

IMPORTANCIA DE FUENTES DE INOCULO Y VECTOR
EN LA INCIDENCIA DEL VIRUS TEXANO DEL CHILE
VAR. COAHUILA Y LA RESISTENCIA A LA
ENFERMEDAD EN CINCO GENOTIPOS DE
Capsicum annum.

LETICIA BRAVO LUNA

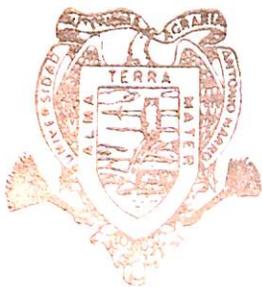
T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



BIBLIOTECA



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

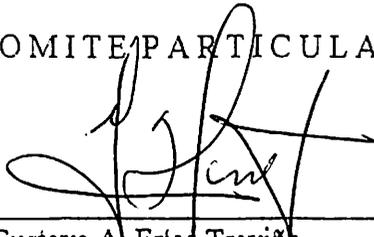
JUNIO DE 1997

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRICOLA

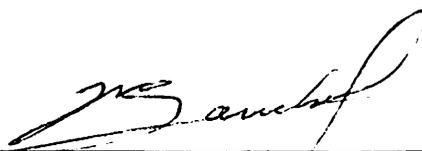
COMITE PARTICULAR

Asesor Principal:



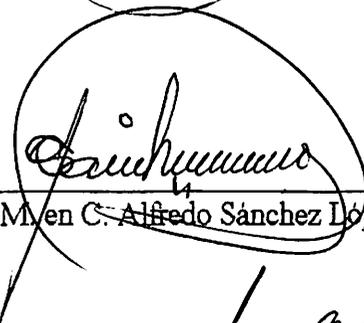
Dr. Gustavo A. Frías Treviño

Asesor:



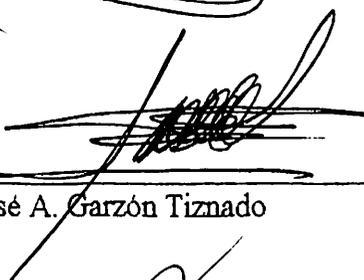
M. en C. Victor M. Sánchez Valdez

Asesor:



M. en C. Alfredo Sánchez López

Asesor:



Dr. José A. Garzón Tiznado



Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio. 1997.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme su apoyo en una de mis metas de superación profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que a través del Departamento de Parasitología Agrícola recibí una sólida formación profesional y personal.

Al Centro de Investigación de Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Guanajuato por brindarme su apoyo para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Gustavo A. Frías Treviño, quien siempre me brindó palabras de estímulo, digno de un verdadero amigo.

Al M. en C. Víctor M. Sánchez, por su disposición permanente y sus valiosas sugerencias.

Al M. en C. Alfredo Sánchez, por sus aportaciones para la realización de este trabajo.

Al Dr. José A. Garzón Tiznado, por la mano amiga siempre disponible y sus valiosas

DEDICATORIA

A DIOS nuestro señor

A mi querida madre Sra. Eusebia Luna Domínguez, ejemplo de cariño, comprensión, fuerza y superación. DIOS te bendiga por siempre.

A mis hermanos: Vicente, Rogelio y Roel.

A mis sobrinos: Rogelio Jaen, Blanca Iris, Emigdio Jair, Valeria y Melisa.

COMPENDIO

Importancia de fuentes de inóculo y vector en la incidencia del virus texano del chile var.
Coahuila y la resistencia a la enfermedad en cinco genotipos de *Capsicum annuum*.

POR

LETICIA BRAVO LUNA

MAFSTRIA

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUTNAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. JUNIO, 1997.

Dr. Gustavo A. Frias Treviño. - Asesor -

Palabras claves *Capsicum annuum*, *Bemisia tabaci*, Virus Texano del Chile, Geminivirus. Resistencia, Incubación, Hospederos, Incidencia

El presente estudio se llevó a cabo en la región chilera de Ramos Arizpe, Coah., UAAAN, CINVESTAV-IPN y Universidad de Davis California con los objetivos de identificar la especie de mosquita blanca vector, el virus, periodo de incubación del virus, hospederos y su importancia en la incidencia del síndrome chino del chile; así como la resistencia de algunos genotipos de chile a esta enfermedad.

La especie vectora del virus involucrado en el síndrome chino del chile se identificó como *Bemisia tabaci* Gennadius. El período de incubación del TPGV-Coah. en genotipos de chile en etapa de plántula varió de 10.43 a 12.4 días, mientras que en etapa de floración varió de 10.5 a 27.3 días. Mediante PCR se amplificaron dos fragmentos virales que tuvieron el tamaño predicho de 0.8 Kb para el genoma A y 0.5 Kb para el genoma B, que presentaron una homología del 95 por ciento con el virus texano del chile por lo que se considera una variante de este (TPGV var. Coahuila). En cuanto a hospederos del TPGV-Coah. fueron *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium*, *D. quercifolia* y *Capiscum annuum* (soca y comercial) mientras que para *B. tabaci* además de las anteriores *Physalis phyladelphica*, *Solanum elaeagnifolium*, *Parthenium hysterophorus*, *Ambrosia confertiflora*, *Xanthium strumarium*, *Phaseolus vulgaris*, *Acacia constricta* y *Prosopis* sp. de éstas la principal fuente de inóculo del virus se considera a *N. glauca*.

La incidencia del TPGV-Coah. en siembras tempranas de chile alcanzó el 77 por ciento en etapa de fructificación del cultivo y en siembra tardía alcanzó el 100 por ciento en etapa de prefloración. La resistencia de los genotipos al TPGV-Coah. manifestaron diferencias por la etapa fenológica inoculada, por las condiciones ambientales en que se establecieron las plantas y la constitución genética de cada uno; siendo los más prometedores cuando se inocularon en plántula Tampiqueño 74 y el criollo de la región; cuando se inocularon en floración fueron el criollo y las líneas 2 LP-S-294 y LA-S-293. En el ejido La Leona los más prometedores fueron las dos líneas y en el ejido La Gamusa fueron además de las dos líneas el Tampiqueño 74.

ABSTRACT

Importance of inoculum source and vector in the incidence from Texas pepper virus var. Coahuila and the resistance to the disease in five genotypes from *Capsicum annuum*

By

Leticia Bravo Luna

MASTER OF SCIENCE

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNIO, 1997

Dr. Gustavo A. Frias Treviño -Advisor -

Key words: *Capsicum annuum*, *Bemisia tabaci*, Texas Pepper Virus, Geminivirus, Resistance, incubation, Host, Incidence

This study was carried in Ramos Arizpe, Coah., UAAAN, CINVESTAV-IPN University of Davis California, being its objectives the whitefly vector, virus, incubation period identify and the importance in the incidence of syndrome pepper leaf curly as well as evaluate resistance in pepper genotypes

The whitefly associated with Sultanic pepper leaf curly is *Bemisia tabaci*

Gennadius. The incubation period of TPGV var. Coah. in pepper genotypes in plants varied 10.43-12.4 days, in flowering 10.5-27.3 days. By PCR amplification there were of two fragments viral of size known 0.8 Kb genome A and 0.5 Kb genome B with 95 por ciento homology with Texas Pepper Geminivirus by this situation is considered like a variant of this (TPGV var. Coah.). The TPGV var. Coah. host found in this investigation were *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium*, *D. quercifolia* y *Capsicum annum* (soca and commercial), the *B. tabaci* host besides were *Physalis phyladelphica*, *Solanum elaeagnifolium*, *Parthenium hysterophorus*, *Ambrosia confertiflora*, *Xanthium strumarium*, *Phaseolus vulgaris*, *Acacia constricta* y *Prosopis* sp. The principal source of inoculum was *N. glauca*.

The incidence of disease in early fields tempranas got was 77 por ciento in fruit age and old fields the range got was 100 por ciento in preflowering. The resistance varied with plant age, environmental conditions and genetic constitution. The genotypes in greenhouse condition in planting were varieties Tampiqueño 74 and criollo, in flowering were criollo and lines 2 LP-S-294 y LA-S-293. In La Leona were the two lines and La Gamusa besides before lines mentioned was the Tampiqueño 74.

INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
Antecedentes	4
Mosquitas blancas	8
Características de mosquitas blancas	8
Hospederos de <i>B. tabaci</i>	10
Geminivirus	11
Características de geminivirus	11
Síntomas causados por geminivirus	12
Hospederos de geminivirus	14
Relación entre geminivirus	16
Relación vector-agente causal	18
Transmisión	18
Periodos de adquisición, latencia, inoculación y persistencia en <i>B. tabaci</i>	21
Factores que afectan la transmisión	25
Periodo de incubación de las enfermedades causadas por geminivirus	26
Resistencia Genética	27
Mejoramiento	27
Métodos de evaluación	27
Relación edad-resistencia	29
Factores que afectan la susceptibilidad	29
Diagnóstico de virus fitopatógenos	30
Ensayo de inmunoadsorción de enzimas ligadas (ELISA)	30
Inclusiones virales	31
Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	31
Hibridación molecular	32
Métodos de control de la enfermedad	33
MATERIALES Y METODOS	35
Identificación de la especie de mosquita blanca vectora del virus involucrado en el síndrome chino del chile	35
Periodo de incubación del virus	36
Diagnóstico del virus asociado al síndrome chino del chile	37

Hibridación de ácidos nucleicos por maceración (NASH)	37
Obtención de la sonda.....	37
Extracción del ADN viral	37
Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	38
Elusión del fragmento viral amplificado (gene clean)	38
Clonación	38
Minipreparación de sondas (midi prep)	38
Marcaje de la sonda	39
Protocolo de NASH	39
Preparación de membranas	39
Hibridación	40
Detección	40
Ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA)	40
Fuentes de inóculo	41
Hospederos del virus	41
Hospederos de mosquita blanca	41
Importancia de fuentes de inóculo	41
Incidencia del síndrome chino del chile	43
Resistencia a la enfermedad	44
Bajo condiciones de invernadero	44
Bajo presión natural de campo	45
RESULTADOS	46
DISCUSION	75
CONCLUSIONES	85
RESUMEN	87
LITERATURA CITADA	91
APENDICE	98

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
2.1	Virus caracterizados y en proceso de caracterización que atacan al chile de Mexico	-
2.2	Relaciones entre geminivirus	19
3.1	Escala de severidad utilizada para evaluar resistencia en chile a la enfermedad presente en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	45
4.1	Por ciento de infección del virus involucrado en el síndrome chino del chile inoculado con <i>B. tabaci</i> en genotipos en etapa de plántula y floración	47
4.2	Detección de virus por el método de ELISA en especies de maleza y cultivo de chile colectadas del ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.....	53
4.3	Detección de geminivirus por el método de hibridación con sondas del genoma A y B del TPGV-Coah. en plantas colectadas en el ejido La Leona de Ramos Arizpe, Coah.	55
4.4	Plantas hospederas de especies de mosquita blanca en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah	56
4.5	Incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en diferentes etapas fenológicas y épocas de siembra de chile en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pagina
3.1	Representación diagramática de un tipo de geminivirus bipartita. Los fragmentos de lectura abierta (AR1, BR1, AL1, AL2, AL3y BL1) están representados por flechas y la región común (CR) por una barra sólida. Se muestra la región del ADN viral amplificado por PCR con el par de iniciadores para ADN-A (PAL1v 1978 y PCRe1) y con un par de iniciadores para el ADN-B (PBL1v 2040 y PCRe1)	39
3.2	Croquis del lote elegido para determinar la importancia de las fuentes de inóculo	43
4.1	Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de plántula inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	48
4.2	Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de floración inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	49
4.3	Análisis electroforético en gel de agarosa de la amplificación por PCR del virus presente en Ramos Arizpe, Coah. Línea 1: Genoma A (0.8 Kb) amplificado con el par de iniciadores PAL1v 1978 y PCRe1; línea 2 Genoma B (0.5 Kb) amplificado con el par de iniciadores PBL1v 2040 y PCRe1, línea 3 Marcador de peso molecular	52
4.4	Croquis del lote fraccionado con datos analizados de Norte a Sur para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	58
4.5	Croquis del lote fraccionado, con datos analizados de Este a Oeste para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	59
4.6	Medias de altura de genotipos en etapa de plántula inoculados con	

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Pagina
3.1	Representación diagramática de un tipo de geminivirus bipartita. Los fragmentos de lectura abierta (AR1, BR1, AL1, AL2, AL3y BL1) están representados por flechas y la región común (CR) por una barra sólida. Se muestra la región del ADN viral amplificado por PCR con el par de iniciadores para ADN-A (PAL1v 1978 y PCRc1) y con un par de iniciadores para el ADN-B (PBL1v 2040 y PCRc1)	39
3.2	Croquis del lote elegido para determinar la importancia de las fuentes de inóculo	43
4.1	Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de plántula inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	48
4.2	Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de floración inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	49
4.3	Análisis electroforético en gel de agarosa de la amplificación por PCR del virus presente en Ramos Arizpe, Coah. Línea 1: Genoma A (0.8 Kb) amplificado con el par de iniciadores PAL1v 1978 y PCRc1; línea 2 Genoma B (0.5 Kb) amplificado con el par de iniciadores PBL1v 2040 y PCRc1, línea 3 Marcador de peso molecular	52
4.4	Croquis del lote fraccionado con datos analizados de Norte a Sur para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	58
4.5	Croquis del lote fraccionado, con datos analizados de Este a Oeste para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	59
4.6	Medias de altura de genotipos en etapa de plántula inoculados con	

	TPGV-Coah. mediante <i>B. tabaci</i> virulíferas.	62
4.7	Medias de incidencia del TPGV-Coah. de genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de plántula inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	63
4.8	Medias de severidad del TPGV-Coah. de genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de plántula inoculados con <i>B. tabaci</i> virulíferas.	64
4.9	Medias de altura de genotipos en etapa de floración inoculados con TPGV-Coah. mediante <i>B. tabaci</i> virulíferas.	66
4.10	Medias de incidencia del TPGV-Coah. de genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de floración inoculados mediante <i>B. tabaci</i> virulíferas.	67
4.11	Medias de severidad del TPGV-Coah. de genotipos de <i>C. annuum</i> en etapa de floración inoculados mediante <i>B. tabaci</i> virulíferas.	68
4.12	Medias de severidad de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de <i>C. annuum</i> establecidos en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	70
4.13	Medias de incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de <i>C. annuum</i> establecidos en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.	71
4.14	Medias de severidad de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de <i>C. annuum</i> establecidos en el ejido La Gamusa, Ramos Arizpe, Coah.	73
4.15	Medias de incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de <i>C. annuum</i> establecidos en el ejido La Gamusa, Ramos Arizpe, Coah.	74

INTRODUCCION

El chile (*Capsicum* spp) se considera de gran importancia por su valor económico ya que ocupa el quinto lugar entre los cultivos de exportación (Gómez, *et. al.* 1991), genera empleos y forma parte de la dieta alimentaria del mexicano. El cultivo de las especies de *Capsicum* es afectado por diversos factores que limitan y/o afectan la producción, entre estos sobresalen los de tipo fitosanitario, siendo las enfermedades virales causantes de serias pérdidas en los últimos años.

En México los primeros reportes de virus que afectaron el cultivo del chile datan de 1971 (Rodríguez, 1971), actualmente las virosis son el factor más importante que afecta el rendimiento y calidad del fruto en todas las áreas productoras del país. Los virus transmitidos por mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gennadius son de particular importancia ya que para el control de este vector, y de otras plagas y enfermedades se ha recurrido al uso intensivo e indiscriminado de plaguicidas lo cual ha originado una fuerte presión de selección, incrementando así poblaciones de mosquita blanca resistentes a plaguicidas y provocando severos desequilibrios ecológicos e incremento de los costos del cultivo.

Debido a la situación anterior, las enfermedades virales representan en la actualidad uno de los retos más serios e importantes en los sistemas de producción de los

diversos cultivos en el mundo y en especial en México.

La región de Ramos Arizpe, Coahuila no escapa a esta problemática ya que las estadísticas de los últimos años muestran un incremento de siniestros en el cultivo del chile, a tal grado que muchos productores se han visto en la necesidad de emigrar a las ciudades.

En virtud de la problemática que viven los productores y considerando que no existen viricidas para el control de estas enfermedades solo queda como solución viable el Manejo Integrado del problema considerando al patógeno, el vector, los hospederos y su ambiente. Esta investigación se realizó para generar información básica que bien pudiera formar parte de las estrategias de un programa de manejo integrado y de esta manera reducir las pérdidas causadas por la enfermedad a bajos costos y mejorar la calidad del producto, así como del medio ambiente, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Identificar la especie de mosquita blanca vectora del síndrome chino del chile.
- b) Determinar el periodo de incubación del síndrome del chile inoculado en diferentes etapas fenológicas de *C. annuum*.
- c) Identificar el virus asociado al síndrome chino del chile.
- d) Determinar fuentes de inóculo del virus asociado a la enfermedad y su importancia pa -

ra el desarrollo de la epidemia.

e) Determinar la incidencia del síndrome del chino del chile en el ejido La Leona de Ramos Arizpe, Coahuila.

f) Determinar el grado de resistencia al síndrome del chino del chile en cinco genotipos de *C. annuum*.

REVISION DE LITERATURA

Antecedentes

El chile (*Capsicum annuum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, su centro de origen es América del Sur en la región sureste de Perú y Bolivia; puede encontrarse desde el sureste de los Estados Unidos (chile piquín de Texas) hasta la Argentina central. Los chiles son un alimento popular en muchos países ya que son excelente fuente de vitaminas A y C, y bajos en calorías, además de su valor medicinal (Villalón, 1981).

Las enfermedades constituyen una gran limitante en la producción del cultivo del chile, ya que puede llegar a ocasionar pérdidas hasta del 100 por ciento. En la actualidad existen regiones donde ha desaparecido el cultivo a causa de enfermedades virales (Garzón, 1988).

Aunque las enfermedades transmitidas por mosquitas blancas son consideradas económicamente importantes son muy pocos los informes acerca de pérdidas. Las pérdidas por virus transmitidas por mosquita blanca sobre el cultivo del chile básicamente son severas (60-100 por ciento de pérdidas en la producción) cuando la infección ocurre en etapas tempranas y limitadas (20 por ciento) cuando las infecciones ocurren en estados tardíos (Nene y Komal, 1981).

Los daños por enfermedades virales en chile, han sido reportados en Arizona, California, Florida, Hawaii, Iowa, Luisiana, New Jersey y North Carolina y en varios

países donde se incluye a Brasil, Colombia, India, Israel, Japón, Corea, México y Puerto Rico (Villalón, 1981).

Villalón (1981), menciona que son aproximadamente 36 diferentes enfermedades de etiología viral que atacan al chile, pero no todas han sido identificadas y caracterizadas. Algunas son responsables de pérdidas que van de moderadas a altas en la producción de chile. Algunos de estos virus son: virus mosaico del pepino (CMV), virus moteado del chile (PMoV), virus Y de la papa (PVY), virus jaspeado del tabaco (TEV), virus mosaico del tabaco (TMV) y virus mancha anular del tabaco (TRSV).

Stenger, *et al.* (1990), observaron en Texas una nueva enfermedad del chile (*C. annuum* L) en Noviembre de 1987. Las plantas afectadas mostraron síntomas de rizado y distorsión de hojas que sugirió una etiología viral. La presencia de la enfermedad fue asociada con altas poblaciones de mosquita blanca *Bemisia tabaci* Genn., un insecto vector de geminivirus (Duffus, 1987).

En México, Garzón, *et al.* (1993), mencionan que las enfermedades desconocidas de origen viral han aparecido en casi todas las áreas productoras agrícolas en los últimos tres a cuatro años, a pesar de que en algunos casos sus etiologías permanecen desconocidas, comparten la característica de ser transmitidas por mosquitas blancas (*B. tabaci* Genn.).

Vega, *et al.* (1989) mencionan que los virus reportados en plantas de chile en México son el mosaico del tabaco (TMV), mosaico del pepino (CMV), el virus Y de la papa (PVY), mancha anular del tabaco (TRSV), la planta atigrada del chile o pepper mild tigre (PMTV) y una enfermedad viral transmitible por mosquita blanca.

En el período comprendido de 1986 a 1988, Pozo y Montelongo (1988) y Pozo y Quintero (1988) observaron infestaciones severas de geminivirus en chile dulce, acompañados de grandes densidades de *B. tabaci* en la parte Este de la costa de Tamaulipas, México y el Valle del Río Grande de Texas, Estados Unidos, observando también otras enfermedades no conocidas sobre variedades de chile dulce.

Por su parte en 1989, Brown y Nelson reportaron dos geminivirus transmitidos por *Bemisia tabaci* atacando chile en Tamaulipas, uno de los cuales fue llamado tentativamente virus atigrado del chile (PMTV). Este virus causa ligeros pero distintivos síntomas en chile, tomate y otros hospederos, además de no transmitirse mecánicamente; el otro virus llamado chino del tomate (CdTV) que años atrás ya había sido identificado por Brown y Hine (1984) y Brown y Nelson (1988), en cultivos de tomate de Sinaloa, causa en chile síntomas ligeros, similares al PMTV, pero severos en tomate. Además se comprobó que no se desarrolla en cucurbitáceas y no se encontró transmisión mecánica ni por semilla.

En el mismo año investigaciones realizadas por Pozo (1989), menciona que la enfermedad conocida como "Rizado amarillo del chile" es producida por los dos geminivirus reportados por Brown y Nelson (1988); sin embargo Garzón *et al.* (1993) y Torres *et al.* (1993) clonaron y caracterizaron molecularmente uno de los dos virus causantes de la enfermedad reportada por Pozo, al cual nombraron virus huasteco del chile (PHV), que ocasiona síntomas severos en comparación del CdTV y PMTV que producen síntomas ligeros en chile. Un segundo geminivirus fue aislado del complejo

viral por estos mismos autores nombrado como virus jalapeño del chile. Además Brown y Nelson (1988) reportaron que el CdTV el cual infecta a frijol, no presenta síntomas en plantas de chile cuando trataron de inocular con mosquitas blancas virulíferas por lo cual Garzón y colaboradores lo eliminan del complejo rizado amarillo del chile.

Brown, *et al.* (1993), mencionan que una enfermedad viral que afectó a tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y chile (*C. annuum* L) en Sinaloa, México en 1989, ahora está extendida por toda la región. Esta enfermedad ocasionó síntomas de rizado y clorosis de hojas así como color morado y entrenudos cortos en tomate, mientras que en hojas de chile provocó un moteado de manchas verdes. Al parecer estos síntomas, difieren de otros virus de la región anteriormente descritos; por lo que fue tentativamente designado como virus chino del tomate de Sinaloa (STLCV). En el Cuadro 2.1 se resume los virus que atacan al chile en México, caracterizados y en proceso de caracterización.

Cuadro 2.1 Virus caracterizados y en proceso de caracterización que atacan al chile de México.

