente A y B de aislamientos del mismo begomovirus pero no en especies de distintos begomovirus, lo cual se debe probablemente a que los componentes B heterólogos no se replican. La pseudo-recombinación claramente aporta una forma de rearrreglo de genes

equivalentes de diferentes variantes de un begomovirus, aunque su frecuencia de ocurrencia en condiciones de campo se desconoce. La recombinación, especialmente la recombinación interespecífica es el mecanismo clave para la generación de nuevas formas de virus, para incrementar la adaptabilidad biológica de pseudorecombinantes derivadas de especies íntimamente relacionadas y para mantener el flujo de material genético entre diferentes begomovirus que están presentes en una misma región geográfica. Además se considera que las recombinantes están asociadas con la emergencia de enfermedades epidémicas. Este tipo de enfermedades refleja la conjunción de factores favorables para su desarrollo como son las plantas susceptibles, la presencia del vector y la eficiencia de la transmisión; así como las variantes virales altamente virulentas (emergencia de recombinantes). Un factor que favorece la recombinación y el surgimiento de las variantes virales, es la coinfección de las plantas con diferentes begomovirus, lo cual acontece en las zonas productoras de jitomate y chile de nuestro país.

El método de diagnóstico e identificación de begomovirus que desarrollamos, posee varias características que superan algunas de las limitaciones de los métodos de Rojas col. (1993) y de White y Brown (1996); y son las siguientes:

- Cuenta con varios juegos de oligonucleótidos universales degenerados con los que se pueden amplificar a la mayoría de los begomovirus conocidos, independientemente de su origen geográfico. En particular con los iniciadores Rep-MotGus y pCPc70 se pueden distinguir a los begomovirus del Nuevo Mundo de los del Viejo Mundo, y detectar la diversidad de especies en una región geográfica, identificar a las plantas hospederas, diagnosticar infecciones múltiples en las plantas sintomáticas y asintomáticas, así como en el vector *Bemisia tabaci*.

- Para establecer la identidad viral de forma preliminar, no es fundamental la clonación y la secuenciación.
- Las regiones amplificadas tienen un valor adicional debido a que pueden ser utilizadas, con unas cuantas manipulaciones enzimáticas adicionales, en la biotecnología de plantas o para estudiar los mecanismos de replicación del ADN viral.

Por todas esas características de la metodología desarrollada a lo largo de este trabajo es válido concluir que ésta constituye una herramienta poderosa, sencilla, rápida y de bajo costo para el diagnóstico e identificación de begomovirus.

CONCLUSIONES

- 1.- Diferentes regiones del genoma A de numerosos begomovirus originarios del continente americano (México, EUA, Venezuela, Cuba), Africa y Asia, se pudieron amplificar con la combinación de ocho nuevos iniciadores universales diseñados y experimentalmente probados en el curso del presente trabajo.
- 2.- Los nuevos iniciadores están dirigidos contra secuencias distribuidas a lo largo del genoma A de los begomovirus, lo que crea amplias posibilidades para el desarrollo de PCR anidado, aumentando así la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular. Esto fue comprobado experimentalmente en este trabajo.
- 3.- La detección de infecciones virales mixtas, que rara vez se logra con las técnicas basadas en uno o dos juegos de iniciadores, se torna muy factible con la nueva metodología, basada en el uso de múltiples iniciadores universales. Esto fue confirmado en el caso de una planta de girasol proveniente de Sinaloa.
- 4.- Puesto que las regiones virales amplificadas por los nuevos iniciadores se sobrelapan extensamente, se hace posible obtener la secuencia completa del componente A de cualquier begomovirus a partir de 2 o 3 productos de PCR, sin incurrir en los errores asociados a la presencia inadvertida de dos o más geminivirus en una misma planta.
- 5.- Se estableció un nuevo método para diagnosticar e identificar rápidamente begomovirus de cualquier origen geográfico, basado en la amplificación por PCR de la región Rep Mot1/CP c70 (la más informativa del genoma viral) seguida de su caracterización por RFLPs. Este método posee mayor resolución e involucra menores costos y labor técnica que otros previamente publicados, particularmente cuando el volumen de muestras es grande, porque la clonación y secuenciación de todos los productos de PCR no es necesaria para establecer la identidad de los virus que infectan un cultivo determinado.

6.- El nuevo método de PCR-RFLP se utilizó para analizar muestras de plantas infectadas naturalmente y por medio del mismo se diagnosticaron infecciones múltiples y se identificaron variantes divergentes del PHV en muestras de jitomate y chile procedentes de Jalisco y Campeche.

REFERENCIAS

Abouzid, A.M., Polston, J. E. y Hiebert, E. 1992. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomato in Florida. *J. Gen. Virol.* 73:3225-3229.

Álvarez, P.A. y Abud-Atún, A. J. 1995. Reporte de República Dominicana CEIBA (Honduras) 36:39-47.

Amin, I., Mansoor, S., Iram, S., Khan, M. A., Hussain, M., y Zafar, Y. (2002). Association of a monopartite begomovirus producing subgenomic DNA and distinct DNA beta on *Croton bonpladianus* showing yellow vein symptoms in Pakistan. *Plant Dis.* 86: 444.

Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R. y Rivera-Bustamante, R. F. 1994. Geminivirus replication have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203: 90-100.

Argüello-Astorga, G.R., R. Ruiz-Medrano (2001). An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: Identification of potential DNA-protein contacts by a comparative approach. *Archives of Virology* 146: 1465-1485.

Ascencio-Ibañez, J. T., Argüello-Astorga G., Méndez-Lozano, J., y Rivera-Bustamante, R. F. (2002). First report of *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Dis.* 86:692.

Azzam, O., Frazer, J., De la Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P., y Maxwell, D. P. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus requires functional coat protein. *Virology* 204: 289-296.

Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J. K., Rosell, R.C., Markham, P.G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125:311-325.

Bezerra, I. C., Ribeiro, S. G., De D'Avila, A. C., Giordano, L. B. (1996). Survey of geminivirus infection in tomato producing areas in the Federal District. In Meet. Brazil. Soc. Virol., (R 8, 1996 Sao Lourenço, MG). Proceedings. p. 289.

Brown, J.K. (1993). Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. In Las Moscas Blancas (Homóptera: Aleyroididae)

en América Central y el Caribe. Hilje, L., Arboleda, O. Eds. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie Técnica. Inf. Tech. No 205 p. 27-33.

Brown, J.K. (1994). Current status of *Bemisia tabaci* as a plant and virus vector in agro-ecosystems worldwide. FAO Plant Prot. Bu11.41:3-32.

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

Brown, J.K., Bird, J., Banks, G., Sosa, M., Kiesler, K., Cabrera, I., y Fornaris, G. (1995 a). First report of an epidemic in tomato caused by two whitefly-transmitted geminiviruses in Puerto Rico. Plant Dis. 79:1250.

Brown, J.K., Bird, J., Frohlich, D.R., Rosell, R.C. Bedford, I.D., y Markham, P. G. 1996. The relevance of variability within the *Bemisia tabaci* species complex to epidemic caused by subgroup III geminiviruses. Page 69-76 in: 95 Taxonomy, Biology, Damage, Control and management. D. Gerling y R. T. Meyers, eds. Intercept Publications, Wimborne, United Kingdom

Brown, J.K., Frohlich, D.R., Rosell, R.C. (1995b). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Annu. Rev. Entomol. 40:511-534.

Brown, J.K.; Idris, A.M.; Fletcher, D.C. 1993. Sinaloa tomato leaf curl virus, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. Plant Dis. 77:1262.

Brown, J. K., Lastras, R., y Bird, J. (1992). First documentation of whitefly-transmitted geminiviruses causing widespread disease in cotton, tobacco, and tomato in Dominican Republic and tomato in Puerto Rico. (Abstr.) Phytopathology 82:607.

Brown, J.K. y Nelson, M.R. (1988). Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. Plant Dis.72:866-869.

Byrene, D.N., Bellows, J., Thomas, S., Parrella, M.R (1990). Whiteflies in agricultural systems. In Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status, and Management. D. Gerling, ed., Intercept, Andover, Eng. p. 227-262.

Cancino, M., Hiebert, E., Purcifull, D., Polston, J.E., y Morales, E. J. (1995). Mono-clonal antibody with broad specificity to whitefly-transmitted geminiviruses. Phytopathology 85: 484-505.

Chakraborty, S., Pandey, P. K. , Banerjee, M. K., y Kalloo, G. (2003). A new begomovirus species causing tomato leaf curl disease in Varanasi, India. *Plant Dis* 87: 313

Christie, R. G., Ko, N.J., Falk, B. W., Hiebert, E., Lastra, R., Bird, J., y Kim, K. S. (1966). Light microscopy of geminivirus induced nuclear inclusion bodies. *Phytopathology* 76: 124-126.