CARACTERIZADOS	CARACTERIZACION PARCIAL
Virus Mosaico del Tabaco	Planta Atigrada del Chile
Virus Mosaico del Pepino	Virus Chino del Tomate de Sinaloa
Virus Y de la Papa	
Virus Mancha Anular del Tabaco	
Virus Chino del Tomate	
Virus Huasteco del Chile	
Virus Texano del Chile o Virus Jalapeño del Chile	

Mosquitas Blancas

Características de Mosquitas Blancas

Las mosquitas blancas pertenecen a la familia Aleyrodidae del orden Homoptera, bajo condiciones favorables puede completar de 11 a 15 generaciones en un año y las hembras pueden depositar de 100 a 300 huevecillos durante tres a seis semanas. Cuatro de los cinco instares son poco móviles o completamente inmóviles (sésiles) sobre planta hospedera, por lo que el adulto es el único estado importante en la transmisión de enfermedades virales (Brown y Bird, 1992); no obstante Lastra y Gálvez (1986), mencionan que las pupas localizadas en tejidos infectados son capaces de transmitir virus.

El adulto tiene alas blancas, apéndices y cuerpo de color amarillo, mide en promedio 0.93 mm de longitud por 0.27 mm de ancho, presenta tarsos de dos artejos y antenas de siete segmentos (Ortega y González, 1989).

La identificación de la mosquita blanca se basa en el orificio basiforme y se realiza en ninfas de cuarto instar, también denominadas "pupas". Las pupas son de color blanco, el cuerpo es elipsoidal, superficie dorsal convexa y el orificio vasiforme triangular en *B. tabaci* (Martin, 1987)

Brown y Bird (1992), mencionan que la mosquita blanca se encuentra entre las

principales plagas que afectan una gran diversidad de cultivos y vegetación silvestre, y que la alimentación de ninfas y adultos causa detención del crecimiento y marchitamiento del follaje, aunque el daño más importante se debe a su capacidad para transmitir virus fitopatógenos.

Por otra parte el número de especies de mosquitas blancas reconocidos como vectores de virus fitopatógenos está reducido a solamente tres: *Bemisia tabaci* Gennadius, *Trialeurodes abutilonea* (Haldeman) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Entre estas especies, *B. tabaci* es la especie más significativa en cuanto a su habilidad para transmitir virus fitopatógenos, ya que es la única de las tres especies anteriormente citadas capaz de diseminar geminivirus (Bird, 1986), por lo que se le reconoce como vector de más de 25 enfermedades diferentes que en muchos casos han sido reportados como circulativos o transovárica negativa, con cierto grado de especificidad entre el insecto y el agente causal (Costa, 1976).

Costa (1976) menciona que a altas temperaturas *B. tabaci* aceleran el ciclo biológico, incrementando su densidad poblacional más rápidamente y con ello la dispersión de la enfermedad. Sin embargo la dispersión depende más de la migración de la mosquita blanca y la existencia de reservorios adecuados. Aunque no existen evidencias documentadas de grandes migraciones de mosquitas blancas, como las que ocurren en otros Homopteros, los grandes desplazamientos en general están mediados por las actividades humanas y por medio del viento (Byrne, *et al.* 1991).

Hospederos de *B. tabaci*

La mosquita blanca tiene un gran número de hospederos alternantes ya sea de tipo ocasional, donde solo se alimenta y posiblemente obtenga el virus; y hospederos completos donde se reproducen e incrementa sus poblaciones (Terán y Cruz, 1991).

B. tabaci es un polífago que ataca a 506 especies de plantas de 74 familias (Dicotiledóneas y Monocotiledóneas) reportadas como hospederas. Por ejemplo, 96 especies hospederas han sido reportadas para la familia Fabaceae, 56 para Compositae, 35 para Malvaceae, 33 para Solanaceae, 32 para Euphorbiaceae, 20 para Convolvulaceae y 17 para Cucurbitaceae (Brown y Bird, 1992; Bird y Maramorosch, 1978). Al respecto Goodman e Irwin (1981), mencionan que mas de 10 familias de plantas son afectadas, pero las mas comúnmente involucradas son las Leguminosae, Malvaceae y Solanaceae, dentro de éstas, muchas especies no cultivadas juegan un papel muy importante en la epidemiología de muchos geminivirus en forma natural.

Terán y Cruz (1991), en un estudio realizado, en el sur de Tamaulipas, determinaron que la mosquita blanca se hospeda en diversas plantas cultivadas y no cultivadas que posteriormente migran a las plantaciones de chile transmitiendo la enfermedad rizado amarillo del chile.

Por otra parte Costa (1976), menciona que la soya, la planta de noche buena, papa y otros cultivares y malezas han sido reportadas como excelentes hospederas de alimenta-

ción de *B. tabaci*. Estas especies bajo condiciones de cultivo incrementan la densidad poblacional de mosquitos blancos sobre hospederos de vegetación natural. Así estos cultivares anuales o perennes aumentan la conservación de los insectos en malezas entre periodo de cultivos sucesivos por lo tanto una alta incidencia de enfermedades incidirá en nuevas plantaciones aun para cultivos que no son buenos hospederos para el insecto vector.

Geminivirus

Características de Geminivirus

Goodman (1981), menciona que los geminivirus fueron reconocidos en 1978 por el International Committee on the Taxonomy of Viruses en base a su morfología única del virión y por poseer ADN de cadena sencilla en su material genómico.

Los geminivirus son un grupo de virus de plantas que contiene cadenas simples de ADN (ADNss), durante la infección se sintetiza un intermediario de la replicación de doble cadena (ADNds) o (RF ADN) y esta característica ha facilitado la caracterización molecular. Muchos geminivirus han sido clasificados dentro de tres subgrupos, de acuerdo a su rango de hospederos, insecto vector y organización del genoma. El primer subgrupo está comprendido por geminivirus que infectan monocotiledóneas, son transmitidos por chicharritas y poseen solamente una molécula de ADN de cadena sencilla (ADNss - Monopartita). El segundo subgrupo son los geminivirus que infectan

Dicotiledóneas y son transmitidas por chicharritas y son monopartita. El tercer subgrupo incluye geminivirus que son transmitidos por mosquitas blancas, infecta Dicotiledóneas y tienen un genoma dividido en dos moléculas de ADNss (bipartita) (Martelli, 1992 y Davies y Stanley, 1989).

Los geminivirus tienen capsides icosaédricas (Duffus, 1987, Goodman, *et al.*, 1977) de 18 nm, las cuales están en pares. Muchas poseen una simple proteína mayor con un peso molecular en el rango de 2.7 a 3.4×10^4 . El ácido nucleico es de una o dos molécula(s) circular(es) de cadena sencilla de ADN con peso molecular alrededor de 8.0×10^5 (Duffus, 1987) y un tamaño de 2.6 Kb para geminivirus monopartitas y alrededor de 5.2 Kb para bipartitas (Brown y Bird, 1992). Los genomas se replican vía doble cadena, la forma replicativa supercoloidal (RF) del ADN no es encapsidada y puede ser aislada de plantas infectadas (Sunter, *et al.*, 1985). La forma replicativa (RF) de ADN de geminivirus, ha sido clonado en plasmidos vectores de *Escherichia coli* (Morinaga, *et al.*, 1988), y los genomas clonados pueden ser infecciosos cuando son inoculados mecánicamente a plantas hospederas (Hamilton, *et al.*, 1983) o cuando son bombardeados con microparticulas (Balística) (Rivera, 1995).

Síntomas Causados por Geminivirus

Los efectos o manifestaciones patológicas producidos por los virus, son de gran importancia dentro de la fitopatología debido a: por medio de síntomas se reconocen las plantas enfermas de las sanas, para determinar la incidencia de estas enfermedades a ni -

vel de campo, valorar algunos efectos de severidad de la enfermedad, para el combate de estas enfermedades, los síntomas auxilian a la eliminación de las plantas enfermas que actúan como fuente o reservorio de inóculo y en las pruebas de caracterización o identificación de estos patógenos a través de sintomatologías típicas en plantas indicadoras o diferenciales. A pesar de la importancia de los síntomas, en muchos de los casos, son confundibles, ya que un virus puede manifestarse con síntomas muy diferentes en una misma planta, dependiendo de la variedad de la planta, efecto de la temperatura, edad de la planta al momento de la infección, fertilización, riegos, fotoperíodo, etc. (SARH 1992).

Como en otros grupos de virus, los geminivirus inducen efectos fitopatológicos en tejidos infectados, como un resultado de la multiplicación viral. La replicación viral se lleva a cabo en células jóvenes del floema, lo que da lugar a los primeros síntomas de la infección, como hiperplasia y la presencia de bandas fibrilares en el núcleo de células infectadas (Lastra y Galvez, 1986).

El grupo geminivirus provoca síntomas de variegación o tipo rizado de hojas sobre plantas susceptibles y son persistentes en sus vectores (Duffus, 1987). Por otro lado Maramorosch y Muniyappa (1981), observaron que la enfermedad hoja rizada del Chile transmitida por mosquera blanca presentó rizado de hojas, acompañado por áreas intervenales rugosas y globosas, un aumento y levantamiento de las venas, los brotes auxiliares ramificados y reducidos de tamaño.

Yañez (1987) demostró que los síntomas de plantas de Chile con rizado amarillo

principalmente y en menor grado con otros virus en los que identificó al virus jaspeado del tabaco fueron: achaparramiento de la planta debido a una reducción del 41 por ciento en la longitud de los entrenudos, distorsión foliar caracterizada por hojas pequeñas en forma redondeada y hojas en forma de cuchara con la nervadura central distorsionada en forma sinuosa del ápice hasta la mitad de la hoja, así como mosaico de follaje que va del amarillo al pálido intenso y además aborto de flores.

En la enfermedad "rizado amarillo del chile", los síntomas característicos descritos por Garzón, *et al.* (1991), son aclaramientos de las nervaduras, mosaico amarillo, enchinamiento de las hojas y achaparramiento de la planta.

Hospederos de Geminivirus

Los hospederos son importantes: a) como fuentes de inóculo viral primario, b) reservorios de ciertas especies de insectos potencialmente vectoras y c) como fuente de alimentación (SARH, 1992)

Costa (1976), menciona que las enfermedades transmitidas por mosquita blanca han sido reportadas principalmente sobre plantas herbáceas y muy raro en arbustos y árboles.

Bird y Sánchez (1971) y Costa (1976) por su parte mencionan que las plantaciones viejas así como plantas voluntarias y principalmente malezas susceptibles,

son generalmente la fuente de inóculo de donde las mosquitas blancas vectores adquieren el virus y lo introducen a nuevas plantaciones.

Costa (1976) menciona que partículas virales, que son fácilmente adquiridos por *B. tabaci* de cultivos infectados, pueden ser ampliamente diseminados por el vector a plantaciones sanas y pueden inducir grandes pérdidas. Sin embargo los cultivos pueden variar ampliamente en su eficiencia como reservorios de la enfermedad y en la susceptibilidad a la infección.

Stenger, *et al.* (1990), determinaron que el rango de hospederos para el Virus Texano del chile (TPGV) está restringido a especies de la familia de Solanáceas (*Capsicum. annuum* L., *Datura stramonium* L., *Lycopersicon. esculentum* Mill, *L. peruviano* (L.) Mill, *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* Gray, *N. rustica* L., *N. tabacum* L. y *Physalis wrightii* Gray).

En Sonora, México fue aislado de plantas de tomate un virus semejante al chino del tomate de Sinaloa, de partículas geminadas y transmitido por mosquita blanca. Resultados preliminares del estudio de rango de hospederos indican que el virus infecta principalmente especies de Leguminosae y Solanaceae (Brown, y Hine, 1984). Brown, *et al.*, (1993) publicaron que el virus chino del tomate de Sinaloa es experimentalmente transmisible de tomate a: tomate, chile, berenjena (*Solanum melongena* L) y *Malva parviflora* L por la mosquita blanca *B. tabaci* Genn. y por medio mecánico de tomate a tabaco.

En malezas encontradas dentro de cultivos de chile en el Noroeste de Georgia, Benner, *et al.* (1985), detectaron plantas con síntomas de virosis. Entre los virus presentes se detectó el virus jaspeado del tabaco en cuatro especies de Solanaceae *Solanum carolinense*, *S. nigrum*, *Nicotiana physalodes* y *Datura stramonium*; el virus mosaico del pepino en *N. physalodes*; y los virus moteado del chile, virus Y de la papa y el virus mosaico del tabaco no fueron detectados en las muestras. Además las especies *S. carolinense* y *S. nigrum* con síntomas de virosis se encontraban dentro y periferia de cultivos de chile.

Relación Entre Geminivirus

Stenger, *et al.* (1990), reportaron que el geminivirus texano del chile (TPGV) es semejante a TGMV (virus mosaico dorado del tomate) en el rango de hospederos, el cual está restringido a especies Solanaceas, y además ambos se transmiten mecánicamente; aunque el ADN A de ambos virus presentan alta homología en la secuencia de nucleótidos. En el ADN B, encontraron diferencias detectables por lo que indicaron que TPGV y TGMV son virus diferentes.

Relaciones similares entre los genomas de diferentes geminivirus han sido descritas por Roberts, *et al.* (1984), quienes realizaron hibridaciones del ADN B únicamente entre cepas del mismo virus. Diferencias entre el TPGV y otros geminivirus transmitidos por mosquita blanca como: virus rizado del tabaco (Stenger, 1990), chino del tomate (Brown y Nelson, 1988), rizado amarillo del tomate (Czosnek, *et al.*, 1988) y ati-

grado del chile (Brown, *et al.*, 1989) están basados en el rango de hospederos que a pesar de que todos comparten especies solanáceas, el TPGV no puede infectar otras especies no solanáceas, las cuales si pueden ser infectadas por los virus anteriormente mencionados y además de que aparentemente estos se transmiten mecánicamente.

Rivera, (1995) mostró por análisis de secuenciación del ADN que el virus jalapeño del chile (PJV) y el geminivirus texano del chile (TPGV), son el mismo virus y que este virus junto con el virus huasteco del chile (PHV) están involucrados en el complejo rizado amarillo del chile.

Garzón, *et al.* (1993), mencionan que el virus huasteco del chile (PHV) difiere de otros virus que pudieran estar involucrados en el complejo rizado amarillo del chile de Tamaulipas, como el virus mosaico dorado serrano (SGMV) (Brown y Poulos, 1990), el geminivirus texano del chile (TPGV) (Stenger, *et al.* 1990) y el chino del tomate (CdTV) por la falta de transmisión mecánica. Además los mapas de restricción con el TPGV son diferentes y la severidad inducidas por PHV difieren del virus del chino del tomate (CdTV) y el virus atigrado del chile (PMTV) (Brown y Nelson, 1988 y Brown, *et al.*, 1989), ya que ambos producen síntomas ligeros en chile. Se ha determinado que tanto el PHV y el TPGV variante Tamaulipas (Rivera, 1995) están involucrados en el complejo rizado amarillo del chile

Sin embargo Brown, y Poulos (1990) en pruebas de hibridación molecular de plantas de tomate y chile con síntomas de rizado, mosaico amarillo brillante o clorosis in-

tervenal, obtuvieron para tomate hibridaciones con sondas de ADN para el componente A del virus mosaico dorado del frijol (BGMV), chino del tomate (CdTV) y mosaico dorado del tomate (TGMV); y en Chile resultaron positivas en estudios citológicos y de hibridación con sondas del BGMV y el CdTV, aunque esta información no es suficiente para concluir que ambos estén involucrados en el complejo viral.

El virus mosaico dorado serrano (SGMV) se diferencia del virus moteado del tomate (TMoV) por la capacidad de atacar Chile (*Capsicum annuum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y la maleza *Datura stramonium* L. mientras que TMoV solo a tomate (Polston, *et al.*, 1993). En el Cuadro 2.2 se resume las relaciones entre geminivirus.

Relación Vector-Agente Causal

Transmisión

Watson y Roberts (1939), propusieron una clasificación de la forma de transmisión dependiendo del tiempo de sobrevivencia del virus en el insecto, llamándoles no persistentes y persistentes. En el primer caso la sobrevivencia del virus en el insecto es corta, la capacidad virulenta se pierde en el proceso de alimentación y el virus es acarreado en la parte externa del estilete. En el segundo caso la sobrevivencia es más prolongada (días, semanas o meses), el virus pasa a la parte interior del insecto y no se pierde en el proceso de alimentación. En algunos casos, las transmisiones vectoriales

Cuadro 2.2 Relaciones entre geminivirus.

VIRUS	HOSPEDEROS	TRANSMISION	SINTOMAS EN CHILE
Virus Texano del Chile	Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	Severo
Virus Mosaico Dorado del Tomate.	Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	Ligero
Virus Rizado del Tabaco.	Solanaceae y otras no Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	*
Virus Chino del Tomate	Solanaceae y otras no Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	Ligero
Virus Rizado Amarillo del Tomate.	Solanaceae y otras no Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	*
Virus Atigrado del Chile.	Solanaceae y otras no Solanaceae	<i>B. tabaci</i> y Mecánica	Ligero
Virus Huasteco del Chile	Chile y tomate	<i>B. tabaci</i>	Severo
Virus Mosaico Dorado Serrano	Tomate, Chile y <i>Datura stramonium</i>	<i>B. tabaci</i>	Severo
Virus Moteado del Tomate	Tomate, no Chile y <i>D. stramonium</i>	<i>B. tabaci</i>	----

* No se reporta.

— No hay síntomas

comparten características de ambos grupos por lo que reciben el nombre de semipersistentes, cuyas características son de que el insecto deja de transmitir al virus después de varios días y un incremento de minutos u horas en el periodo de adquisición corresponde a un incremento en el porcentaje de transmisión y a un periodo de retención

más prolongado.

Para evitar los riesgos de error que conlleva el catalogar las formas de transmisión en base al periodo de retención y a la vez ser más precisos en el mecanismo de transmisión, la mayoría de los investigadores han optado por clasificar estos en circulatorios (persistente) y no circulatorios (no persistente o de estilete).

En el caso del circulatorio, Duffus (1987), menciona que en el proceso de transmisión, el virus es adquirido por alimentación del insecto sobre una planta enferma y generalmente del floema. El virus al ser ingerido pasa por el tracto digestivo a la hemolinfa, posteriormente atraviesa la membrana de las glándulas salivales y es inyectado junto con la saliva. Algunos virus muestran una mayor asociación con su vector y antes de ser inyectados pasan a un tejido del insecto donde se replican, denominándose propagativos; dentro de estos existen algunos capaces de infectar células embrionarias de donde son transmitidos transováricamente a la descendencia (Sylvester, 1980).

En el caso de la transmisión no circulatoria, las partículas virales no pasan al tracto digestivo y hemolinfa del insecto, sino que se adhieren en forma específica a ciertos sitios de la cutícula que reviste el estilete, la faringe o el esófago (Berger y Pirone, 1986).

El grupo geminivirus es transmitido en forma natural por chicharritas o por *B. tabaci* (Gámez, 1971) la transmisión por ambos vectores es por un mecanismo circulatorio o persistente (Nitzany, *et al* 1964; Duffus, 1987 y Brown y Bird, 1992).

Como grupo estas enfermedades se transmiten con dificultad en forma mecánica o no lo hacen, sin embargo el virus mosaico de *Euphorbia* fue transmitido mecánicamente a *E. prunifolia* y *Datura stramonium*. Es fácil entender la dificultad en la transmisión mecánica de enfermedades de enchinamientos o amarillamientos, asociados con mosquitas blancas, ya que el agente causal puede estar restringido a tejido interno del floema (Lazarowitz, 1992). En enfermedades de mosaicos, donde el tejido superficial del parénquima es afectado, la transmisión mecánica es más factible (Costa y Bennett, 1950).

Por otra parte la transmisión por semilla de geminivirus ha sido reportada en muy pocos casos y estos resultados no se han confirmado (Keur, 1933).

Períodos de Adquisición, Latencia, Inoculación y Persistencia en *B. tabaci*

Para que se lleve a cabo la transmisión vectorial, es necesario que se cumplan diversos periodos como son: Periodo de adquisición, periodo de latencia, periodo de transmisión y el periodo de persistencia o retención.

El Periodo de adquisición, se refiere al tiempo que ocupa el biotransmisor durante el proceso de "prueba" o alimentación para lograr adquirir al virus del hospedero enfermo. El Periodo de latencia, es el tiempo que dura el virus en recorrer la parte interna del biotransmisor, incluyendo algunos casos, el tiempo necesario para multiplicarse dentro del vector y tener la capacidad de ser transmitido. El Periodo de transmisión o inoculación, es el tiempo que ocupa el biotransmisor para depositar las partículas virales

en el hospedero, fenómeno que se da en el proceso de "prueba" o alimentación. El Periodo de persistencia o retención, es el tiempo que dura el vector con la capacidad de transmitir enfermedad (SARH, 1992).

Después de numerosos trabajos se ha observado que estos periodos son muy variables, pues depende del virus, tiempo de transmisión, fuente de inóculo, temperatura a la cual se lleva a cabo la transmisión, edad de la planta a inocular, variedad, entre otros. Por ejemplo Brown y Bird (1992) observaron que para el periodo de adquisición de muchos geminivirus, se requiere que el insecto se alimente de la planta enferma por un periodo de 2 a 24 horas. Para la transmisión se requiere que el insecto se alimente en la planta hospedera del virus por dos o tres días. Usualmente la transmisión ocurre después de un periodo latente de 4 a 10 horas, después de la adquisición la mosquita blanca puede transmitir virus por 5 a 20 días, con la pérdida gradual en la eficiencia de transmisión a través del tiempo.

Por su parte Duffus (1987) menciona que los virus son adquiridos por mosquitas blancas en un periodo corto de 10 minutos, pero la eficiencia de transmisión se incrementa con periodos de alimentación arriba de 24 horas, así mismo el periodo de inoculación de 10 minutos son adecuados para la infección. No obstante la eficiencia de transmisión se incrementa con periodos de inoculación más largos y que los periodos latentes entre la adquisición del virus y la habilidad de los insectos para transmitir a varias plantas varía de 4 a 21 horas.

Rom, *et al.* (1993), señala que para transmitir el virus rizado amarillo del tomate

(TYLCV) utilizaron hembras de *B. tabaci* a las cuales dieron un periodo de adquisición de 48 horas sobre *Datura stramonium* infectadas con TYLCV y posteriormente un periodo de inoculación de 48 horas sobre plantas de tomate en el estado de plántula con dos hojas verdaderas, utilizando 40 mosquitas blancas por planta, como lo describieron Pilowsky y Cohen (1990).

El empleo de 50 insectos con un periodo de adquisición de 48 horas y de inoculación de 24 horas, es suficiente para garantizar excelentes porcentajes de transmisión con cualquiera de los virus propagados por mosquitas blancas (Bird, 1986).

Stenger, *et al.* (1990), utilizaron poblaciones de *B. tabaci*, las cuales transmitieron la enfermedad TPGV, los primeros cuatro días después de la adquisición. Después de este periodo fueron pocas las poblaciones que siguieron transmitiendo el TPGV, ya que a los 11 días después de la adquisición solamente el 10 por ciento de las poblaciones transmitieron el virus.

Uzcategui y Lastra (1978), determinaron que es necesario un periodo de dos horas como mínimo para que *B. tabaci* adquiera el virus mosaico amarillo del tomate. A su vez requiere un periodo de latencia de 20 horas para transmitir la enfermedad a plantas sanas manteniéndose infectivas siete días como máximo y posteriormente disminuye su eficiencia en los siguientes días. También mostraron que la eficiencia de la mosquita blanca para transmitir la enfermedad fue de 93 por ciento cuando las colocaron a una temperatura de 30 a 34° C y el 75 por ciento cuando se colocaron de 20 a 30° C.

El adulto de mosquita blanca generalmente requiere un periodo mínimo de 10 a 15 minutos o más para adquirir el virus de plantas enfermas. Esto es probablemente porque lo adquieren principalmente del floema y el insecto necesita un mínimo de 10-30 minutos para alcanzar la región del mesófilo con su estilete y seguir el curso intercelular (Costa, 1976). En el caso de la enfermedad amarillamiento venal del pepino *B. tabaci* requirió 20 minutos para la adquisición del virus el cual es semipersistente y 60 minutos entre la adquisición y la transmisión. Esto indica que el vector tiene un mecanismo circulativo rápido o que el virus lo lleva en el estilete (Costa, 1976).

Duffus (1987), determinó el tiempo de retención de los virus mosaico de *Euphorbia*, mosaico dorado del frijol, rizado del tabaco, rizado del pepino y otros geminivirus transmitidos por mosquitas blancas, fue de 20 o más días.

La importancia que tiene reconocer los mecanismos de transmisión, su clasificación y otras características propias, radica en que es la base de los principios de manejo integral de éstas enfermedades. Por ejemplo en la lucha química contra el vector es importante determinar los diferentes periodos, puesto que en los virus no persistentes o de estilete no existe un periodo de latencia o incubación y la lucha mediante agroquímicos resulta prácticamente imposible. Mientras que en algunos virus circulativos, persistentes o transováricos, podríamos tener oportunidad de romper los ciclos de estas enfermedades si combatimos oportunamente al vector. Por otro lado, la lucha mediante el mejoramiento genético puede establecerse tanto dirigida al virus como el vector (SARH, 1992).

Factores que Afectan la Transmisión

Costa (1976), menciona que el periodo de alimentación que requieren las mosquitas blancas para transmitir las enfermedades Bendi yellow vein mosaic virus y yellow vein mosaic virus of *Abelmosvhus esculentus* (L) Moench es más corto que el que se requiere para la adquisición. Interpretando esto al parecer depende más del tiempo que tarde el estilete del vector en llegar al floema o al tejido superficial infectado. Otra interpretación que dieron fue que para ser infectivo, el vector tiene que alimentarse por un periodo largo, para adquirir suficiente agente causal para incrementar la probabilidad de transmisión cuando se alimenta de una planta sana.

Durante la alimentación para la infección, una o pocas partículas virales colocadas en el tejido de la hoja podrían ser suficiente para iniciar la infección. Sin embargo la transmisión eficiente por vectores individuales varía con la enfermedad concerniente, fuente de inóculo y planta a inocular (Costa, 1976).

La infectividad del vector *B. tabaci* es atribuido a la formación periódica en el cuerpo del insecto de factores inhibidores que afectan directa o indirectamente al virus rizado amarillo del tomate. Otro trabajo realizado, de esta misma enfermedad en el cual lograron transmitir el virus mecánicamente, cuando el inóculo provenía de plantas enfermas de *Nicotiana glutinosa*, *Physalis* sp. y *Datura stramonium* pero no se transmitía cuando la fuente de inóculo provenía de tomate (Costa, 1976).

Se ha demostrado que en muchas ocasiones la mosquita blanca como vector es

eficiente en la transmisión del agente causal cuando lo adquiere de ciertas plantas silvestres como reservorio, pero transmite erráticamente dentro del cultivo (Costa, 1976).

Costa y Bennett (1950), mencionan que en pruebas de resistencia del tomate a los virus mosaico *Euphorbia* y mosaico dorado del tomate en Brasil los agentes causales fueron mejor transmitidos por *B. tabaci* alimentados de hojas jóvenes que cuando se alimentaron de cotiledones. En cuanto a inoculación mecánica, las hojas jóvenes fueron más susceptibles a la infección que los cotiledones.

Período de Incubación de las Enfermedades Causadas por Geminivirus

Stenger, *et al.* (1990), inocularon con TPGV a las especies *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Physalis wrightii*, *Datura stramonium* y *Capsicum annuum* los cuales desarrollaron síntomas sistémicos de dos a tres semanas después de la inoculación.

Por su parte, Polston, *et al.* (1993), inocularon el virus moteado del tomate a *Lycopersicon cheesmanii*, *L. chilense*, *L. esculentum* var *esculentum*, *L. hirsutum* f. *glabratum*, *L. pennellii*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium*, *Nicotiana benthamiana*, *N. edwarsonii*, *N. tabacum*, *Physalis wrightii*, *P. alkekengi* y *P. ixocarpa*, apareciendo los síntomas a las cuatro semanas.

Morales, *et al.* (1990) transmitieron mecánicamente el virus mosaico enanismo

del frijol (BDMV) a plantas de frijol con un 100 por ciento de eficiencia desarrollando síntomas característicos de enanismo y mosaico ocho días después de la inoculación. Sin embargo cuando la inoculación con *B. tabaci* de plantas de frijol a *Sida spinosa*, y de *S. spinosa* a *Phaseolus vulgaris* y *S. rhombifolia*, un mes después de la inoculación las plantas de *Sida* spp desarrollaron síntomas de mosaico dorado brillante y 10 días después de la inoculación *P. vulgaris* mostró síntomas de enanismo y mosaico.

Resistencia Genética

Mejoramiento

Villalón (1981), menciona que pueden ser incorporados genes de resistencia e inmunidad a patógenos, de plantas silvestres a cultivares cuando existe compatibilidad, ya que la resistencia mediante el mejoramiento genético, es la solución mas factible para controlar enfermedades de virus de chile.

Métodos de Evaluación

En la región sur de Tamaulipas, Pozo (1989), ha evaluado bajo presión natural de enfermedades virales que se encuentran en la región, gran cantidad de variedades de chile y han observado que la mayoría de los materiales, presentan susceptibilidad al complejo viral existente, dentro de los cuales ha sido identificado un geminivirus. Sin embargo la selección de materiales con algún grado de resistencia a través de varios ciclos les ha

permitido obtener variedades con cierta resistencia e incluso inmunes y con características agronómicas deseables. Esta misma metodología fue utilizada por Benner, *et al.*, (1985), en Georgia, Estados Unidos para detectar resistencia a virus presentes como el TEV, CMV y PVY en líneas de chile.

Por su parte Rom, *et al.* (1993), mencionan que el mejoramiento para resistencia a virus rizado amarillo del tomate (TYLCV) parece ser una propuesta más promisoría para el control de la enfermedad. Para este fin inocularon el virus por medio de *B. tabaci* virulíferas a genotipos de *Lycopersicon esculentum* que en base a la severidad y pruebas de hibridación molecular seleccionaron el material tolerante, encontrando una correlación positiva entre los síntomas de severidad del TYLCV y el nivel de ADN viral. Esto corresponde al concepto general que la titulación más alta de virus promedio ocasiona más daño en las plantas (Ponz y Bruening, 1986). Los resultados y observaciones indicaron que la tolerancia contra TYLCV es caracterizada por baja acumulación de ADN viral, presentando síntomas ligeros y retraso de aparición de ellos. El mecanismo de tolerancia en las líneas de tomate es hasta ahora desconocido, pero los bajos niveles de acumulación de ADN viral puede reflejar una reducción en la capacidad del virus para replicarse y por lo tanto difundirse en el tejido infectado. Este estudio muestra que la acumulación relativa de ADN del TYLCV en plantas de tomate bajo condiciones estandar puede servir como una herramienta segura para complementar la observación de los diferentes grados de severidad en la selección de genotipos tolerantes de tomate.

Relación Edad-Resistencia

Uzcategui y Lastra (1978), inocularon el virus mosaico amarillo del tomate, en plantas de tomate de diferente edad (10, 12, 14, 15, 17, 20, 22, 25 y 27 días de edad), detectando que las plantas más jóvenes son más susceptibles a la enfermedad. La susceptibilidad disminuye gradualmente con la edad, ya que de 10 a 12 días de edad el 90-100 por ciento de las plantas inoculadas se infectaron mientras que a los 26 días solo el 10 por ciento fue infectado.

Costa (1976), comparó las pérdidas en el cultivo del frijol, ocasionadas por el virus mosaico dorado del frijol, en dos fechas de siembra. A los 17 días después de la siembra se produjeron pérdidas cercanas al 57 por ciento, mientras que a los 32 días después de la siembra las pérdidas fueron de 25 por ciento.

Factores que Afectan la Susceptibilidad

Uzcategui y Lastra (1978), determinaron el efecto de temperatura en la susceptibilidad del tomate inoculados con el virus mosaico amarillo del tomate. Sus resultados indican que plantas colocadas de 20 a 30° C la susceptibilidad varía de 55 a 63 por ciento mientras que a temperaturas de 30-34° C esta susceptibilidad se incrementa considerablemente de 92 a 96 por ciento de plantas enfermas. En otro experimento colocaron plantas de tomate inoculadas con el mismo virus bajo oscuridad durante 24 y 48 horas y otras plantas bajo luz (1,200 lux) durante 24 y 48 horas; el 52 por ciento de las

plantas en oscuridad fueron infectadas por el virus mosaico amarillo del tomate y 80 por ciento de plantas infectadas cuando se colocaron en luz.

Wyatt y Kuhn (1979), en un estudio de inoculación del virus moteado clorótico del chicharo (CCMV) a través del uso de plantas jóvenes (siete a nueve días de edad) y de un período de sombreado antes de la inoculación, detectaron que fueron factores benéficos para la infección. Sin embargo el factor más importante fue la concentración del inóculo. Cuando el inóculo fue de 0.1 mg/ml o más alto se obtuvo el número máximo de infección (100 por ciento) y una alta acumulación de virus (aislado por ultracentrifugación). Pero cuando el inóculo fue de 0.001 mg/ml o menos no todas las plantas quedaron infectadas, la acumulación de virus fue reducida significativamente y la primer aparición de virus fue retrasada.

Diagnóstico de Virus Fitopatógenos

La creciente importancia de los geminivirus transmitidos por mosquita blanca hace necesaria la disponibilidad de métodos rápidos y precisos para la detección y subsecuentemente identificación de geminivirus. Estos métodos podrían facilitar estudios de epidemiología y diversidad genética de estos virus. Esta información podría tener importantes implicaciones en designar estrategias para resistencia y control de la enfermedad (Rojas, *et al.*, 1993).

Ensayo de Inmunoadsorción de Enzimas Ligadas (ELISA)

Este método es rápido y seguro para el diagnóstico de enfermedades virales, a pesar de la sensibilidad, ELISA detecta solamente antígenos virales y no mide la infectividad, registra la presencia del complejo antígeno - anticuerpo por un rápido desarrollo enzimático de un producto que colorea (Hampton, *et al.*, 1990).

De acuerdo a Sequeira y Harrison (1982), para los miembros del grupo de los geminivirus, las relaciones serológicas no son claras ni estables.

Inclusiones Virales

Otra metodología es la de Christie y Edwarson (1977), que mediante inclusiones intercelulares (que pueden contener partículas de virus y/u otros productos del genoma viral), producidos por plantas enfermas, en muchos casos pueden ser usadas para la identificación de virus específicos (Christie, *et al.*, 1986).

Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Rojas, *et al.* (1993), mencionan que la reacción de la polimerasa en cadena es una técnica extremadamente sensitiva y específica para la detección e identificación de patógenos en plantas. Puede ser usado para investigar cuestiones precisas acerca de la composición de poblaciones de patógenos y la diversidad genética de virus (Gilbertson, *et al.*, 1991). La especificidad de PCR es basada en el uso de oligonucleótidos que son complementarios a las regiones flanqueadas de la secuencia de la cadena del ácido desoxi

ribonucleico (ADN) al ser amplificada (Rojas, *et al.*, 1993).

Hibridación Molecular

La tecnología de sondas de ADN está basada sobre ADN:ADN hibridado el cual involucra la selección apareada de nucleótidos entre dos cadenas simples de ADNs (ADNss) para formar una molécula de doble cadena de ADN (ADNds) la cual es detectado mediante un film de rayos X, cuando las sondas son marcadas con radiactividad o visualizados por métodos colorimétricos cuando son no radiactivas (DeLong, *et al.*, 1989).

Las sondas de ADN son extremadamente adaptables y ofrece varias ventajas sobre técnicas existentes tales como métodos serológicos donde a) la estructura del ADN es relativamente consistente durante todos los estados fenológicos y condiciones ambientales. Este no es el caso para otras macromoléculas que son usadas en otros ensayos de detección por ejemplo proteínas, carbohidratos y lípidos. b) Las muestras pueden ser fácilmente preparados y son muy estables. c) Porque los patógenos son destruidos en la preparación de la muestra y estas pueden ser enviadas por correo y no presenta riesgos biológicos. d) Pueden desarrollarse sondas generales como también específicas (DeLong, *et al.*, 1989).

Una sonda general puede detectar todos los patógenos procarióticos mientras que una sonda específica pudiera hibridizar solamente con unas especies en articular

(DeLong, *et al.*, 1989). Esto es posible porque los patógenos contienen secuencias de ADN altamente conservadas, como también secuencias divergentes. Cuanto más relacionados estén dos organismos más difícil es el desarrollo de una sonda específica. e) El nivel de sensibilidad es mucho más grande que la técnica rápida de serología. f) Una vez que la sonda de ADN ha sido desarrollada, una cantidad ilimitable pueden reproducirse. g) Las técnicas radiactivas y no radiactivas están disponibles. h) Las sondas de ácidos nucleicos han sido desarrolladas para organismos que no pueden ser cultivados (Kirkpatrick, *et al.*, 1987).

Las sondas de ácidos nucleicos, pueden ser usados en estudios de ecología y epidemiología, en el desarrollo de germoplasma resistente y en cuarentena, entre otros (Gilbertson, *et al.* 1989).

Métodos de Control de la Enfermedad.

El control de enfermedades transmitidas por mosquitos blancos ha sido planteado de muchos aspectos, tales como exclusión, evitando la enfermedad por selección de edad de plántulas o lugar, eliminación de reservorios del virus, producción de variedades resistentes, control del vector por químicos o repelentes y otros. Una alta prioridad es tratar de prevenir la introducción de la enfermedad en áreas no infestadas. Algunas enfermedades transmitidas por mosquitos blancos pueden ser controladas evitando el traslape de cultivos o teniendo un periodo libre del cultivo anterior a del cultivo principal (Costa, 1976).

Sin embargo estas técnicas por si solo no son eficientes, por lo que se considera que el control de plagas y enfermedades en la agricultura mexicana debe cambiar de enfoque si es que se quiere mantener la relación beneficio costo a niveles razonables y sin menos cabo de la calidad de los productos agrícolas y del ambiente. El continuo incremento de los precios de los plaguicidas hacen cada día más difícil de considerar el control químico como la única estrategia válida para manejar una plaga, por lo que una integración de todas las tácticas de control, incluyendo el biológico y químico, es la única alternativa práctica para alcanzar los objetivos del productor en el mercado y brindar protección al sistema (SARH, 1992).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó durante los años de 1993 y 1994 en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, Gto. (CINVESTAV-IPN), en la Universidad de Davis California y en los ejidos La Leona y La Gamusa pertenecientes al municipio de Ramos Arizpe, Coahuila. El ejido La Leona se encuentra a una altura de 850 msnm y con coordenadas de 25° 59' 24" latitud norte y 101° 08' 02" longitud oeste. El clima varía de secos semicálidos a secos templados. La temperatura media anual es de 14 a 18° C. La precipitación media anual varía de 300 a 500 ml, con un régimen de lluvia durante los meses de mayo a octubre y escasas en noviembre y diciembre. Los vientos prevaecientes tienen dirección norte con una velocidad de 22.5 km/hr.

Identificación de la Especie de Mosquita Blanca Vectora del Virus Involucrada en el Síndrome Chino del Chile

Se colectaron mosquitas blancas de un lote enfermo de chile serrano variedad Tampiqueño 74, las cuales se confinaron en jaulas de madera cubiertas con tela organza, posteriormente se trasladaron y liberaron sobre plantas sanas de chile serrano confinadas

en jaulas y colocadas bajo condiciones de invernadero. Las plantas se examinaron cada tercer día en busca de síntomas de la enfermedad para verificar si dicha especie es el vector del virus. Además se colectaron hojas con pupas de mosquita blanca, mismas que se montaron (APENDICE A) e identificaron siguiendo las claves de Martin (1987).

Período de Incubación del Virus

El período de incubación se consideró al tiempo transcurrido entre la alimentación de mosquitas virulíferas sobre plantas sanas a la fecha de aparición de los primeros síntomas de virosis en las mismas. Este período fue determinado en dos etapas fenológicas del cultivo: plántula y floración, para lo cual se colectaron en una jaula cubierta con tela de organza adultos de mosquita blanca de un lote de chile con síntomas de virosis del ejido La Leona. Estas se liberaron sobre plantas sanas de chile confinadas en una jaula cubierta con tela de organza. Después de tres días, las mosquitas fueron eliminados con aspersión de Cypermctrina (3 mg/lit). Esta operación se realizó en dos etapas de desarrollo de la planta (plántula y floración) con los cinco genotipos enlistados a continuación:

Tratamiento 1 = Tampiqueño 74

Tratamiento 2 = Línea LA-S-293

Tratamiento 3 = Línea 2 LP-S-294

Tratamiento 4 = Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Tratamiento 5 = Criollo

La variedad Tampiqueño 74 y el criollo nuevo, proporcionados por un productor cooperante del ejido La Leona, mientras que las restantes por el Departamento de Horticultura de la UAAAN.

Para cada tratamiento se utilizaron 10 plantas que se revisaron cada tercer día en busca de síntomas, registrándose el día de la primera aparición lo cual corresponde al periodo de incubación. El periodo de incubación de cada genotipo se determinó en base al porciento de infección.

La temperatura promedio diario que se registró en el invernadero de la UAAAN, donde se realizó este trabajo fue de $26^{\circ}\text{C} \pm 8$.

Diagnóstico del Virus Asociado al Síndrome Chino del Chile

Hibridación de Acidos Nucléicos por Maceración (NASH)

Obtención de la Sonda

Las sondas usadas para este método se obtuvieron a partir del virus presente en *C. annuum* de Ramos Arizpe, Coahuila; las especies colectadas estaban infectadas con el virus que produce la enfermedad llamada regionalmente "Chino del Chile".

Extracción del ADN Viral. De las plantas colectadas se realizó la extracción del ADN

viral de doble cadena por el método Dellaporta, *et al.* (1983) (APENDICE B).

Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR). La forma replicativa del ADN viral extraído de las plantas fueron amplificadas por PCR (APENDICE C) con iniciadores del genoma A y B (PCRc1-PAL1v 1978 y PBL1v - PCRc1 2040, respectivamente) diseñados por Rojas, *et al.* (1993) (Fig. 3.1) en presencia de la enzima Taq polimerasa. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis (APENDICE D).

Elusión del Fragmento Viral Amplificado (Gene Clean). Esta técnica (APENDICE E) tuvo como función extraer del gel, los fragmentos de ADN separados por electroforesis.

Clonación. Los fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido Bluescript^{sk+} y con el que se transformaron células competentes TA y se sembraron en cajas petri con agar LB con antibiótico (50 mg/ml de kanamicin o 50 mg/ml de ampicilina) e incubados a 37°C (APENDICE F).

Minipreparación de Sondas (Midi Prep). Esta etapa se llevó a cabo en el CINVESTAV-IPN, Irapuato, Gto. Las bacterias transformadas con los fragmentos clonados del genoma A y B del virus involucrado en el síndrome chino del Chile se incrementaron y posteriormente se separaron los fragmentos A y B del plásmido mediante digestiones con la endonucleasa EcoR1 por el método de Midi Prep (APENDICE G). Estos se corrieron por electroforesis en gel de agarosa y por gene clean se obtuvieron los fragmentos, para guardarlos en refrigeración a 4°C y posteriormente

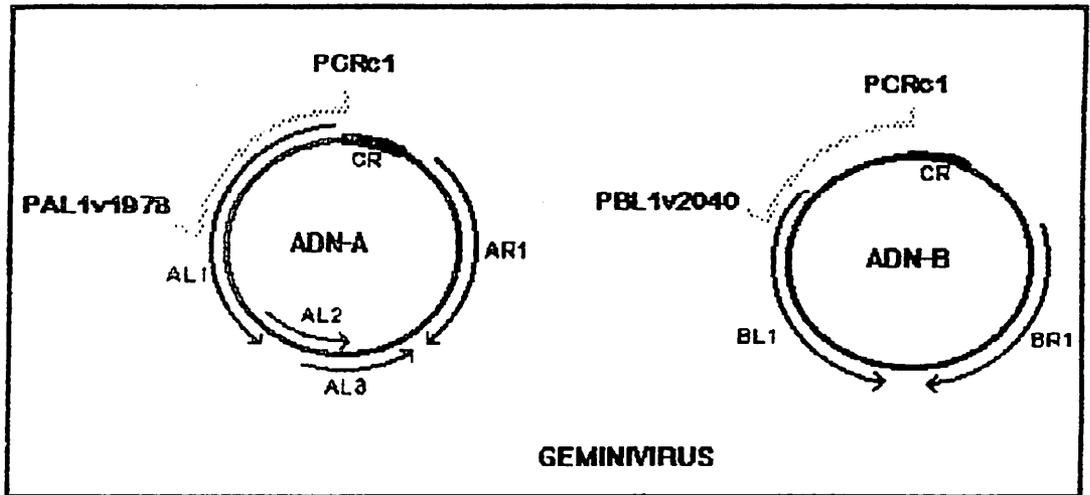


Figura 3.1 Representación diagramática de un tipo de geminivirus bipartita. Los fragmentos de lectura abierta (AR1, BR1, AL1, AL2, AL3 y BL1) están representados con flechas y la región común (CR) por una barra sólida. Se muestra la región del ADN viral amplificado por PCR con el par de iniciadores para ADN-A (PAL1v 1978 y PCRC1) y con par de iniciadores para el ADN-B (PBL1v 2040 y PCRC1).

utilizarlos como ondas en la hibridación de ácidos nucleicos sobre membranas de nylon.

Marcaje de la Sonda. Este proceso consistió en marcar las sondas A y B con radiactividad (^{32}P) para detectar a través del un film de rayos X, las hibridaciones (APENDICE H).

Protocolo de NASH

Preparación de Membranas. Las muestras colectadas de maleza, cultivos y soca fueron maceradas y colocadas en membranas de nylon (APENDICE I), el ADN contenido en las

muestras fueron fijadas con luz ultravioleta para evitar el desprendimiento de los ácidos nucleicos durante la hibridación (APENDICE J).