Cohen, S., y Antignus, Y. (1994). Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.* 10: 259- 288.

Coutts, R. H. A., Coffin, R. S., Roberts, E.J.F., y Hamilton, W.D.O. (1991). The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of potato yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1515-1520.

Debrot, E., y Dao, H. E. (1963). Nota preliminar sobre un mosaico amarillento del tomate. *Venezuela Agron. Trop.* 13: 33-41.

De La Torre-Almaráz, R., Monsalvo-Reyes, A. C., Rivera-Bustamante, R. F., y Méndez-Lozano, J. (2003). First report of a geminivirus inducing yellow mottle in okra (*Abelmoschus esculentus*) in Mexico. *Plant Dis.* 87:202.

Delatte, H., Dalmon, A., Rist, D., Soustrade, I., Wuster, G., Lett, J. M., Goldbach, R. W., Peterschmitt, M., y Reynaud, B. (2003). *Tomato yellow leaf curl virus can be acquired and transmitted by Bemisia tabaci* (Gennadius) from tomato fruit. *Plant Dis.* 87:1297-1300.

Domínguez, M., Ramos, O. L., Echemendía, A. L., Peral, R., Crespo, J., Andino, V., Pujol, M., y Borroto, C. (2002) Molecular characterization of *Tobacco leaf rugose virus*, a new begomovirus infecting tobacco in Cuba. *Plant Dis.* 86:1050.

Flores, E., Silberschmidt, K., y Kramer, M. (1960). Observacoes de clorose infecciosa das malvaceas em tomateiros do campo. *O Biológico* 26: 65-69.

Fauquet, C. M., Bisaro, D M. , Bridoon, R. W., Brown, J. K. , Harrison, B. D., Rybicki, E. P., Stenger, D. C. y Stanley, J. (2003). Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and updated list of begomovirus species. *Archiv. Virol.* 148: 405-421.

Gallegos, H. M. L. (1978). Enchinamiento del tomate (chino disease of tomato). In *Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa*. Sinaloa, México. Secretaria Agric. Recursos Hidráulicos. p. 119.

Givord, L., Fargette, D., Kounounguisa, B., Thouvenel, J. C., Walter, B., Van Regenmortel, M. H. V. (1994). Detection of geminiviruses from tropical countries by double monoclonal antibody ELISA using antibodies to African cassava mosaic virus. *Agronomie* 14: 327-333.

González, A., y Valdés R. S. (1995). Virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en Cuba. *CEIBA (Honduras)* 36:103.

Goodman, R. M. 1977 a. Single stranded-A genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* 83: 171-199.

Goodman, R. M. 1977 b. A new kind of virus is discovered. *Illinos Research* 19:5.

Green, M. J., y Thompson, D. A. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 83: 482-485.

Green, S. K., Tsai, W. S., Shih, S. L., Rezaian, M. A., y Duangsong, U. (2003). Molecular characterization of a new begomovirus associate with tomato yellow leaf curl and eggplant yellow mosaic diseases in Thailand. *Plant Dis.* 87: 446.

Gutierrez, C. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 219-230.

Guzmán, R., Arredondo, C. R., Emmatty, D., Portillo, R. J. , Gilbertson, R. L. (1997). Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis* 81:312.

Haber, S., Polston, J. E. y Bird, J. (1987). Use of DNA to diagnose plant disease caused by single-strand DNA plant viruses. *Can. J. Plant. Pathol.* 9:156-161

Hamilton , W. D. O., Stein, V. E., Coutts, R. H. A. , y Buck, K. W. (1984). Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: Potential coding regions and regulatory sequences. *EMBO J.* 3:2197-2205..

Harrison, B. D., y Robinson, D. J. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:369-398.

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S., Orozco, B. M., Nagar, S., y Robertoson, D. (2000). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(1):71-106.

Hiebert, E., Abouzid, A. M., y Polston, J. E. (1995) Whitefly-transmitted geminivirus. In D. Gerling and R. T. Mayer, Eds. *Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Andover, Eng. Intercept. p. 227-288.

Holguín-Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2003). First report of a geminivirus associated with leaf curl in Baja California Peninsula tomato fields. *Plant Dis.* 87:1397.

Holguín-Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R., y Rivera-Bustamante, R. F. (2004). Pepper golden mosaic virus affecting tomato crops in the Baja California Peninsula, Mexico. *Plant Dis.* 88: 221.