Hibridación. Después de tener las membranas y sondas preparadas se realizó la hibridación por el método de NASH (APENDICE K).

Detección. Para la detección, una película de rayos X se colocó sobre la membrana, se incubó por 48 hr y se reveló. Las muestras positivas al virus se detectaron como mancha en la película revelada.

Ensayo de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas (ELISA)

Las muestras colectadas se procesaron con antisueros: Potyvirus Y de la Papa (PVY), Potexvirus X de la Papa (PVX), Carlavirus S de la Papa (PVS), Tombusvirus Arbustivo del Tomate (TBSV), Potyvirus jaspeado del tabaco (TbEV), Nepovirus mancha anular del tabaco (TbRSV), Tobamovirus mosaico del tabaco (TbMVc), Cucurnovirus mosaico del pepino (CMV), mediante la técnica de ELISA siguiendo el procedimiento de Hampton, *et al.* (1990) (APENDICE L), así como también anticuerpos monoclonales gentilmente proporcionados por el Dr. Purcifull de la Universidad de Florida, para detectar al virus involucrado en el síndrome chino del Chile.

Fuentes de Inóculo

Hospederos del Virus

Se colectaron en el ejido hojas preferentemente jóvenes de malezas, cultivos y soca (cultivo de chile del ciclo anterior) con síntomas de virosis (clorosis, mosaico dorado o verde, manchas anulares, malformación de hojas: rizadas, curvadas, vena central distorsionada y otras distorsiones), así como hojas sin síntomas. Se colocaron en bolsas de plástico de 1 kg y se identificaron con fecha de colecta y nombre de la muestra y se trasladaron al laboratorio. Las especies de malezas con síntomas y que resultaron positivas por NASH y ELISA se identificaron en base a las claves de Villarreal (1985).

Hospederos de Mosquita Blanca

Las malezas, cultivos y soca que se colectaron para diagnóstico del virus, se examinaron tanto en hojas y tallos para la detección de ninfas; si éstas estaban presentes se le consideró a la planta como hospedera completa (tanto para ciclo biológico como alimentación). La identificación de mosquitas blancas se realizó con claves de Martin (1987) y para las malezas detectadas como hospederas con claves de Villarreal (1985).

Importancia de Fuentes de Inóculo.

Para determinar la importancia que tienen las fuentes de inóculo se seleccionó

07383

BANCO DE TESIS

un lote de chile serrano Tampiqueño 74 rodeado de malezas, soca y de otros cultivos; en la etapa de floración se marcaron en un croquis (Fig. 3.2) las plantas que presentaron síntomas de virosis (mosaico, enchinamientos, achaparramientos y vena principal truncado). Los datos se agruparon de Norte a Sur y Este a Oeste para analizarlos por el Sistema de Análisis Estadístico SAS ver 6.04 utilizando los modelos de dispersión y gradientes de la enfermedad descritos por Campbell y Madden (1990).

Modelo de Ley de Potencia

$$Y = Y_0 D^{-r} \text{ Linealizada } \ln Y = \ln Y_0 - r \ln D$$

$\ln Y$ = Logaritmo natural de la enfermedad

Y_0 = Y cuando $D=1$

r = Pendiente del gradiente

D = Distancia de la fuente de inóculo

Modelo Exponencial-Invertido

$$Y = Y_0 E^{-rD} \text{ Linealizada } \ln Y = \ln Y_0 - rD$$

Y_0 = Y cuando $D=0$

E = Exponente

r = Pendiente del gradiente

D = Distancia de la fuente de inóculo

Modelo de Berger

$$Y = 1 - Y_0 D^{-r} \text{ Linealizada } \text{Logit } Y = \text{Logit } Y_0 - r \ln D$$

$$\text{Logit} = \ln \frac{Y \text{ ó } Y_0}{1 - Y \text{ ó } Y_0}$$

r = Pendiente del gradiente

$\ln D$ = Logaritmo natural de la distancia

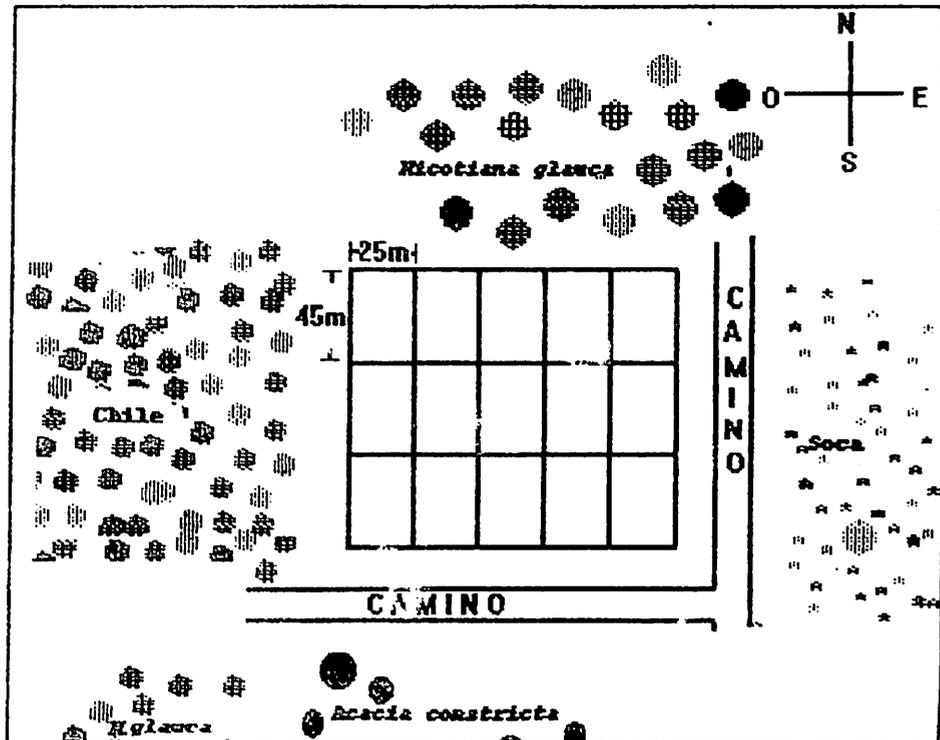


Figura 3.2 Croquis del lote elegido para determinar la importancia de las fuentes de inóculo.

Modelo de Minogue

$$Y = 1 - Y_0 E^{-rD} \quad \text{Linealizada} \quad Y = \text{Logit } Y_0 - rD$$

$$\text{Logit} = \frac{\ln Y \text{ ó } Y_0}{1 - Y \text{ ó } Y_0}$$

E=Exponente

r=Pendiente del gradiente

D=Distancia de la fuente de inóculo

Incidencia del Síndrome Chino del Chile.

Se seleccionaron 18 lotes de Chile del Ejido La Leona de siembra intermedia y 1

lote de siembra tardía, la selección se realizó en base a la zona que en el ciclo anterior tuvo problemas de virosis este número representó el 70 por ciento de lotes sembrados en el ejido.

Se realizaron cuatro muestreos en la siembra temprana, en las etapas fenológicas del cultivo de plántula, prefloración, floración y fructificación y dos muestreos en un lote de siembra tardía (plántula y prefloración). La incidencia de plantas enfermas se determinó considerando el porcentaje que estas representaron en el total de 25 plantas al azar observadas por cada lote.

Resistencia a la Enfermedad

La resistencia fue evaluada en los mismos materiales en los que se determinó el periodo de incubación, para lo cual se realizaron inoculaciones del virus con *B. tabaci* infectivas bajo condiciones de invernadero y en campo bajo presión natural.

Bajo Condiciones de Invernadero

El diseño empleado fue Completamente al Azar con 10 repeticiones. Los parámetros evaluados para resistencia fueron: altura de planta, incidencia, severidad y etapa fenológica inoculada. Para evaluar la severidad se utilizó una escala arbitraria que según los síntomas presentes se asignó un número, como se muestra en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Escala de severidad utilizada para evaluar resistencia en chile a la enfermedad presente en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

GRADOS DE SEVERIDAD	DESCRIPCION DE SINTOMAS
1	Enchinamiento en hojas primarias o brotes nuevos, planta de tamaño normal
2	Enchinamiento hasta hojas secundarias ubicadas en la parte apical de la planta. Planta de tamaño normal.
3	Enchinamiento hasta hojas terciarias ubicadas en la parte apical de la planta, tamaño normal.
4	Enchinamiento hasta hojas secundarias en toda la planta. Planta de tamaño normal.
5	Enchinamiento hasta hojas secundarias en toda la planta. Planta achaparrada, aborto de flores.
6	Enchinamiento hasta hojas terciarias en toda la planta, planta achaparrada, aborto de flores, frutos pequeños y malformados.

Bajo Presión Natural de Campo.

Los genotipos se establecieron en los ejidos La Leona y La Gamusa, el primero presentó en el ciclo anterior problemas de virosis, mientras que el segundo fue casi nula la presencia de ésta. Los materiales se sembraron en parcelas dos surcos de 2.5 m de longitud a una distancia entre plantas de 45 cm. El diseño utilizado fue de Bloques al Azar con seis repeticiones para La Leona y cinco repeticiones para La Gamusa. Los parámetros evaluados fueron: severidad (Cuadro 3.1) e incidencia en ambos ejidos.

RESULTADOS

Identificación de la Especie de Mosquita Blanca Vectora del Virus Involucrado en el Síndrome Chino del Chile

La especie de mosquita blanca vectora del síndrome chino del Chile se identificó como *Bemisia tabaci* Gennadius cuyas características observables fueron: margen irregularmente crenulado, pliegues traqueales torácicas presentes, orificio vasiforme triangular siendo este más largo que ancho en la base, setas caudales fuertes y largas como el orificio vasiforme, sutura caudal presente y pronunciado, orificio vasiforme más largo que la sutura caudal y papilas presentes.

Período de Incubación del Virus

El porcentaje de infección por virosis que se registró en los genotipos inoculados con *B. tabaci* virulíferas en etapa de plántula, como se observa en el Cuadro 4.1 fue de 100 por ciento para la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL, 80 por ciento para las líneas 2 LP-S294 y LA-S-293; y 70 por ciento para la variedad Tampiqueño 74 y criollo de la región.

Mientras que en la etapa de floración (Cuadro 4.1), el más alto porcentaje de infección por virosis fue de 70 por ciento para la variedad Tampiqueño 74, siguiendo con

Cuadro 4.1 Por ciento de infección del virus involucrado en el síndrome chino del chile inoculado con *B. tabaci* en genotipos en etapa de plántula y floración.

GENOTIPO	% DE INFECCION PLANTULA	% DE INFECCION FLORACION
Tampiqueño 74	70	70
2 LP-S-294	80	40
LA-S-293	80	60
LR-88-14-9-4-SI-SL	100	50
Criollo	70	20

60 por ciento para la línea LA-S-293, 50 por ciento para la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL, 40 por ciento para la línea 2 LP-S-294 y 20 por ciento para el criollo.

En la etapa de plántula los genotipos no presentaron diferencias significativas en el período de incubación ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.8668$, $R^2 = 0.04$ y C.V. = 33.11). Mediante la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan (Fig. 4.1) se observa que los tratamientos con mayor período de incubación fueron el Tampiqueño 74 y la línea 2 LP-S-294 con 12.41 días, siguiéndole en menor tiempo la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL y la línea LA-S- 293 con 11 días y por último el criollo con 10.43 días.

En la etapa de floración los genotipos no presentaron diferencias significativas ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.2012$, $R^2 = 0.28$ y C.V. = 48.65). Al realizar la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan como se observa en la Fig. 4.2 que la línea LA-S-

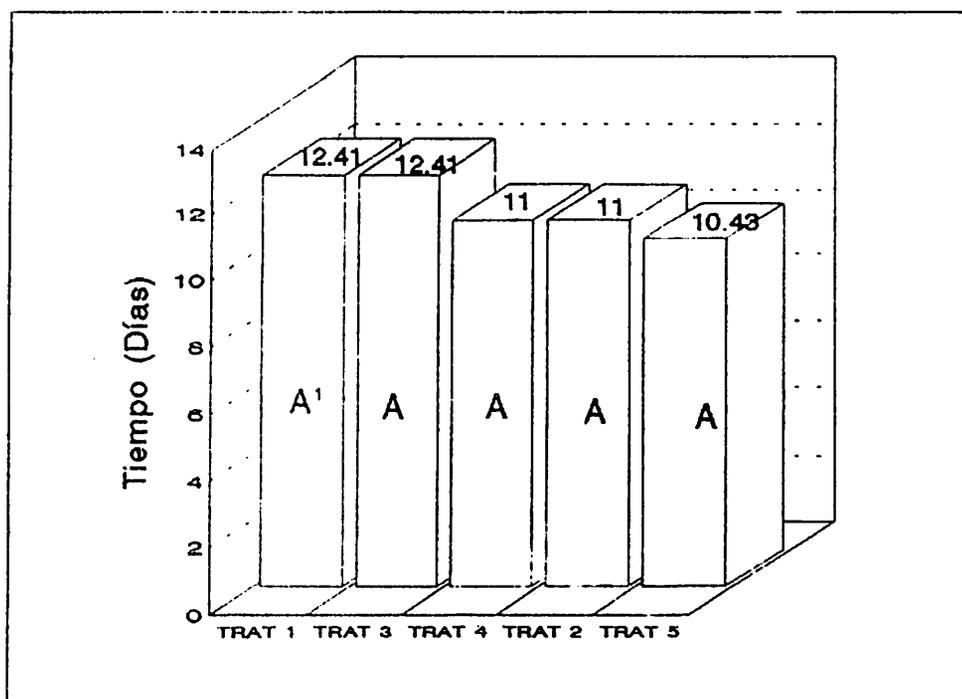


Figura 4.1. Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de *C. annuum* en etapa de plántula inoculados con *B. tabaci* virulíferas.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

293 presentó el más largo periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile (27.3 días) y esta difiere al menos del criollo que presentó 10.5 días.

En términos generales se observa que los genotipos inoculados con virus en etapa de plántula, presentaron más alto porcentaje de infección y periodos de incubación de virus más cortos que los genotipos en etapa de floración.

Entre los genotipos el que mostro largo periodo de incubación en ambas etapas

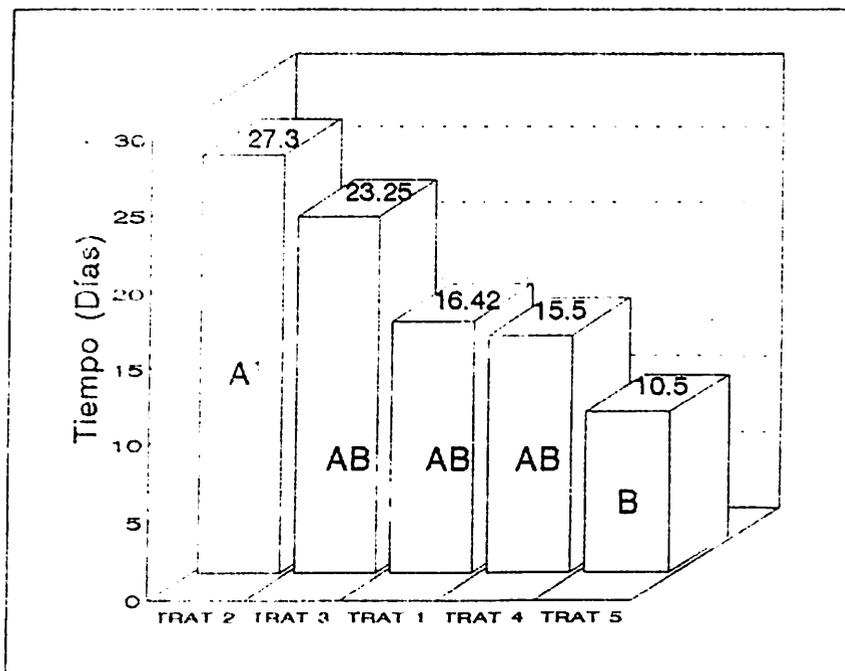


Figura 4.2. Medias del periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile en genotipos de *C. annuum* en etapa de floración inoculados con *B. tabaci* virulíferas.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14 9 4 SI SL

Trat 5 Criollo

fenológicas fue la línea 2 LP-S-294. El criollo a pesar de que es uno de los genotipos que presentó el más corto periodo de incubación en ambas etapas fenológicas del cultivo, mostró los más bajos porcentajes de infección de virosis tanto en etapa de plántula como floración.

Diagnóstico del Virus Asociado al Síndrome Chino del Chile

NASH

En el diagnóstico del virus asociado al síndrome chino del Chile, por medio de técnicas moleculares se logró amplificar dos fragmentos obtenidos con iniciadores para geminivirus PAL1v 1978-PCRc1 y PBL1v 2040-PCRc1 (para el genoma A y B respectivamente) y que posteriormente se utilizaron como sondas, tuvieron el tamaño predicho de aproximadamente 0.8 Kb para el genoma A y 0.5 Kb para el genoma B (Fig. 4.3). Posteriormente se secuenciaron en el CINVESTAV-IPN y en la Universidad de California, presentando una homología del 95 por ciento con el virus texano del Chile, por lo que de aquí en adelante se mencionará al geminivirus asociado al síndrome chino del Chile como virus texano del Chile variante Coahuila (TPGV-Coahuila).

ELISA

Las muestras de maleza, soca y cultivo que fueron procesadas por el método de ELISA para detectar otros virus asociados al síndrome chino del Chile, se muestran en el Cuadro 4.2, en donde se observa que el único virus asociado es el "Y" de la papa, presente en plantas de *C. annuum* (cultivo y soca) con síntomas de enchinamiento y aún en el testigo que no presentaba síntomas aparentemente; así como en plantas de *Nicotiana glauca* con síntomas de anillamiento y en el testigo.

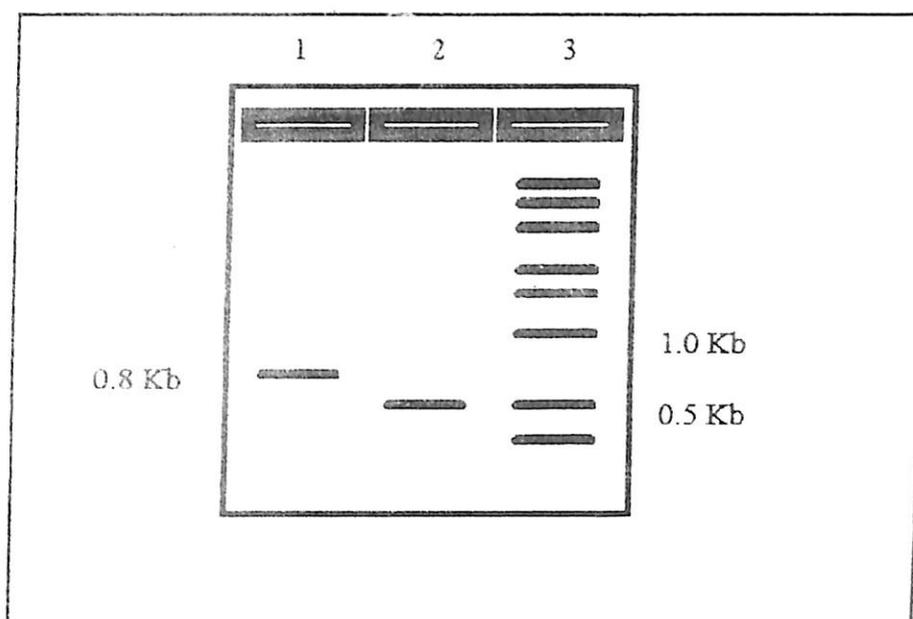


Figura 4.3 Análisis electroforético en gel de agarosa de la amplificación por PCR del virus presente en Ramos Arizpe, Coah. Línea 1: Genoma A (0.8 Kb) amplificado con el par de iniciadores PAL1v 1978 y PCRc1; línea 2: Genoma B (0.5 Kb) amplificado con el par de iniciadores PBL1v 2040 y PCRc1; línea 3: Marcador de peso molecular.

En *Datura stramonium*, *Acacia constricta* y *Amaranthus hybridus*, aun cuando presentaban síntomas de enchinamiento para *Datura*, y clorosis para las demás, no resultaron positivas para PVY.

Los virus PVX, PVS, TBSV, TbEV, TbRSV, TbMVc y CMV no se detectaron en las plantas procesadas por ELISA.

Cuadro 4.2 Detección de virus por el método de ELISA en especies de maleza y cultivo de chile colectadas del ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

ESPECIE-SINTOMAS	PVY ²	PVX	PVS	TBSV	TbEV	TbRSV	TbMV _c	CMV
<i>Capsicum annuum</i> . Ch ¹	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. annuum</i> . S-Ch	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. annuum</i> . Ch-Cl	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. annuum</i> . T	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nicotiana glauca</i> . An	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. glauca</i> . Am	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. glauca</i> . T	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i> . Ch	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. stramonium</i> . T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acacia constricta</i> . Cl	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. constricta</i> . T	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Amaranthus hybridus</i> . Cl	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hybridus</i> . T	-	-	-	-	-	-	-	-

1 Ch= Enchunamiento

S-Ch= Soca-Enchunamiento

Ch-Cl= Chino y clorótico

Cl= Clorótico

An= Anillamiento

Am= Amarillamiento

T= Testigo (sin síntomas)

2 PVY= Potyvirus Y de la papa

PVX= Potyvirus X de la papa

PVS= Carlavirus S de la papa

TBSV= Tombusvirus arbustivo del tomate

TbEV= Potyvirus jaspeado del tabaco

TbRSV= Nepovirus mancha anular del tabaco

TbMV_c= Tobamovirus mosaico del tabaco

CMV= Cucumovirus mosaico del pepino

Fuentes de Inóculo

Hospederos del Virus

Las especies en las que se detectó la presencia de geminivirus por el método de NASH con la sonda del genoma A (Cuadro 4.3) fueron: *Capsicum annuum* de campo, *C. annuum soca*, *C. annuum* inoculado con virus por medio de *B. tabaci* bajo condiciones de invernadero. *Datura stramonium*, *D. quercifolia* y *Nicotiana glauca* todas estas pertenecientes a la familia Solanaceae. Con la sonda del genoma B, además de las anteriores *Cucurbita pepo* perteneciente a la familia Cucurbitaceae, sin embargo esta última especie no se enfermó cuando se puso en contacto con mosquitas blancas infectivas.

Hospederos de Mosquita Blanca

La especie *Bemisia tabaci* se encontró en malezas y cultivos de la familia Solanaceae, Asteraceae y Fabaceae, con presencia o no de síntomas, siendo entre estas la familia Solanaceae donde más población de mosquita blanca se encontró; en Papaveraceae, Cucurbitaceae y Amaranthaceae no se localizó presencia de ninfas de *B. tabaci* (Cuadro 4.4).