Hostachy, B., y Allex, D. (1993). Un geminivirus de la tomate transmission par *Bemisia tabaci*. *Phytoma* 455:24-28.

Hostachy, B., y Allex, D. (1994). Geminivirus de la tomate du nouveau. *Phytoma* 457: 4.

Hou, Y. M., Garrido- Ramírez, E. R. , Stingley, S., Guzmán, P., y Gilbertson, R. L. (1996). Characterization of the infectious clones of the Sinaloa atrain of pepper huasteco geminivirus. *Phytopathology* 86: S43.

Kring, J. B., Schuster, D. J., Price, J. F., y Simone, G. W. (1991). Sweetpotato whitefly-vectored geminivirus on tomato in Florida. *Plant Dis.* 75:1186.

Lastra, J. R., y De Uzcategui, R. C. (1975). Viruses affecting tomatoes in Venezuela. *Phytopathol. Z.* 84: 253-258.

Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J., and Gronenborn, B. (1995). *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:3879-3883.

Lazarowitz, S. G. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 11: 327-329.

Ley-Flores, J. H. 1975. Estudio de transmisión del enchinamiento del tomate, por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). (Genn). , en el Valle de Culiacán, Sin., México. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Agricultura. Universidad Autónoma de Sinaloa.

Martínez Zubiatur, Y., Fonseca, D., y Quiñónez, M. (2004). Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting squash (*Cucurbita pepo*) in Cuba. *Plant Dis.* 88: 572.

Martínez Zubiatur, Y., Quiñónez, M., Fonseca, D., Potter, J. L., y Maxwell, D. P. (2002). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* associated with beans, *Phaseolus vulgaris*, in Cuba. *Plant Dis.* 86:814.

Matys, J. C. , Silva, D. M., Oliveira, A. R., y Costa, A. S. (1975). Purificacao e morfología do virus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathol.* 1: 267-274.

McGovern, R. J., Polston, J. E., Danyluk, G. M., Hiebert, E., y Stansly, P. A. (1994). Identification of a weed host of tomato mottle geminivirus in Florida. *Plant Dis.* 78:1102-1106.

McGlashan, D., Polston, J. E., y Bois, D. (1994). Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Dis.* 78:12-19.

Nakhla, M. K., Maxwell, D. P., Martinez, R. T., Carvalho, M. G., y Gilbertson, R. L. (1994). Ocurrance of the eastern Mediterranean strain of tomato yellow leaf curl geminivirus in the Dominican Republic. *Phytopathology* 84:1072.

Padidam, M., Beachy, R. n., y Fauquet, C. (1995). Classification and identification of geminivirus using sequence comparison. *Journal of General Virology* 76:249-263.

Polston, J. E., Rosebrock, T. R., Sherwood, T., Creswell, T., y Shoemaker, P. J. (2002). Appearance of Tomato yellow leaf curl virus in North Carolina. *Plant Dis.* 86:73.

Polston, J. E., y Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminivirus in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81: 1358-1370.

Polston, J. E., Bois, D., Keinath, A. P., y Chellemi, D. O. (1995). Ocurrance of tomato mottle geminivirus in South Carolina, Tennessee and Virginia. *Plant Dis.* 79:539.

Polston, J. E., Bois, D., Serra, C. A., y Concepción, S. (1994 a). First report of tomato yellow leaf curl-like geminivirus from tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 78: 831

Polston, J. E., Chellemi, D. O., Schuster, D. J., McGovern, R. J., y Stansly, R. A. (1996). Spatial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* in Florida tomato fields. *Plant Dis.* 80: 1022-1028.

Polston, J. E., Hiebert, E., McGovern, R. J., Stansly, P. A., y Schuster, D. J. (1993 a). Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. *Plant. Dis.* 77:1181-1184.

Polston, J. E., Schuster, D. J., y Chellemi, D. O. (1993 b). Advances in the management of tomato mottle geminivirus. In *Proc. Fla. Tomato Inst. C. S. Vavrina, Ed. University of Florida, IFAS, Vegetable Crops Special Series. PRO-105 p. 69-67.*

Potter, J. L., Nakhla, M. K., Mejía, L., y Maxwell, D. P. (2003). PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Dis.* 87:1205-1212.

Quiñónez, M., Fonseca, D., y Martínez, Y. (2002). First report of Tomato yellow leaf curl virus infecting pepper plants in Cuba. *Plant Dis.* 86:73.

Rahaman, M., Hussain, D., y Zafar, Y. (2002). Estimation of genetic divergence among elite cotton cultivars-genotypes by DNA fingerprinting technology. *Crop Science* 42:2137-2144.

Rampersad, S. N., y Umaharan, P. (2003). Detection of two bipartite geminivirus infecting dicotyledonous weed in Trinidad. *Plant Dis.* 87: 602

Ramos, P. L., Fernández, A., Castrillo, G., Echemendía, A. L., Fuentes, A., Peral, R., Pujol, M., Ascencio-Ibañez, J. T., Rivera-Bustamante, R., y Argüello-Astorga G. (2002). *Macrotidium yellow mosaic virus*, a new begomovirus infecting *Macrotidium lathyroides* in Cuba. *Plant Dis.* 86:1049.

Ramos, P. L., Guerra, O., Dorestes, V., Ramírez, N., Rivera-Bustamante, R., Oramas, P. (1996). Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Dis.* 80:1208.

Ribeiro, S. G., Mello, L. V., Boiteux, L. S., Kitajima, E. W., y Faria, J. C. (1994). Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. (Abstr.) *Fitopatol. Brasil.* 19: 330.

Roberts, E. J. F., Buck, K. W., y Coutts, R. H. A. (1988). Characterization of potato yellow mosaic virus as a geminivirus with a bipartite genome. *Intervirology* 29:162-169.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., y Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* 77: 340-347.

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanderfoot, A., y Lazarowitz, S. G. (1996). Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6: 353-358.

Schuster, D. J., Mueller, T. E., Kring, J. B., y Price, J. F. (1990). Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. *HortScience* 25:1618-1620.

Serra, C. A., Polston, J. E., Concepción, S., Ortiz, M., Núñez, J. B., y Benoit, R. F. (1995). Host range of TYLCV-DR and its vectors and strategies to reduce damage in northwestern Dominican Republic. In *Proc. Symp. Mol. Biol. Epidemiol. Geminivirus*. p. 15.

Shih, S. L., Tsai, W. S., Green, S. K., Hanson, P.M., Kalloo, G., Shrestha, K., y Joshi, S. (2003 a). Molecular characterization of a new tomato begomovirus from India. *Plant Dis.* 87:598

Shih, S. L., Tsai, W. S., Green, S. K., Khalid, S., Ahmad, I., Rezaian, M. A. (2003). Molecular characterization of tomato and chili leaf curl begomoviruses from Pakistan. *Plant Dis.* 87:200.

Stenger, D. C., Duffus, J. E. y Villalon, B. (1990). Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.

Sunter, G. y Bisaro, D. M. (1991). Transactivation in a geminivirus, AL2 gene product is need for coat protein expression. *Virology* 180: 416-419.

Torres-Pacheco, I., Guzmán-Maldonado, H., González-Chavira, M. 2002. Diagnosis of chilli pepper virus in Mexico. *Proceedings of the 16th Internacional Pepper Conference*. Tampico, Tamaulipa, Mexico. November 10-12.

Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K. A., Becerra-Flora, y R. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.

Urbino, C. y Tassius, K. (2003). First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato in Guadeloupe. *Plant Dis.* 87: 1397.

Uzcategui, R. C. De; y Lastra, R. (1978). Transmission and physical properties of the causal agent of mosaico amarillo del tomate (tomato yellow mosaic). *Phytopathology* 68: 985-988.

Van Wezel, R., Dong, X., Lui, H., Tien, P., Stanley, J., y Hong, Y. (2002). Mutation of three cysteine residue in Tomato yellow curl virus- China C2 protein causes dysfunction in patogénesis and post-transcriptional gene silencing suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 203-208.

Ward, B. M. y Lazarowitz, S. G. (1999). Nuclear export in plants: use geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant Cell* 11: 1267-1276.

Wyatt, S. D., y Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.

Yang, Y., Sherwood, T. A., Patte, C. P., Hiebert, E., y Polston, J. E. (2004). Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) *Rep* gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* 94:490-496.

Zerbini, F. M., Zambolim, E. M., Carrijo, I. V. Y Gilbertson, R. L. (1996). A new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Minas Gerais State, Brazil. (bstr.) *Phytopathology* 86: S1

Zhang, W., Olson, N. H. , Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., y McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology* 279 (2): 471-477.