La especie *Trialeurodes vaporariorum*, aun cuando se encontró presente en algunas Solanaceae, Asteraceae y Fabaceae generalmente fue muy baja su población en

Cuadro 4.3 Detección de geminivirus por el método de hibridación con sondas del genoma A y B del TPGV-Coah. en plantas colectadas en el ejido La Leona de Ramos Arizpe, Coah.

FAMILIA	ESPECIE	NASH ¹	
		A ²	B ³
SOLANACEAE	<i>Capsicum annuum</i> Campo	+	+
	<i>C. annuum</i> Soca	+	+
	<i>C. annuum</i> Invernadero*	+	+
	<i>Datura stramonium</i>	+	+
	<i>D. quercifolia</i>	+	+
	<i>Nicotiana glauca</i>	+	+
	<i>Physalis peruviana</i>	-	-
	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	-	-
	<i>Parthenium hysterophorus</i>	-	-
ASTERACEAE	<i>Ambrosia confertiflora</i>	-	-
	<i>Xanthium strumarium</i>	-	-
	<i>Helianthus annuus</i>	-	-
FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-
	<i>Acacia constricta</i>	-	-
	<i>Prosopis sp.</i>	-	-
PAPAVERACEAE	<i>Argemone echinata</i>	-	-
CUCURBITACEAE	<i>Cucurbita pepo</i>	-	+
AMARANTHACEAE	<i>Amaranthus hybridus</i>	-	-

1 NASH= Hibridación de Ácidos Nucléicos por Maceración

2 A= Sonda del genoma A

3 B= Sonda del genoma B

Cuadro 4.4 Plantas hospederas de especies de mosquita blanca en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

FAMILIA	PLANTAS ¹	ESPECIE DE MOSQUITA BLANCA ²
SOLANACEAE	<i>Capsicum annum</i> campo	<i>Bemisia tabaci</i>
	<i>C. annum</i> Soca	<i>B. tabaci</i>
	<i>C. annum</i> Invernadero*	<i>B. tabaci</i>
	<i>Datura stramonium</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
	<i>D. quercifolia</i>	<i>B. tabaci</i>
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>B. tabaci</i>
	<i>Physalis phyllanthifolia</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>T. vaporariorum</i>
		Sin identificar
		<i>Solanum elaeagnifolium</i> <i>B. tabaci</i>
	<i>Parthenium hysterophorus</i> <i>B. tabaci</i>	
	<i>T. vaporariorum</i>	
ASTERACEAE	<i>Ambrosia confertiflora</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>T. vaporariorum</i>
	<i>Xanthium strumarium</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>T. vaporariorum</i>
	<i>Helianthus annus</i>	-----
FABACEAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>T. vaporariorum</i>
	<i>Acacia constricta</i>	<i>B. tabaci</i>
		<i>T. vaporariorum</i>
	<i>Prosopis sp</i>	<i>B. tabaci</i>
		Sin identificar
PAPAVERACEAE	<i>Argemone ecballiata</i>	<i>Aleyrodes proletella</i>
CUCURBITACEAE	<i>Cucurbita pepo</i>	-----
AMARANTHACEAE	<i>Amaranthus hybridus</i>	-----

¹ Identificadas con claves de Villarreal (1989)

² Identificadas con claves de Martin (1987)

* Planta inoculada en invernadero con mosquitas blancas virulíferas del ejido La Leona

----- No se detectaron pupas de mosquita blanca

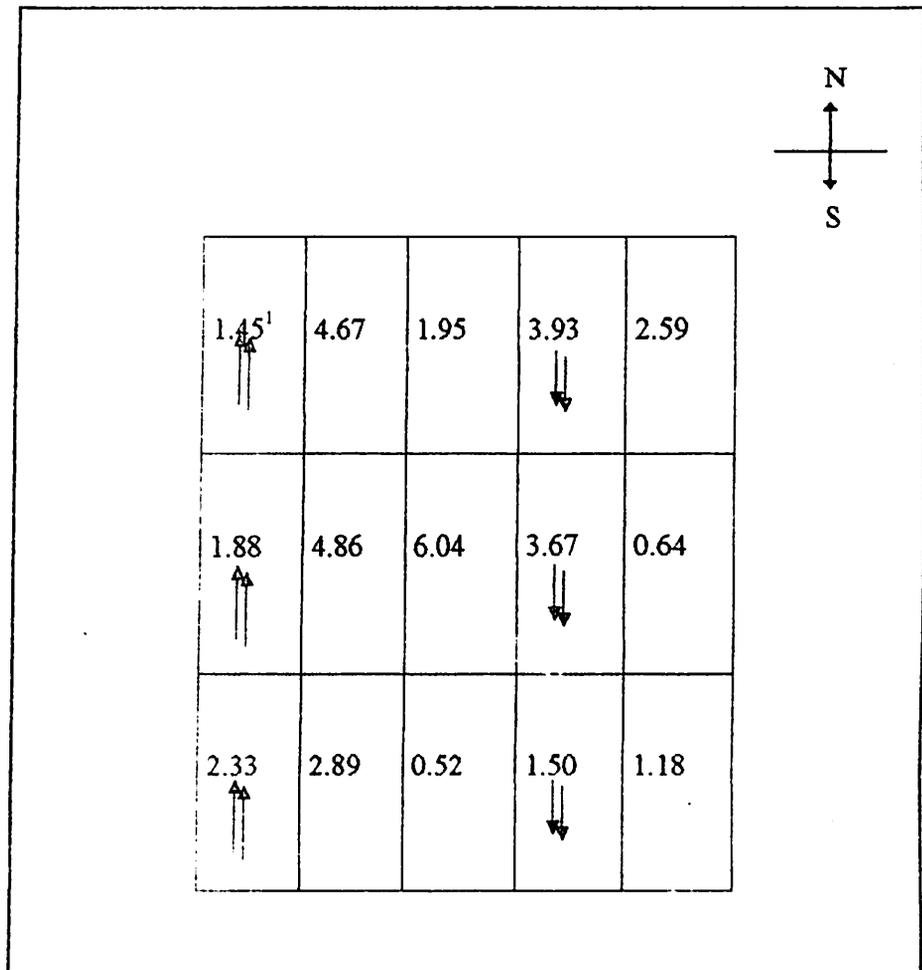
comparación de *B. tabaci* (Cuadro 4.4).

Además de las dos especies anteriormente mencionadas, se detectaron también *Aleyrodes proletella* en *Argemone echinata* y dos especies sin identificar, con poca prevalencia en comparación de *B. tabaci*.

Importancia de Fuentes de Inóculo

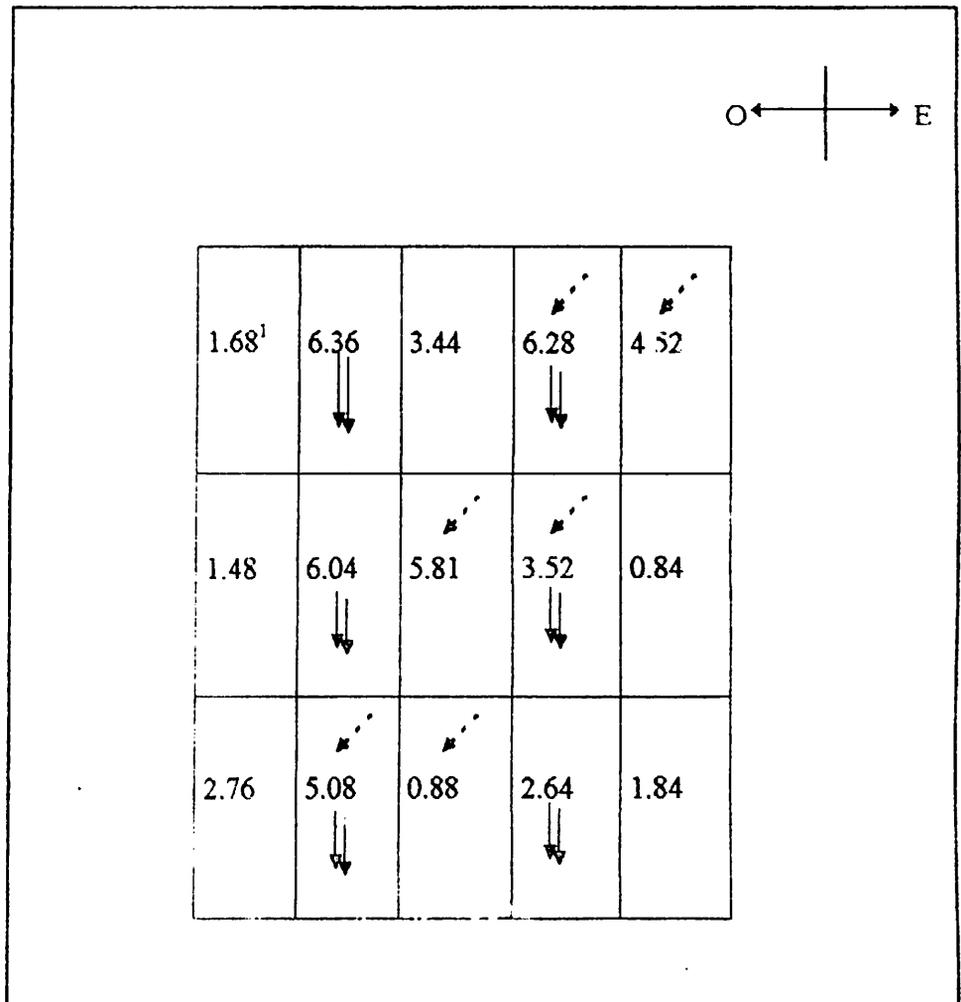
Para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coahuila, los datos obtenidos no se ajustaron a los modelos de dispersión y gradientes de enfermedad descritos por Campbell y Madden (1990). Sin embargo a través de medias si se observan gradientes, como se muestra en la Fig. 4.4, donde los datos fueron agrupados en secciones de 25 por 45 m (1125 m²) que cuando se analizaron de Norte a Sur, presentaron dos gradientes, uno de los cuales la dispersión de la enfermedad inició por el Norte y otro gradiente por el Suroeste, ambos con respecto a la ubicación del lote; cuando se analizaron de Este a Oeste (Fig. 4.5), se observaron cuatro gradientes., dos de los cuales la dispersión inicia por el Norte y los otros dos por el Noreste, con respecto a la ubicación del lote.

Ambos analisis presentan gradientes localizados en el Norte y Noreste, el cual coincide con la presencia de *N. glauca*; aun en el gradiente que inició por el Suroeste. La distancia de esta maleza perenne al cultivo comercial fue de aproximadamente 20 m.



¹ Promedio de plantas enfermas por sección.
 ⇒ Dirección de la dispersión de enfermedad.

Figura 4.4 Croquis del lote fraccionado con datos analizados de Norte a Sur para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.



1 Promedio de plantas enfermas por sección.
 ⇒ Dirección de la dispersión de enfermedad.

Figura 4.5 Croquis del lote fraccionado, con datos analizados de Este a Oeste para el gradiente de dispersión de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

Incidencia del Virus Texano del Chile var. Coahuila

La incidencia de la enfermedad virus texano del chile var. Coahuila en diferentes etapas fenológicas del cultivo se muestra en el Cuadro 4.5, en el cual se observa que en siembras tempranas, la aparición de síntomas ocurre en la etapa de floración con 25 por ciento de incidencia alcanzando un 77 por ciento en etapa de fructificación. Mientras que en siembra tardía los síntomas aparecieron desde la etapa de plántula con 80 por ciento de incidencia y 100 por ciento para la etapa de prefloración, considerándose esta última como siniestro total.

Resistencia de los Genotipos al Virus.

Bajo Condiciones de Invernadero

Etapa de Plántula

Los genotipos inoculados con el virus TPGV-Coah. con *B. tabaci* virulíferas, mostraron diferencias altamente significativas con respecto a la altura ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.0001$, $R^2 = 0.57$ y $C.V. = 37.37$) que mediante la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan se obtuvo que las líneas LA-S-293, 2 LP-S-294 y la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL tuvieron los más altos promedios de altura con 36.5, 33.77 y 30.7cm respectivamente, y éstos difieren significativamente del Tampiqueño 74 y el criollo que presentaron 16.3cm y 11.7cm de altura respectivamente (Fig. 4.6).

Cuadro 4.5 Incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en diferentes etapas fenológicas y épocas de siembra de chile en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

EPOCA DE SIEMBRA	ETAPA FENOLOGICA	SUPERFICIE MUESTREADA ¹	INCIDENCIA ²
Temprana (1a. quincena Abril)	Plántula	30	0
	Prefloración	30	0
	Floración	30	25
	Fructificación	30	80
Tardía (1a. quincena Junio)	Plántula	3	80
	Prefloración	3	100

¹ Superficie expresada en hectáreas

² Incidencia expresada en porcentaje

En la incidencia del virus TPGV-Coah. existen diferencias significativas entre los genotipos ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.0001$, $R^2 = 0.998$ y $C.V. = 2.01$) que mediante la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan se obtuvo que la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL difiere de los demás genotipos por presentar el 100 por ciento de incidencia, siguiéndole las líneas LA-S-293 y 2 LP-S-294 con 80 por ciento y por último el Tampiqueño 74 y criollo con 70 por ciento (Fig. 4.7).

En cuanto a severidad se refiere, los tratamientos difieren estadísticamente ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.048$, $R^2 = 0.217$ y $CV = 59.039$) que mediante la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan se obtuvo que la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL presentó el más alto grado de severidad (5.11) y ésta difiere únicamente con el Tampiqueño 74, el cual presentó el más bajo grado de severidad (2.2) (Fig. 4.8)

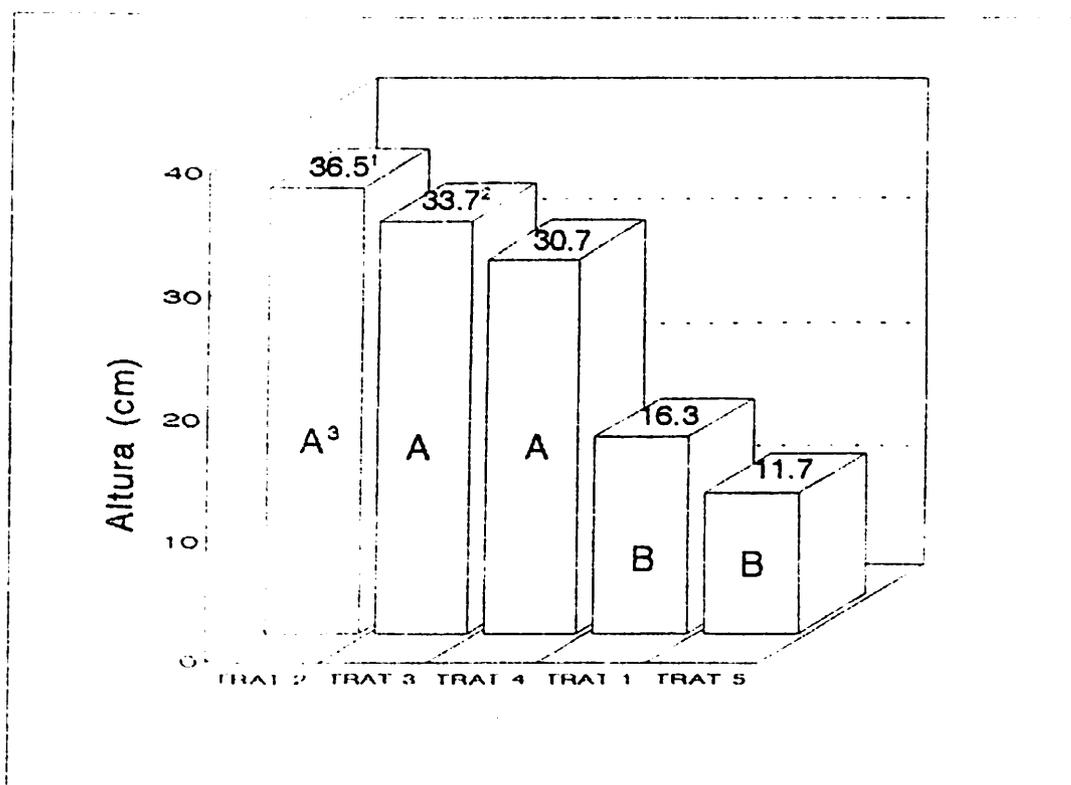


Figura 4.6 Medias de altura de genotipos en etapa de plántula inoculados con TPGV-Coah. mediante *B. tabaci* virulíferas.

1 Media de altura en base a 5 plantas

2 Media de altura en base a 10 plantas

3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

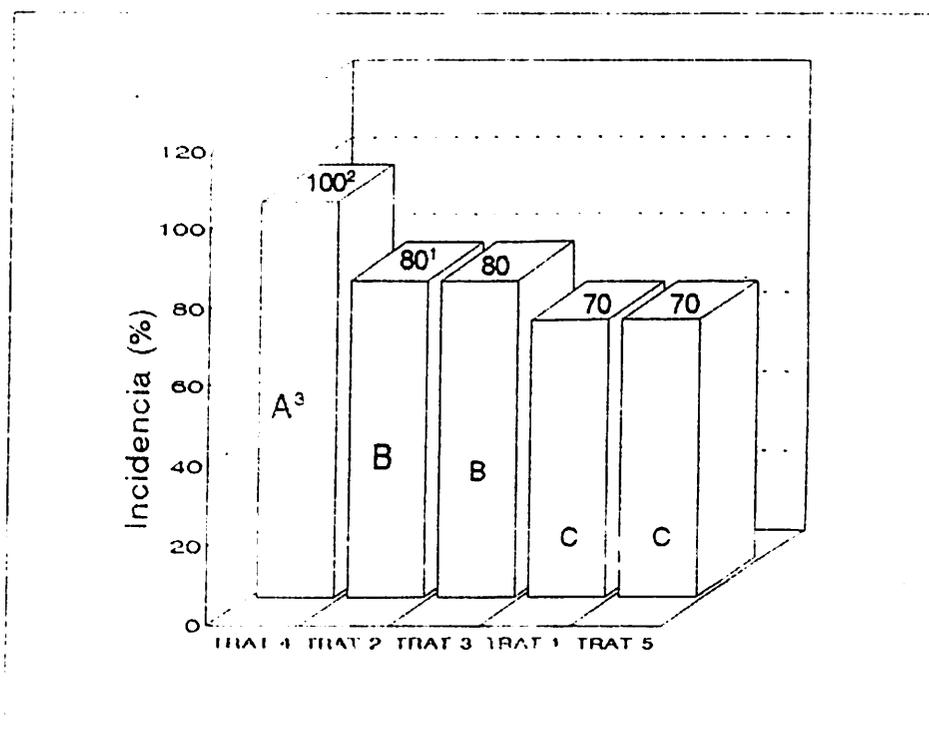


Figura 4.7 Medias de incidencia del TPGV-Coah. de genotipos de *C. annuum* en etapa de plántula inoculados con *B. tabaci* virulíferas

- 1 Media de altura en base a 5 plantas
- 2 Media de altura en base a 10 plantas
- 3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).
- T1 Tampiqueño 74
- T2 Línea LA-S-293
- T3 Línea 2 LP-S-294
- T4 Variedad LR-88-14-9-4-Si-SL
- T5 Criollo

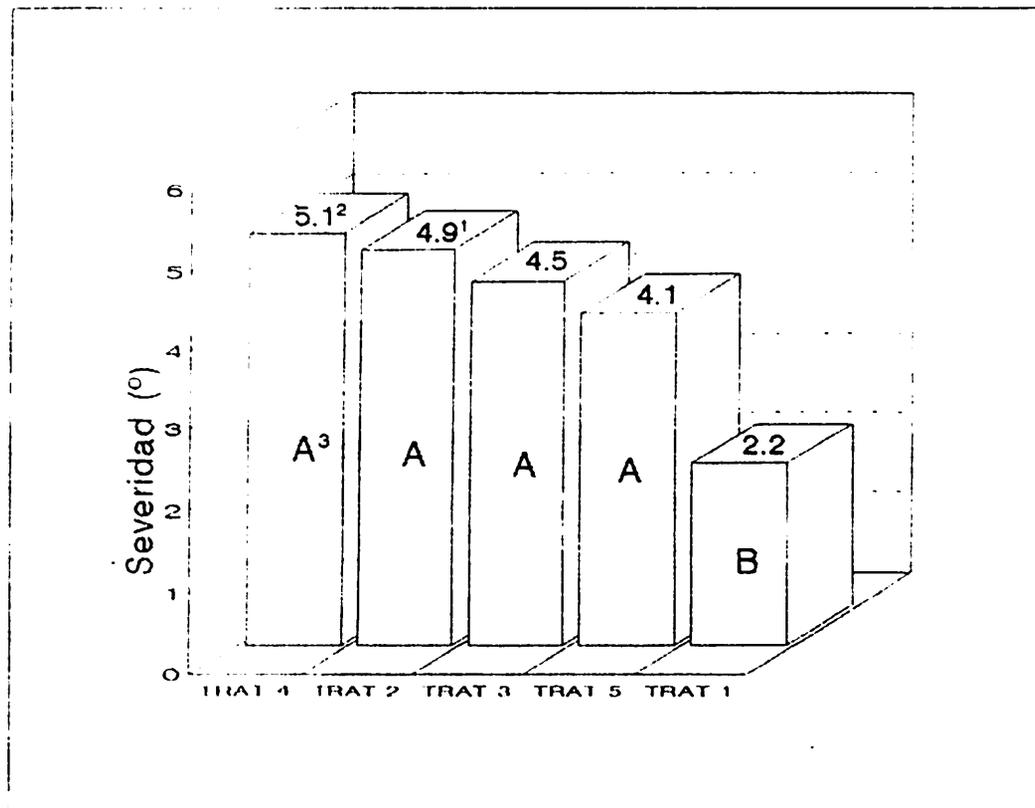


Figura 4.8 Medias de severidad del TPGV-Coah. de genotipos de *C. annuum* en etapa de plántula inoculados con *B. tabaci* virulíferas

- 1 Media de altura en base a 5 plantas
- 2 Media de altura en base a 10 plantas
- 3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).
- T1 Tarapiqueño 74
- T2 Línea LA-S-293
- T3 Línea 2 LP-S-294
- T4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL
- T5 Criollo

Etapa de Floración

Los genotipos en etapa de floración inoculados con el virus TPGV-Coah. mediante *B. tabaci* virulíferas, mostraron diferencias altamente significativas con respecto a la altura de planta ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.0001$, $R^2 = 0.88$ y C.V.=8.36); mediante la prueba de rango múltiple de Duncan (Fig. 4.9) la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL tuvo el más alto promedio de altura con 58.65 cm, siguiéndole el Tampiqueño 74 y la línea 2 LP-S-294 con 50.15 cm y 48.75 cm respectivamente, mientras que la línea LA-S-293 con 42.24cm y finalmente el criollo con 35.0 cm.

En cuanto a incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. se refiere, se encontraron diferencias significativas entre los genotipos de *C. annuum*, que mediante la comparación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan se observa (Fig 4.10) que la variedad Tampiqueño 74 presenta el más alto promedio de incidencia (70 por ciento), siguiéndole en forma descendente la línea LA-S-293 con 60 por ciento, variedad LR-88-14-9-4-SI-SL con 50 por ciento, línea 2 LP-S-294 con 40 por ciento y por último el criollo con 20 por ciento.

En el análisis de varianza con respecto a severidad, los datos arrojan que no existen diferencias significativas entre tratamientos ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.1964$, $R^2 = 0.14$ y C.V.=126.19). Mediante la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan se observa (Fig. 4.11) que el Tampiqueño 74 fue el que presentó más alto promedio de severidad (2.1) mientras que el más bajo fue el criollo con 0.77 de severidad.

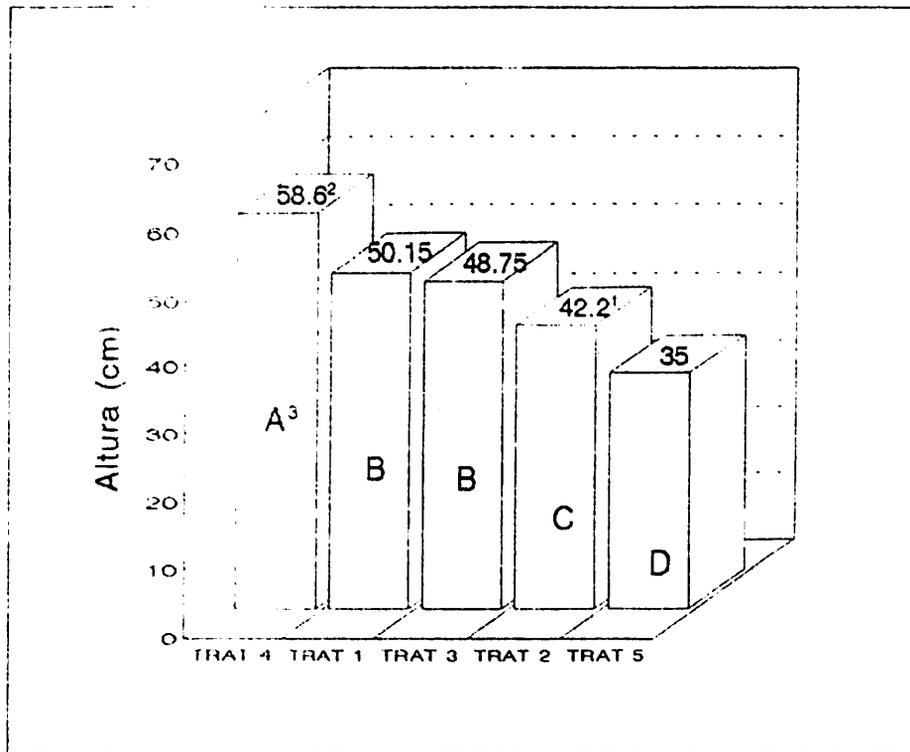


Figura 4.9 Medias de altura de genotipos en etapa de floración inoculados con TPGV-Coah. mediante *B. tabaci* virulíferas.

1 Media de altura en base a 5 plantas

2 Media de altura en base a 10 plantas

3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 I.P-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9 4-SI-SL

Trat 5 Criollo

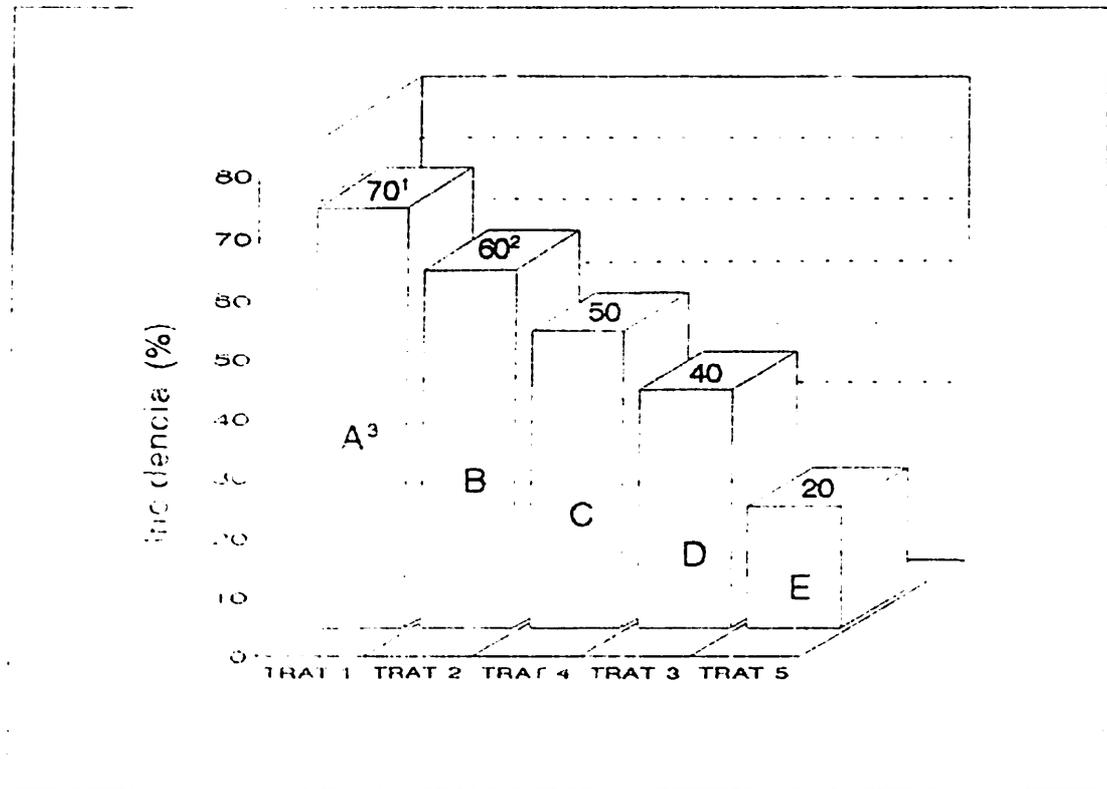


Figura 4.10 Medias de incidencia del TPGV-Coah. de genotipos de *C. annuum* en etapa de floración inoculados mediante *B. tabaci* virulíferas

1 Media de severidad en base a 5 plantas

2 Media de severidad en base a 10 plantas

3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 Campiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

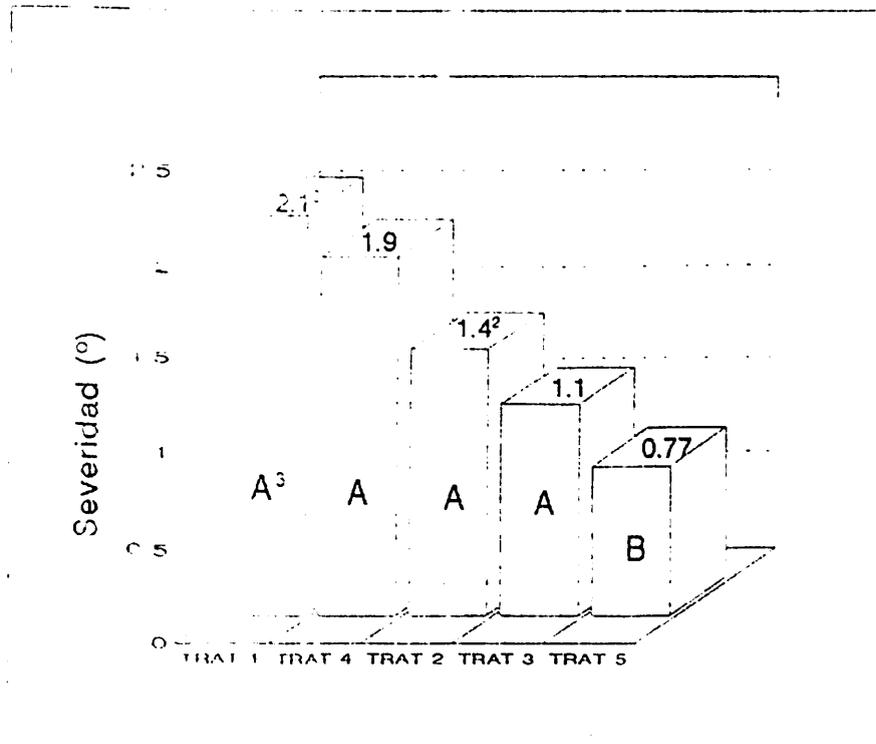


Figura 4.11 Medias de severidad del TPGV-Coah. de genotipos de *C. annuum* en etapa de floración inoculados mediante *B. tabaci* virulíferas.

1 Media de incidencia en base a 5 plantas

2 Media de incidencia en base a 10 plantas

3 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 . ampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

Bajo Presión Natural de Campo

Ejido La Leona

Los genotipos establecidos en el ejido bajo presión natural del virus TPGV en el análisis de varianza arroja diferencias significativas con respecto a la severidad de la enfermedad ($Pr < F_{\alpha 0.05} = 0.0336$, $R^2 = 0.57$ y $C.V. = 45.18$) que mediante comparación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan (Fig 4.12) se observa que la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL presentó el más alto promedio de severidad con 2.22 grados aun cuando no difiere significativamente de la variedad Tampiqueño 74, el criollo y la línea LA-S-293; mientras que la línea 2 LP-S-294 presentó el promedio de severidad más bajo (1.11) de todos los genotipos.

Con respecto a la incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en el análisis de varianza no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.3654$, $R^2 = 0.37$ y $C.V. = 18.58$). En la Fig. 4.13 se observa que en la separación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan, no existen diferencias significativas.

Ejido La Gamusa

Los genotipos establecidos en el ejido La Gamusa, en el análisis de varianza con respecto a la severidad presentaron diferencias significativas entre los tratamientos

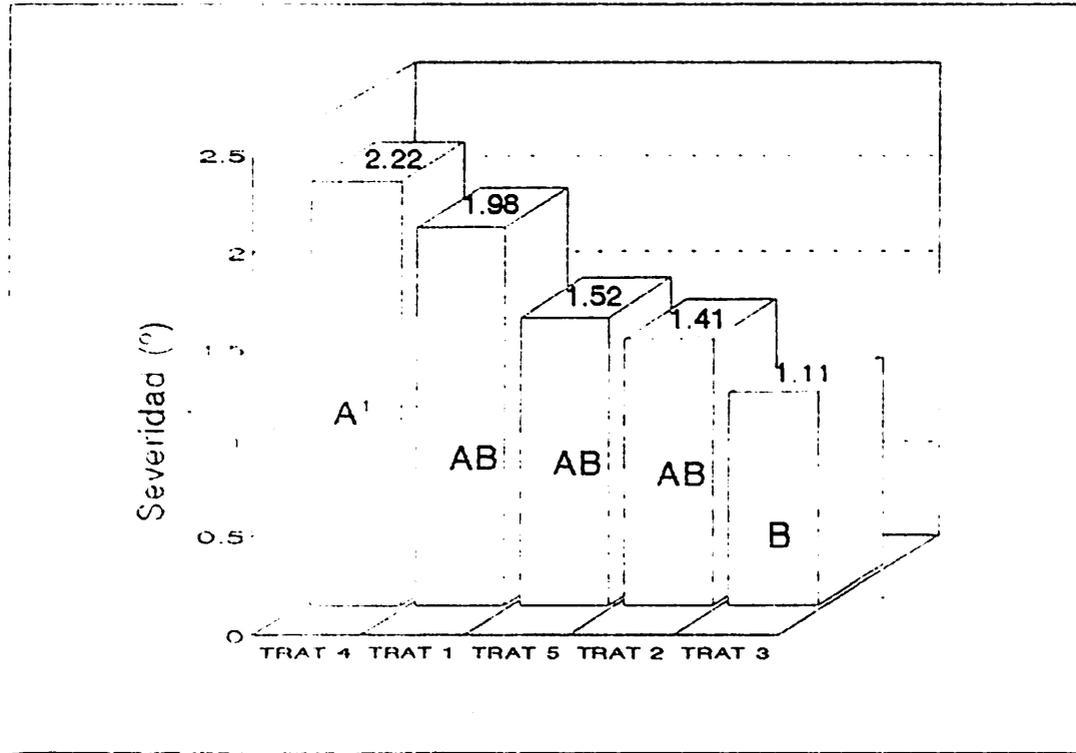


Figura 4.12. Medias de severidad de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de *C. annuum* establecidos en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

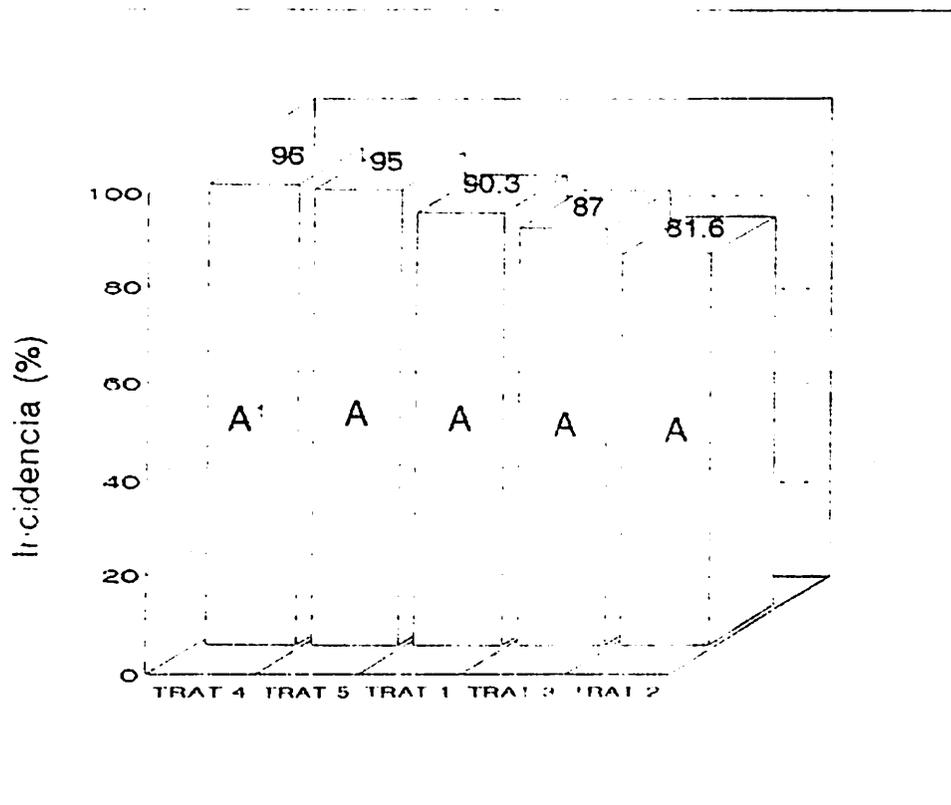


Figura 4.13. Medias de incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de *C. annuum* establecidos en el ejido La Leona, Ramos Arizpe, Coah.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.0365$, $R^2 = 0.65$ y $C.V. = 70.67$) que mediante comparación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan, se observa en la Fig. 4.14 que el criollo presentó el más alto promedio de severidad con 2.125 que difiere significativamente de la línea 2 LP-S-294 el cual mostró una severidad de 0.45.

En cuanto al análisis de varianza con respecto a la incidencia, estadísticamente no existen diferencias significativas entre los genotipos ($Pr > F_{\alpha 0.05} = 0.1023$, $R^2 = 0.569$ y $C.V. = 44.11$). Mediante la comparación de medias de rango múltiple de Duncan (Fig. 4.15) se observan diferencias entre algunos tratamientos, siendo la variedad LR-88-14-9-4-SI-SL la que presentó el promedio de incidencia más alto (76 por ciento) aun cuando no difiere significativamente del criollo, de la variedad Tampiqueño 74 y la línea LA-S-293; mientras que la línea 2 LP-S-294 al igual que en la severidad presentó el promedio más bajo de incidencia (29.5 por ciento)

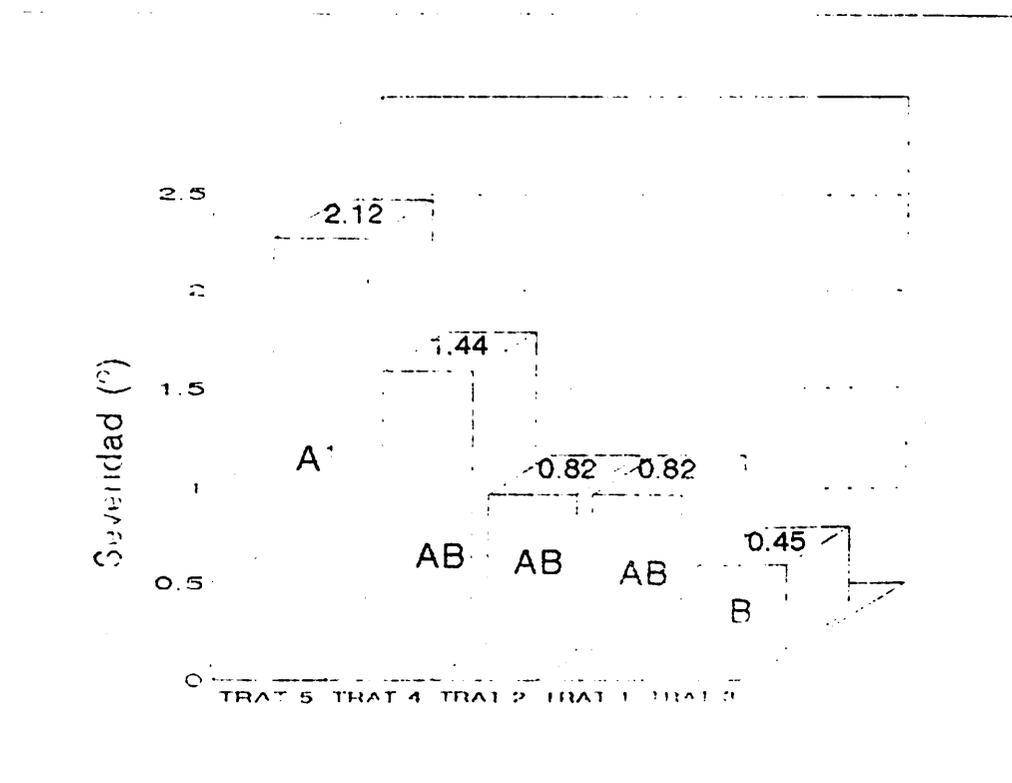


Figura 4.14. Medias de severidad de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de *C. annuum* establecidos en el ejido La Gamusa, Ramos Arizpe, Coah.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

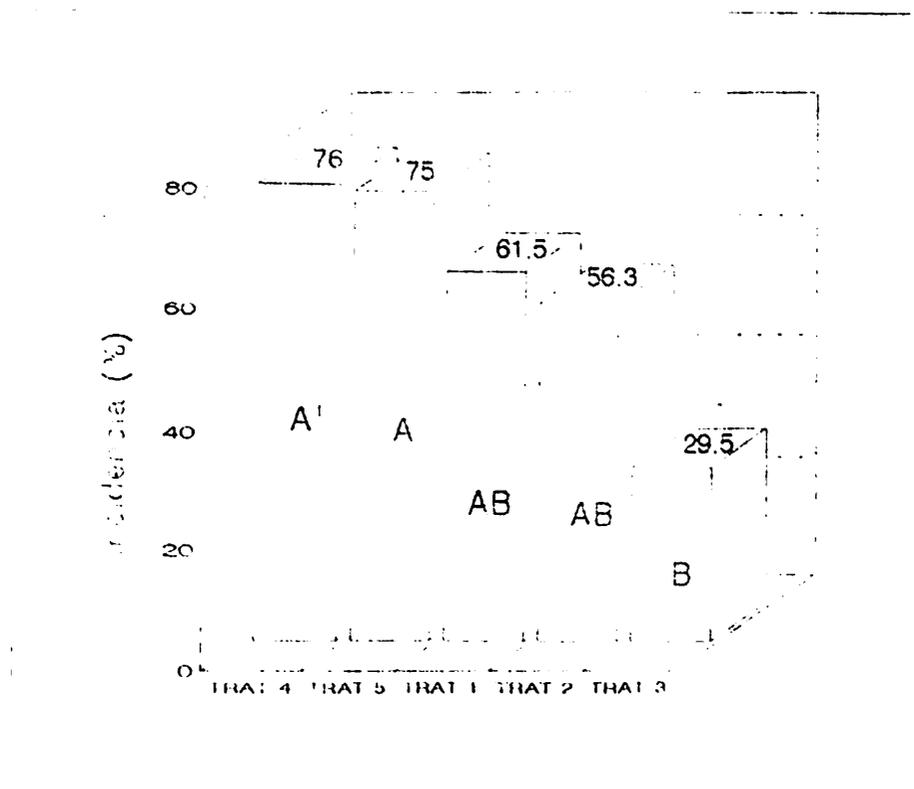


Figura 4.15. Medias de incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en genotipos de *C. annuum* establecidos en el ejido La Gamusa, Ramos Arizpe, Coah.

1 Medias con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Trat 1 Tampiqueño 74

Trat 2 Línea LA-S-293

Trat 3 Línea 2 LP-S-294

Trat 4 Variedad LR-88-14-9-4-SI-SL

Trat 5 Criollo

DISCUSION

Vector del Virus Texano del Chile var. Coahuila

Indudablemente que la mosquita blanca, sigue siendo un problema primordial en la agricultura mexicana por su capacidad de transmitir virus a una variedad amplia de cultivos. La presencia de *B. tabaci* en Ramos Arizpe, Coah, región semiárida, nos sugiere la gran capacidad de adaptación de esta especie, aun en esta región donde la vegetación típica lo constituye: *Salsola iberica*, *Acacia constricta*, *Prosopis spp*, *Larrea tridentata*, etc. propios de estas zonas.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que *B. tabaci* es vector del agente causal del síndrome viral detectado en Chile, siendo este el cultivo principal de la región, dada esta situación es urgente aplicar acciones dirigidas dentro del contexto Manejo Integrado. La Dirección General de Sanidad Vegetal ha tomado cartas en esta problemática nacional, al implementar una campaña a nivel nacional contra esta plaga cuyo objetivo es aplicar medidas fitosanitarias a fin de prevenir, detectar, controlar y disminuir la incidencia o presencia de mosquita blanca, con el objeto de reducir pérdidas a la producción.

Estas acciones se fundamentan en la aplicación de la Norma Oficial Mexicana es

NOM-EM-027, que se basan en el manejo integrado de diversas actividades, para lo cual necesario realizar estudios en cada región ya que las condiciones bióticas como abióticas influyen de forma diferente en el comportamiento de esta plaga, de tal manera que la identificación de la mosquita blanca como *B. tabaci* constituye un factor elemental para su control.

Período de Incubación

La importancia de determinar este período, radica en que es la base de los principios de manejo integrado de patógenos, este período permite aplicar acciones más dirigidas, como el realizar cambios de fecha de siembra que junto al conocimiento del arribo del vector (Cortéz, 1992, Hernández, 1993 y Rangel, 1995) se podrá tener mejor éxito; en los resultados obtenidos en este estudio el período de incubación del virus en cada genotipo es diferente, son varios los factores que pueden estar influyendo en esta diferencia.

Entre los más probables es la constitución genética de cada genotipo; aun cuando se desconoce los mecanismos de resistencia de las plantas a la presencia de partículas virales, en algunos estudios han encontrado una correlación positiva entre los síntomas de severidad, el nivel de ADN viral y el movimiento del virus en la planta, de tal forma que a bajos niveles de acumulación de ADN viral puede reflejar una reducción en la capacidad del virus para replicarse y difundirse en el tejido infectado y con ello presentar síntomas ligeros y retraso en la aparición de ellos (Rom, *et al.*, 1993; Wyatt y Kuhn, 1979); de tal

forma que los periodos de incubación más largos pueden ser un indicativo de mayor resistencia de los genotipos hacia el virus.

Otro factor importante es la etapa fenológica de infección, esto es debido a que edades más tempranas son más susceptibles al ataque de patógenos, por la succulencia de tejidos que lo hacen atractivo a plagas y enfermedades, además la actividad metabólica en estas etapas del cultivo se incrementa (Rojas, 1979) y con ello la facilidad en el desplazamiento o movimiento del virus dentro de la planta presentando de esta manera periodos de incubación más cortos. De ahí que este periodo de susceptibilidad se considera como crítica por las pérdidas que pueden ocasionar los virus.

Como cuarto factor que se pudiera considerar como limitante es el número de mosquitas blancas infectivas empleadas en la inoculación, ya que aunque no se cuantificaron individualmente se calcula que visualmente fueron más de 1000 mosquitas utilizadas en etapa de plántula y menos de 800 mosquitas en etapa de floración; este factor se ha evaluado para otros virus, encontrando que entre 20-50 mosquitas blancas con un periodo de adquisición de 48 hr y de inoculación de 24 hr es suficiente para garantizar excelentes porcentajes de transmisión (Bird, 1986; Pilowsky y Cohen, 1990). Por lo que este factor no se puede considerar que haya influido en la diferencia del periodo de incubación.

Un factor más es el número de plantas que se consideró (por ciento de infección) para determinar el periodo de incubación, que en algunos genotipos no es muy confiable,

como en el caso del criollo que fueron dos plantas únicamente, pero si nos da una idea de cual podría ser ese periodo, por lo cual se sugiere un número mayor de plantas infectadas y para ello se requiere asegurar la inoculación del virus (por ejemplo por balística).

Entre los genotipos que resultaron en este parámetro más prometedores para la etapa de plántula fueron el Tampiqueño 74 y la línea 2 LP-2-294 y para la etapa de floración las líneas LA-S-293 y 2 LP-S-294.

Diagnóstico del Virus

La amplificación de ADN por PCR es uno de los métodos más precisos para identificación de geminivirus (Rojas, *et al.*, 1993), esta metodología permitió amplificar dos fragmentos de ADN de 0.8 Kb para el genoma A y 0.5 Kb para el genoma B del virus involucrado en el síndrome chino del chile, utilizando iniciadores específicos para un geminivirus bipartita lo cual determina que el virus presente en el ejido La Leona pertenece a este grupo además, la secuenciación parcial de nucleótidos de estas sondas llevada a cabo en el Departamento de Fitopatología de la Universidad de California y el Laboratorio de Virología del CINVESTAV-IPN-Irapuato, Gto. reveló un 95 por ciento de homología con el Texas Pepper Virus (Virus Texano del Chile) o Virus Chile Jalapeño, por lo que se puede considerar como una variante de este virus (TPGV-Coah.), el cual se ha reportado en Texas, E. U. (Stenger, *et al.*, 1990), en la Costa del Pacífico (Sinaloa) y Tamaulipas (Rivera, 1995) y su presencia ahora en Coahuila, nos conduce a pensar que la enfermedad virus texano del chile var. Coahuila tuvo su origen en Texas, avanzando hacia

México por la parte Norte el cual está muy relacionado con la variante Tamaulipas involucrada en el síndrome rizado amarillo del Chile.

Por otro lado la presencia del Virus Y de la Papa no juega un papel importante en el síndrome chino del Chile ya que se encontró en plantas asintomáticas de *C. annuum* y *N. glauca* (testigos negativos) y ausencia en malezas que resultaron positivas para TPGV-Coah., por lo que puede considerarse como un virus endémico.

Fuentes de Inóculo del Virus y Mosquita Blanca

Los resultados de estos estudios demuestran que las malezas *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium* y *D. quercifolia* juegan un papel importante para el desarrollo de la enfermedad TPGV-Coah. ya que de éstas *B. tabaci* adquiere el virus y lo introduce al cultivo (Terán y Cruz, 1991); siendo la familia Solanaceae de las más importantes, ya que se encuentra ampliamente distribuida, dentro de esta familia *N. glauca* puede considerarse la principal fuente de inóculo tanto del virus como del vector pues resultó positiva en NASH.

Otro hospedero en el cual pasa el virus de un ciclo de cultivo a otro es el mismo *C. annuum* del ciclo anterior (soca), ya que el agricultor no realiza ninguna labor cultural, quedando el cultivo en pie y produciendo rebrotes de donde la mosquita blanca puede adquirir el virus (Costa, 1976) o bien para reproducción del vector, como lo determinó Cardona, (1995) en Ecuador y Colombia al calcular tasas de emergencia por ha de soca

en pie, los resultados obtenidos indicaron que hasta 181 millones de adultos de mosquita blanca pueden emerger en una semana de una ha de soca que no haya sido destruida oportunamente.

En general la presencia de la vegetación anual y bianual (rebrotos) son dependientes de las primeras precipitaciones pluviales o de los canales de riego (humedad), los cuales actúan como un disparador para activar la aparición de estas malezas, creando con ello refugio y alimentación de *B. tabaci*. *D. stramonium* y *D. quercifolia* son dos malezas anuales hospederas del virus y mosquita blanca, las cuales se encuentran distribuidas en la periferia e interior de lotes comerciales, además de localizarse en los márgenes de los canales de riego.

El conocimiento de estas fuentes de inóculo tanto de virus como de mosquita blanca nos permite plantear estrategias de control dirigidas, realizando labores de limpieza en los márgenes y canales de riego ya que en éstos se localiza abundantemente *N. glauca*, sobre todo la eliminación de malezas hospederas de virus y mosquita blanca en la periferia del lote antes del inicio del trasplante (Caballero, 1995; Rangel, 1995) y después de éste; eliminar e incorporar el rastrojo después de la cosecha (Alvarez, A. P. y Abud-Antún, J. A. 1995; Cardona, C. 1995 y Reyes, *et al.*, 1995).

Importancia de Fuentes de Inóculo

La importancia que tiene determinar gradientes de enfermedad es entre otras

conocer la habilidad de dispersión del patógeno, definir la posición y/o importancia de las fuentes de inóculo y determinar-seleccionar las estrategias para eliminar las fuentes de inóculo. Los datos obtenidos de las plantas enfermas en este estudio no se ajustaron a los modelos de dispersión descritos Campbell y Madden (1990); sin embargo en el croquis, se observó una tendencia de mayor número de plantas enfermas en la parte Norte y Noreste con respecto a la ubicación del lote, que al determinar el promedio de plantas enfermas por bloque indicó que la maleza predominante en esa dirección fue *N. glauca*, una maleza perenne muy bien adaptada al ecosistema semidesértico de la región, condición favorable para el desarrollo de la enfermedad, esta maleza se localizó entre 10 y 20 m de distancia aproximadamente del lote en estudio, demostrándose la importancia de ésta como fuente de inóculo primario, por lo que la destrucción de esta maleza en el cultivo y los alrededores es una estrategia primordial en el manejo de la enfermedad TPGV-Coah.

Incidencia

Con respecto a la alta incidencia detectada en el ejido La Leona, está dada en parte por la fecha de siembra, que afecta a las poblaciones de mosquita blanca al dar condiciones ambientales diferentes, favoreciendo el incremento de ésta, conforme las siembras son mas tardías ya que las condiciones ambientales son favorables para el insecto como para la amplia gama de hospederos silvestres y cultivadas que permiten el incremento de poblaciones de *B. tabaci* factor importante para la rápida diseminación de la enfermedad, y colateralmente el manejo deficiente y falta de sanidad, que en general el agricultor sostiene al cultivo, estas acciones son tal vez consecuencia de los bajos recursos

económicos en que vive el agricultor en la región y al desconocimiento de los factores que favorecen para la presencia de la enfermedad.

En estudios realizados anteriormente en la misma región, se ha observado que en fechas de trasplante temprano (fines de marzo, principios de abril) se logra llegar a producción antes de que ocurra el 100 por ciento de incidencia o que alcance el siniestro total ya que el arribo del vector se realiza a fines de junio-principios de julio (Hernández, 1993), en cambio en fecha de trasplante tardío (fines de junio, principios de julio) puede alcanzar el siniestro total al momento del primer corte (Cortez, 1992); en estos trabajos se determinó que la etapa crítica del cultivo es de plántula a floración (101 días o 1003 unidades calor después del trasplante, determinado por Cortez, 1992) la cual debe permanecer con poblaciones bajas de *B. tabaci* y por ende del TPGV-Coah., para garantizar la recuperación económica.

Resistencia de Genotipos al Virus

La lucha de estrategias en forma aislada no alcanza a resolver la problemática frente a enfermedades virales, ello corresponde a prácticas de manejo integrado, donde la utilización de genotipos resistentes ocupa un lugar fundamental. Este estudio aborda este punto importante mediante la inoculación del TPGV-Coah. en cinco genotipos tanto en condiciones de invernadero como campo, los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias en los parámetros evaluados, la cual está dada primordialmente a la constitución genética de cada uno y colateralmente el grado de resistencia, que también es

afectado por la etapa del cultivo a inocular y el ambiente del lugar establecidos. Cabe hacer mención que el criollo es resultado del mejoramiento genético tradicional del agricultor al realizar una selección ciclo tras ciclo de frutos provenientes de plantas con mejores características agronómicas, con una amplia variación genética y de alguna manera con resistencia a virosis ya que elimina aquellas enfermas, esta actividad, la realizan algunos agricultores para ahorrar la compra de semilla o simplemente completar con semilla comprada.

De tal forma que los genotipos que presentaron mayor resistencia al TPGV-Coah en etapa de plántula fueron el Tampiqueño 74 y el criollo tanto en incidencia como severidad, mientras que en floración para incidencia fueron el criollo y la línea 2 LP-S-294 y para severidad el criollo y la línea LA-S-293.

Mientras que en campo en el ejido La Leona, los más prometedores fueron las dos líneas y para el ejido La Gamusa, las dos líneas en el parámetro incidencia y en severidad las que presentaron el menor grado fueron la línea 2 LP-S-294 y el Tampiqueño 74.

Estos resultados nos sugieren que los genotipos presentan diferente grado de resistencia según la constitución genética, la etapa fenológica y las condiciones ambientales existentes en las que se establecieron. Resulta interesante el comportamiento de la línea 2 LP-S-294 ya que en el periodo de incubación presentó el mas largo periodo tanto en plántula como en floración y en la evaluación de resistencia bajo condiciones de invernadero resultó el más prometedor en altura (etapa de plántula) e incidencia (etapa de

floración), mientras que en condiciones de campo resultó con mayor resistencia tanto en severidad e incidencia en ambos ejidos.

Esta evaluación, nos da la pauta de seguir realizando estudios sobre métodos de mejoramiento genético a resistencia de TPGV-Coah.

CONCLUSIONES

La especie vectora del virus involucrado en el síndrome chino del chile se identificó como *Bemisia tabaci* Gennadius.

El periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile de los genotipos en etapa de plántula varió de 10.43 a 12.4 días siendo los más prometedores el Tampiqueño 74 y la línea 2 LP-S-294, mientras que en la etapa de floración varió de 10.5 a 27.3 días siendo la línea LA-S-293 como la más prometedora.

El virus asociado al síndrome chino del chile se identificó como Virus Texano del Chile variante Coahuila.

Los principales hospederos del virus del TPGV-Coah. fueron: *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium*, *D. quercifolia* y *Capsicum annuum* (comercial y soca).

Los principales hospederos de *B. tabaci* fueron: *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium*, *D. quercifolia*, *Capsicum annuum* (comercial y soca), *Physalis phyladelphica*, *Solanum elaeagnifolium*, *Parthenium hysterophorus*, *Ambrosia confertiflora*, *Xanthium strumarium*, *Phaseolus vulgaris*, *Acacia constricta* y *Prosopis* sp.

La principal fuente de inóculo de acuerdo al gradiente de enfermedad es *N. glauca*.

La incidencia del TPGV-Coah. en siembras tempranas alcanzó 77 por ciento en etapa de fructificación del cultivo y en siembra tardía alcanzó el 100 por ciento en la etapa de prefloración.

La resistencia de los genotipos al TPGV-Coah. manifestaron diferencias por la etapa fenológica inoculada, por las condiciones ambientales en el que se establecieron los experimentos y por la constitución genética de cada uno. Los genotipos más prometedores cuando se inocularon en plántula fueron Tampiqueño 74 y el criollo, cuando se inocularon en floración fueron: el criollo y las líneas 2 LP-S-294 y LA-S-293. Los genotipos más prometedores en el ejido La Leona fueron; las líneas 2 Lp-S-294 y LA-S-293 y en el ejido La Gamusa fueron las dos líneas y el Tampiqueño 74.

RESUMEN

El chile *Capsicum annum* L se considera de gran importancia económica para México, ya que ocupa el quinto lugar entre los cultivos de exportación. En los últimos años las enfermedades virales son el factor importante que afecta el rendimiento y calidad del fruto en todas las áreas productoras del país; en virtud de la problemática que viven los productores, esta investigación se realizó con el propósito de generar información básica que bien pudiera formar parte de estrategias de un programa de manejo integrado de la enfermedad conocida regionalmente chino del chile, considerando aspectos del patógeno, vector, hospederos y su ambiente. Este trabajo se realizó durante los años de 1993 y 1994 en la UAAAN, CINVESTAV-IPN, Universidad de Davis California y en los ejidos La Leona y La Gamusa pertenecientes al municipio de Ramos Arizpe, Coah.

Para la identificación de la especie de mosquita blanca (M. B.) vectora del virus involucrado en el síndrome chino del chile, se colectaron adultos de M. B. de un lote de chile serrano enfermo de virosis, éstas se liberaron en plantas sanas para dejar que ovipositaran, posteriormente se colectaron pupas de M. B. mismas que se montaron e identificaron como *Bemisia tabaci* Gennadius.

El periodo de incubación del virus involucrado en el síndrome chino del chile se

determinó en dos etapas fenológicas de cinco genotipos, mediante inoculaciones del virus con *B. tabaci* virulíferas. En la etapa de plántula este periodo varió de 10.43 a 12.4 días siendo los genotipos más prometedores la variedad Tampiqueño 74 y la línea 2 LP-S-294, mientras que en la etapa de floración varió de 10.5 a 27.3 días siendo la línea LA-S-293 como la más prometedora.

En el diagnóstico del virus asociado al síndrome chino del chile, por medio de técnicas moleculares se logró amplificar dos fragmentos obtenidos con iniciados para geminivirus PAL1v 1978-PCRc1 y PBL1v 2040-PCRc1 (para el genoma A y B respectivamente) y que posteriormente se utilizaron como sondas, tuvieron el tamaño predicho de aproximadamente 0.8 Kb para el genoma A y 0.5 Kb para el genoma B. Posteriormente se secuenciaron en el CINVESTAV-IPN y en la Universidad de Davis California, presentando una homología del 95 por ciento con el virus texano del chile por lo que se consideró como una variante de éste (TPGV var. Coah.). Además por el método de ELISA se identificó el virus Y de la papa tanto en plantas enfermas como sanas de chile por lo que se considera un virus endémico.

Para determinar las fuentes de inóculo del TPGV-Coah. se colectaron malezas, soca y algunos cultivos de la región de Ramos Arizpe, mismas que se procesaron por el método de NASH, resultando como hospederas del virus: *Nicotiana glauca*, *Datura stramonium*, *D. quercifolia* y *Capsicum annuum* (soca). Mientras que los hospederos de *B. tabaci*, además de los anteriores *Physalis phyladelphica*, *Solanum elaeagnifolium*, *Parthenium hysterophorus*, *Ambrosia confertiflora*, *Xanthium strumarium*, *Phaseolus*

vulgaris, *Acacia constricta* y *Prosopis* sp. ya que se encontraron pupas de *B. tabaci* en todas ellas

La importancia que tienen estas fuentes de inóculo para el desarrollo de la virosis se realizó mediante gradientes de dispersión, de tal forma que la principal fuente de inóculo se identificó como *N. glauca* de donde la mosquita blanca adquiere el virus y lo transmite al cultivo comercial.

La incidencia de la enfermedad TPGV-Coah. en el ejido La Leona de Ramos Arizpe, Coah. en siembras tempranas alcanzó el 77 por ciento en etapa de fructificación del cultivo y en siembra tardía alcanzó el 100 por ciento en la etapa de prefloración del cultivo, lo cual coincide con investigaciones realizadas en la misma región.

Un factor importante como estrategia en el manejo integrado, es el uso de materiales resistentes, para lo cual en este estudio se emplearon cinco genotipos que se evaluaron para resistencia al virus TPGV-Coah. bajo condiciones de invernadero mediante inoculaciones del virus con *B. tabaci* virulíferas y en dos regiones chileras de Ramos Arizpe, Coah. bajo presión natural de la enfermedad. La resistencia de los genotipos al TPGV-Coah. manifestaron diferencias por la etapa fenológica, por las condiciones ambientales en el que se establecieron los experimentos y por la constitución genética de cada uno. Los genotipos más prometedores cuando se inocularon en plántula fueron Tampiqueño 74 y el criollo, cuando se inocularon en floración fueron: el criollo y las líneas 2 LP-S-294 y LA-S-293. Los genotipos más prometedores en el ejido La Leona

fueron: las líneas 2 LP-S-294 y LA-S-293 y en el ejido La Gamusa además de las dos líneas, el Tampiqueño 74.

LITERATURA CITADA

- Alvarez, P. A. y Abud - Antún, A. J. 1995. Reporte de República Dominicana. CEIBA. IV Taller Latinoamericano sobre moscas blancas y geminivirus. Edit. Zamorano, Honduras. Volumen 36(1)39-47
- Benner, C. P., Kuhn, C. W., Demski, J. W., Dobson, J. W., Colditz, P. and Nutter, F. W. Jr. 1985. Identification and incidence of pepper viruses in Northeastern Georgia. *Plant Disease*. 69:999-1001. United States of America.
- Berger, P. H. and Pirone, T. P. 1986. The effect to helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* 153:256-261. Orlando
- Bird, J. 1986. Geminivirus y sus vectores. *Revista Mexicana de Fitopatología* 4(1):63,67. México.
- _____ and Maramorosch, K. 1978. Virus and Virus diseases associated with whiteflies. *Advances in virus. Research Academic Press*. Vol 22:55-110. United States of America
- Bird, J. y Sánchez, R. L. 1971. Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. In: Bird and Maramorosch (Eds). *Tropical Diseases of Legumes*, Academia Press, New York. 3-125
- Brown, J. K. and Bird, J. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Disease*. 7(3):220-225. United States of America.
- _____, Campodonico, O. P. and Nelson, M. R. 1989. A whitefly transmitted geminivirus from peppers with tigré disease. (Abstract). *Plant Disease* 73:610. United States of America.
- _____, and Hise, R.B. 1984. Geminate particles associated with the leaf curl or "chino" disease of tomatoes in vastal areas of western Mexico. *Phytopathology* 74:844 (Abstract). United States of America.
- _____, Idris, A.M., and Fletcher, D. C. 1993. Sinaloa tomato leaf curl virus, and newly described geminiviruses of tomato and pepper in west coastal Mexico. *Plant Disease* 77(12):1262 (Abstract). United States of America.
- _____ and Nelson, M. R. 1988. Transmission, host range and virus-vector relationships

- of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72:866-869. United States of America.
- _____ and Nelson, M. R. 1989. Two whitefly - transmitted geminiviruses isolate from pepper affected with tigré disease. *Phytopathology* 79:908 (Abstract). United States of America.
- _____ and Poulos, B. T. 1990. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease*. 74:720 (Abstract). United States of America.
- Byrne, D., Moore, L., Palumbo, J. and Watson, T. 1991. Whitefly fact sheet. Department of Entomology. University of Arizona.
- Caballero, R. 1995. Reporte de Honduras. CEIBA. IV Taller Latinoamericano sobre moscas blancas y ge -minivirus. Edit. Zamorano, Honduras. Volumen 36(1)21-23.
- Campbell, L. C. and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. De John Wiley &WileySons, Inc. E.U.A.
- Cardona, C. 1995. Manejo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en frijol en la zona Andina: aspectos técnicos, actitudes del agricultor y transferencia de tecnología. CEIBA. IV Taller latinoamericano sobre moscas blancas y geminivirus. Edit. Zamorano, Honduras. Volumen 36(1)53-65
- Christie, R. G. and J. R. Edwardson. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultura Experiment Stations Monograph Series. IFAS. University of Florida.
- _____, Ko, N. J., Falk, B. W., Hierbert, E., Lastra, R., Bird J. and Kim, K. S. 1986. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusion bodies. United States of America.
- Cortez, M. E. 1992. Monitoreo del desarrollo fenológico del chile serrano y sus plagas principales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. México. pp 118.
- Costa, A. S. 1976. Whitefly-transmitted Plant diseases. *Ann. Rev. Inc.* 14:429-449. United States of America
- _____ and Bennett, C. W. 1950. White-fly transmitted mosaic of *Euphorbia pruni-folia*. *Phytopathology* 40:266-283. United States of America.
- Czosnek, H., Ber, R., Antignus, Y., Cohen, S., Navot, N. and Zamir, D. 1988. Isolation of tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus *Phytopathology* 78:508-512. United States of America.

- Davies, J.W. and Stanley, J. 1989. Geminivirus genes y vectors. Trends Genet. 5:77-81. Great Britain.
- Dellaporta, S. L., Woods, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant miniprep, Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21. Great Britain.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace. 1989. Phylogenetic stains : Ribosomal RNA based probes for the identification of single cell. Science 248:1360-1363. United States of America.
- Duffus, J. E. 1987. Whitefly transmission of plant viruses in current topics in vector research. Springer Verlag. New York. Vol. 4:73-91.
- Gómez, R. 1971. Los virus del trijol en Centroamérica. I. Transmisión por moscas blancas *Bemisia tabaci* Gem. y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. Turrialba 21. 22-27
- Garzón, T. J. A. 1988. Enfermedades causadas por virus en tomate y cucurbitáceas en México. Segundo taller sobre enfermedades de hortalizas. Virus. México, USA, Culiacán, Sinaloa
- _____, Torres, P. Y., Ascencio, I. J. T., Herrera, E. L. and Rivera, B. R. F. 1993. Inoculation of pepper with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. Phytopathology 83:514-521. United States of America.
- _____, Torres, P. I., Herrera, E. L. y Rivera, B. R. 1991. Caracterización molecular de un geminivirus que causa el "rizado amarillo" del chile *Capsicum annum* L, en el sur de Tamaulipas, Méx. Primer simposio nacional de biología molecular en la investigación agrícola. SARH-CINVESTAV-IPN- Unidad Irapuato- INIFAP. Celaya, Gto. 18- 28p
- Gilbertson, R. L., D. P. Maxwell, D. J. Hagedorn, and S. A. Leong. 1989. Development and application of a plasmid DNA probes for detection bacteria causing common bacterial blight of bean. Phytopathology 79:518-525. United States of America.
- _____, Rojas, M. R., Russell, D. and Maxwell, D. P. 1991b. The use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability among isolates of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. J. Gen. Virol. 72:2843-2848. Great Britain.
- Gómez, C. A. M. Schwentesius, R. R. y Merino, S. A. 1991. La producción de hortalizas de México y el Tratado de Libre Comercio con EUA y Canadá. CIESTAAM. UACH, México.
- Goodman, R. M. 1981. Geminivirus. Journal of General Virology 54:9-21. Great Britain.

- _____, Bird, J. and Thongmeearkom, P. 1977. An unusual viruslike particle associated with golden yellow mosaic of bean. *Phytopathology* 63:37-42. United States of America.
- _____ and M. E. Irwin. 1981. Whitefly-transmitted viruses in tropical agriculture. International workshop on pathogens transmitted by whiteflies. Keble College, Oxford, England.
- Hamilton, W. D. O., Bisaro, D. M., Coutts, R. H. A. and Buck, K. W. 1983. Demonstration of bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA virus by infection with the clone DNA components. *Nucleic Acids Res.* 11:7387-7396. Oxford, England.
- Hampton, E. R., Ball, S., and De Boer. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. APS, PRESS. St. Paul Minnesota, USA.
- Hernandez, A. J. M. 1993. Fluctuación poblacional de mosca blanca *Bemisia tabaci* Gen. y su relación con la transmisión del virus rizado amarillo del chile en Ramos Arizpe, Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. pp73
- Keur, J.Y. 1933. Seed transmission of the virus causing variegation of abutilon. *Phytopathology* 23:20. United States of America.
- Kirkpatrick, B. C., D. C. Stenger, T. J., Morris, and A. H., Purcell. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238:197-200. United States of America.
- Lastra, R. and Galvez, G. 1986. Whitefly-transmitted viruses in the tropics. Present as part of a symposium "International problems in tropical plant pathology", annual meeting of the America Phytopathological Society, Kissimmee, Florida.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical reviews in Plant Sciences.* 11(4):327-349. United States of America.
- Maramorosch, K., and Muniyappa, V. 1981. Whitefly transmitted plant disease agents in karnataka, India.
- Martelli, G. P. 1992. Classification and Nomenclature of plant viruses: State of the art. *Plant Disease.* 76(5):436-442. United States of America.
- Martin, J. H. 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera:Aleyrodidae). *Tropical Pest Management.* 33(4):298-322. United States of America
- Morales, F., Niessen, A., Ramirez, B. and Castaño, M. 1990. Isolation and partial charac-

- terization of a geminivirus causing bean dwarf mosaic. *Phytopathology*. 80:96-101. United States of America.
- Morinaga, T., Ikegami, M., Arai, T., Yazaki, K. and Miura, K. 1988. Infectivity of cloned tandem dimer DNAs of bean golden mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 69:897-902. Great Britain.
- Nene, Y. L. and Komal, V. 1981. Economic importance of viruses transmitted by whiteflies. International workshop on pathogens transmitted by whiteflies. Keble College, Oxford, England.
- Nitzany, F. E., Geisenberg, H. and Koch, B. 1964. Tests for the protection of cucumbers from a whitefly-borne virus. *Phytopathology* 54:1059-1061. United States of America.
- Ortega, A. L. D. y H. González. 1989 Mosquitas blancas (Homoptera : Aleyrodidae) vectores de virus de hortalizas. En ecología de insectos vectores de virus en plantas cultivadas. Chapingo, Méx. Colegio de Postgraduados.
- Pilowsky, M. and Cohen, S. 1979. Tolerance to tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease*. 74:248-250. United States of America.
- Polston, J. E., Hiebert, E., McGovern, R. J., Stansly, P. A. and Schuster, D. J. 1993. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. *Plant Disease*. 77:1181-1184. United States of America.
- Ponz, F. and Bruening, G. 1986. Mechanisms of resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:355-381. United States of America
- Pozo, C. O. 1989. Estudio y control de las enfermedades virales en el cultivo del chile. SARH-CNPH-INI FAP. Informe de Investigación. Ciclo 1989-1990. CIFAP. Reg. Pánuco. Campo exp. sur de Tamps. pp 1-7
- _____ and Montelongo, S. O. 1988. Whitefly virus vector *Capsicum*. *Newslett.* 7:68-69. United States of America.
- _____ and Quintero, S. 1988. Whitefly transmission of pepper in the Gulf of Mexico. In. Proc. of National Pepper Conference. No. State Univ. USA. pp 22.
- Rangel, C. U. 1995. Control de malezas para retardar el arribo de mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn. y su relación con la transmisión del virus del rizado amarillo del chile en Ramos Arizpe, Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coah. 64p
- Reyes, G. D., Diaz, P. R. y Reyes, C. E. 1995. Investigación sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn) en la Península de Yucatán, México. CEIBA. IV Taller Latino -

americano sobre moscas blancas y geminivirus. Edit. Zamorano, Honduras.
Volumen 36(1)105

- Rivera, B. R. 1995. Recombinación de geminivirus y sus implicaciones en la agricultura. CEIBA Vol 36(1):99-102. Zamorano, Honduras.
- Roberts, I. M., Robinson, D. J. and Harrison, B. D. 1984. Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 65:1723-1730. Great Britain.
- Rodríguez, M. R. 1971. Estudio preliminar sobre el mosaico del chile en la región del bajo. Tesis de maestría Colegio de Postgraduados. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 51p
- Rojas, G. M. 1979. Fisiología Vegetal aplicada. 2a. edición. De McGraw Hill, México. 262p.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease.* 77:340-347. United States of America.
- Rom, M., Antignus, Y., Gidoni, D., Pilowsky, M. and Cohen, S. 1993. Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease.* 77:253-257. United States of America.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1992. Programa Nacional de manejo de mosquita blanca. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitaria. México
- Sequeira, J. C. and B. D. Harrison. 1982. Serological studies on cassava latent virus. *Ann Appl Biol.* 101:33-42. Great Britain.
- Stenger, D. C., Duffus, E. J. and Villalón, B. 1990. Biological genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709. United States of America.
- Sunter, G., Buck, K. W. and Coutts, R. H. A. 1985. SI - sensitive sites in the supercoiled double-stranded form of tomato golden mosaic virus component B: identification of regions of potential alternative secondary structure and regulatory function. *Nucleic Acids Res.* 13:4645-4659. Oxford, England.
- Sylvester, E. S. 1980. Circulative and propagative virus transmission by aphids. *Ann. Rev Entomol.* 25:257-286. United States of America.

- Teran, V. A. P. y Cruz, R. 1991. Transmisión de virosis en chile serrano por mosquita blanca colectada en diferentes hospederos en el sur de Tamaulipas. SOMECH, A.C.-INIFAP-CIQA-UAAAN. Memorias Cong. Nal. Horticultura. Saltillo, Coah. Méx. pp 205
- Torres, P. I., Garzon, T. J. A., Herrera, E. L. and Rivera, B. R. F. 1993. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. J. Gen. Virol. 74:2225-2231. Great Britain.
- Uzcategui, R. C. and Lastra, R. 1978. Transmission and physical properties of the causal agent of mosaic amarillo del tomate (tomato yellow mosaic). Phytopathology. 68:985-988. United States of America.
- Vega, D., D. Teliz y R. Rodriguez. 1989. Transmisión de virus en semilla de chile (*Capsicum annuum* L). Memorias XVII Congreso Nacional de Fitopatología, Culiacan. Sin. pp 17.
- Villalon, B. 1981. Breeding pepper to resist virus diseases. Phytopathology. United States of America.
- Villateal, J. A. 1985. Malezas de Buenavista. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Watson, M. A., and Roberts, F. M. 1939. A comparative study of the transmission of *Hyalocymus* virus 3, potato Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). Proc. R. Soc. London. B. 127:543-576
- Wyatt, S.D. and C. W. Kuhn. 1979. Replication and properties of cowpea chlorotic mottle virus in resistant cowpeas. Phytopathology. 69:125-129. United States of America.
- Yañez, M. M. 1990. La mosquita blanca. Agromundo. Sepomex. 3 (18). 14-22. México.

APENDICE

APENDICE A

**TECNICA DE MONTAJE PARA LA IDENTIFICACION DE MOSQUITA
BLANCA. MARTIN, 1989.**

- 1.- Aplicar un pinchazo en un extremo inferior de las pupas para permitir el aclareo de las mismas.
- 2.- Colocarlas en hidróxido de potasio (KOH) al 40 por ciento durante 2 hr.
Las pupas negras se colocan en amoníaco sin diluir (de la marca ajax amoníaco) de 2 a 3 hr hasta que se aclaren.
- 3.- Lavar con agua durante 2 min y posteriormente secar el exceso con papel sanitario.
- 4.- Aplicar clorafenol durante 2 a 3 hr para blanquear.
Para preparar clorafenol: Mezclar Hidrato de Cloral y Fenol a una relación de 1:1.
- 5.- Dejar reposar de 1 a 2 días hasta que se disuelva.
- 6.- Colocar Bálsamo de Canadá en un portaobjetos y después las pupas clarificadas para su montaje e identificación.

APENDICE B

EXTRACCION DE ADN VIRAL DOBLE CADENA. DELLAPORTA, *et al.*, 1983

1.- Macerar en un mortero estéril 1 gr de tejido (preferentemente joven) con nitrógeno líquido.

2.- Añadir poco a poco mientras se continúa con la maceración 15 ml de Buffer 1.

Buffer 1:

TRIS 100 mM pH 8

EDTA 50 mM pH 8

Na Cl 500 mM

Mercaptoetanol 10 mM

3.- Homogenizar en Vórtex.

4.- Adicionar 1 ml de Buffer 2 y colocar en baño María a 65°C durante 10 min.

Buffer 2:

SDS al 20 por ciento 1 ml ó SDS al 10 por ciento 1 ml

5.- Agregar 5 ml de Buffer 3 y colocar en hielo por 20 min.

Buffer 3:

Acetato de Potasio 5M.

6.- Centrifugar a 18 000 rpm durante 20 min.

7.- El sobrenadante filtrar en una manta y pasarlo a un tubo de centrifuga de 15 ml.

8.- Añadir Isopropanol al doble del sobrenadante (10 ml aproximadamente) e incubar a -20°C durante 20 a 30 min.

9.- Empastillar a 16 000 rpm durante 15 min, decantar y secar a 37°C por 30 a 60 min.

10.- Resuspender la pastilla en 700 μ l de Buffer 4 ó en 1 ml de agua destilada estéril en

tubo Eppendorf.

Buffer 4

TRIS 50 mM pH 8

EDTA 10 mM pH 8

- 11.- Fenolización. Para eliminar la clorofila y desnaturalizar proteínas. Aplicar fenol en proporción 1:1 con la solución (0.7 ml).

Fenol:

-Fundir el fenol en baño María a 68°C

-Agregar 0.1 por ciento de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor parcial de RNAsa y un agente quelato de iones metal).

-Agitar por 15 min con un volumen igual de TRIS 1M.

-Pasarlo por embudo de separación y coleccionar el fenol

-Repetir la extracción 2 veces más, hasta que la fase fenólica tenga pH 7.8

-En la última extracción utilizar TRIS 0.1M.

-Guardar en frasco ambar a temperatura de 4°C.

- 12.- Vortexar por 30 seg y centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min.

- 13.- Al sobrenadante añadir cloroformo (24 cloroformo: 1 alcohol isomilico) en proporción 1:1 con la solución.

- 14.- Colocar en vórtex por 30 seg y centrifugar a 13 000 rpm durante 3 min.

- 15.- Eliminar el sobrenadante y secar la pastilla a 37°C.

- 16.- La pastilla resuspenderla en 75 µl de Buffer 5, más 500 µl de isopropanol y colocar a -20°C de 3 a 5 min.

Buffer 5

Acetato de sodio 3M.

- 17.- Centrifugar a 13 000 rpm durante 7 a 10 min.
- 18.- Decantar y lavar la pastilla con etanol al 70 a 80 por ciento (500-800 μ l)
- 19.- Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 a 10 min.
- 20.- Decantar y secar a 37°C (30 a 60 min) para resuspenderlo en 1 ml de TRIS-EDTA.
- 21.- El ADN se guarda en refrigeración a 4°C.
- 22.- Una parte del ADN extraído fue analizado por electroforesis en gel de agarosa, para separar las cadenas de ADN del virus del ADN de la planta.

APENDICE C

REACCION DE LA POLIMERISA EN CADENA (PCR).

- 1.- Colocar agua destilada estéril a la que se vaya a aforar en tubo eppendorf (Se afora a 100 μ l)
- 2.- Agregar Buffer de PCR 10X, 10 μ l.
Buffer de PCR:
50 mM de KCL
10 mM TRIS · Cl (pH 8.3 a temperatura de ambiente)
1.5 mM MgCl
- 3.- Agregar 1 μ l de los oligos (para este caso fueron PCRc1-PAL1v y PCRc1-PBL1v 2040).
- 4.- Adicionar los dNTPS (Adenina-Tiamina-Citocina-Guanina) 2 μ l de cada uno.
- 5.- La enzima polinucleasa TAQ 0.5 unidades
- 6.- Aplicar 700 μ l de aceite mineral.
- 7.- Centrifugar a 12 000 rpm por 30 seg.
- 8.- Colocar a baño María a 94°C, lo que permite abrir las cadenas de ADN.
- 9.- Colocar inmediatamente a 37°C por 2 min para pegar las oligonucleasas (iniciadores) a las cadenas de ADN.
- 10.- Colocar inmediatamente a 72°C por 2 min para que se realice la polimerización.
- 11.- Del número 8 al 10 se realiza 1 ciclo, es conveniente que se realicen de 25 a 30 ciclos para asegurar la complementación, si después de estos ciclos se realizan más, pueden formarse cadenas incompletas ya que, o puede que no alcancen los nucleótidos a formar mas cadenas, o la enzima es insuficiente.

APENDICE D

TÉCNICA DE ELECTROFORESIS.

- 1.- Preparar el gel con Agarosa al 1 o 0.9 por ciento en 100 ml de TAE 1X, se hierbe hasta que se disuelva (si después de la herbir baja el nivel de la mezcla, entonces aforar a 100 ml).

Solución stock TAE 50X:

TRIS base 242 gr

Acido acético glacial 57.1 ml

EDTA 0.5M pH 8 100 ml ó 18.612 gr de EDTA en polvo.

Aforado a 1 litro.

- 2.- Vaciar la agarosa licuada (caliente) en el portagel a un grosor de 3 a 4 mm aproximadamente, posteriormente se deja enfriar para poder quitar el peine.
- 3.- Agregar el Buffer de electroforesis (TAE 1X), sobrepasando el nivel del gel.
- 4.- En una placa de ELENA se coloca 3 ml de buffer de carga (colorante azul de bromofenol) más 5 a 10 μ l de la resuspensión de la pastilla de ADN (la cantidad dependerá de la concentración de ADN) y se coloca en los orificios realizados por el peine; para el marcador de peso molecular se mezclan 3 μ l del colorante más 1 μ l de marcador.

Colorante: 0.25 por ciento Azul de bromofenol

0.25 por ciento Xylene cyanol

- 5.- El cable de carga (-) del aparato de electroforesis se conecta en el extremo donde se coloca el ADN debido a que es de igual carga y pueda correr a 100 Voltios en cámaras grandes y 70 Voltios en cámaras pequeñas, hasta que haya corrido 3/4 partes del gel.

- 6.- Se saca el gel y se coloca en Bromuro de Etidio, el cual se introduce entre las cadenas de ADN y proyecta una refracción en la luz ultravioleta lo que permite observar mejor las bandas.

Preparación stock de Bromuro de Etidio:

Enfriar la solución a 60°C, y si se desea todo el bromuro de etidio (de una solución stock de 10 mg/ml en agua) a una concentración final de 0.5 mg/ml y mezclar perfectamente.

- 7.- Tomar fotografía.

APENDICE E**ELUSION DEL FRAGMENTO VIRAL AMPLIFICADO (GENE CLEAN)**

- 1.- Con espátula o bisturí flameado se cortan la (s) bandas de las sondas específicas colocándose en un tubo eppendorf de 1500 μ l.
- 2.- Adicionar al gel fragmentado 2 o 3 volúmenes de Ioduro de Potasio (aproximadamente 700 μ l).
- 3.- Colocar en un termoblok a 55°C para disolver el gel.
- 4.- Añadir 10 μ l de "glassmilk" (esto es de acuerdo a la concentración de ADN).
- 5.- Incubar a temperatura ambiente de 5 a 10 min, mezclando ocasionalmente por inversión.
- 6.- Centrifugar 5 seg y descartar el sobrenadante.
- 7.- Lavar la pastilla con 500 μ l de "New wash".
- 8.- Centrifugar durante 5 seg y descartar el sobrenadante.
- 9.- Dar 3 lavados más.
- 10.- Secar la pastilla a 27°C.
- 11.- Resuspender la pastilla en 10 μ l de agua desionizada estéril.
- 12.- Calentar a 55°C durante 3 a 5 min.
- 13.- Centrifugar 30 seg a 3 000 rpm y el sobrenadante (suspensión de ADN) pasarlo a otro tubo.
- 14.- Lavar nuevamente la pastilla (paso 11) y el sobrenadante unirlo con la anterior extracción.

APENDICE F

CLONACION

- 1.- Para la ligación, colocar en un tubo eppendorf de 1500 μ l lo siguiente:
 - 50 μ l de agua estéril (vial TA1)
 - 1 μ l 10X buffer de ligación (vial TA2)
 - 2 μ l vector pCRTM II resuspendido (vial TA3, 25 ng/ μ l)
 - 2 μ l producto de PCR (ADNdc)
 - 1 μ l TaADN ligasa (vial TA3)
- 2.- Incubar la reacción a 14-15°C por 4 hr (preferentemente toda la noche).
NOTA: La ligación a altas o bajas temperaturas puede disminuir la eficiencia de la ligación.
- 3.- Equilibrar el baño María a 42°C.
- 4.- Mantener un tubo de medio SOC a medio ambiente.
- 5.- Colocar un número apropiado de placas con medio agar LB con antibiótico a 37°C para eliminar el exceso de humedad (utilizar dos placas por cada TA clonado ligación/transformación). Para el primer paso de la transformación se sugiere utilizar el plásmido pUC18.
- 6.- Colocar todos los tubos de transformación a baño María (42°C) al mismo tiempo.
- 7.- Girar suavemente los tubos que contienen la reacción de ligación y colocarlas sobre hielo.
- 8.- Derretir sobre el hielo 0.5M de β Mercaptoetanol (vial TA11) y 50 μ l del vial de células competentes por cada ligación/transformación.
- 9.- Pipetear 2 μ l de 0.5M β Mercaptoetanol dentro de cada vial de las células competentes y mezclar por agitación con una pipeta. NOTA: No mezclar por

- pipetación hacia arriba y hacia abajo.
- 10.- Pipetear 1 μ l de cada TA clonado reacción de ligación (0.1 μ l del plásmido pUC18 diluido para el control) directamente dentro de las células competentes y golpear suavemente. Almacenar el resto de la mezcla de ligación a 20°C.
 - 11.- Incubar el tubo sobre hielo por 30 min.
 - 12.- Transferir el tubo a baño María e incubar por 30 seg. exactamente. No mezclar.
 - 13.- Remover el tubo del baño María e inmediatamente colocar sobre hielo durante 2 min.
 - 14.- Adicionar 450 μ l de medio SOC precalentado a cada tubo.
 - 15.- Colocar el tubo en una termocentrífuga, asegurando los tubos con tela adhesiva para evitar que se saiga el tubo. Agitar a 37°C, durante 1 hr a 225 rpm.
 - 16.- Mientras los tubos están en agitación, flamear una varilla de vidrio y darle una forma de "L". Preparar las placas con medio LB agar conteniendo Kanamycina (50 μ l/ml) para extender 25 μ l de X Gal (40 mg/ml stock en dimetilformamida) en la parte superior del agar con la varilla de vidrio. Dejar que el X Gal se difunda dentro del agar aproximadamente 1 hr.
 - 17.- Colocar el tubo con las células transformadas sobre hielo.
 - 18.- Extender 25 μ l y 100 μ l de cada tubo de transformación por separado, etiquetar las placas con agar LB conteniendo antibiótico y X Gal.
 - 19.- Invertir las placas y colocarlas a incubación a 37°C toda la noche.

NOTA: En algunas ocasiones, la incubación es más larga (arriba de 40 hr), es requerido para dejar que el azul se desarrolle en colonias de formación.

- 20.- Seleccionar las colonias blancas para de ahí aislar el plásmido y realizar análisis de restricción, PCR o secuenciación.

APENDICE G

MINIPREPARACION DE SONDAS (MIDI PREP). SAMBROOK, et al., 1989

- 1.- Para esta investigación se prepararon 2 matraces con 50 ml de Medio Terrific Broth (TB) y antibiótico (Ampicilina 75 μ l)

Terrific Broth para 1 lt

En 900 ml de agua desionizada agregar.

Bacto - triptona	12 gr
Bacto - Extracto de Levadura	24 gr
Glicerol	4 ml

Agitar hasta disolver los solutos y esterilizar en autoclave por 20 min a 15 lb/in².

Dejar la solución enfriar hasta 60°C o menos y entonces agregar 100 ml de solución estéril de KH_2PO_4 0.17M, K_2HPO_4 0.72M (Esta solución se realiza disolviendo 2.31 gr de KH_2PO_4 y 12.54 gr de K_2HPO_4 en 90 ml de agua desionizada. Después de que las sales han sido disueltas, se ajusta el volumen de la solución a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza en autoclave por 20 min a 15 lb/in²).

- 2.- Se inoculan las cepas bacterianas con los plásmidos que se desea purificar, en cada matraz y se incuba a 37°C, durante 24 a 72 hr.
- 3.- En dos tubos de 30 ml con tapa de rosca vaciar 25 ml de cada una de las cepas incubadas y centrifugar a 12 000 rpm por 2 a 3 min, eliminar el sobrenadante y dejar escurrir la pastilla durante 5 min.
- 4.- A cada tubo agregar 3 ml de Solución I de Birboin y Doly, agitando hasta lograr la resuspensión completa.

Solución I.

Glucosa	50 mM
TRIS·Cl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

La solución I puede ser preparada en matraz de aproximadamente 100 ml, esterilizando en autoclave por 15 min a 10 lb/in² y almacenar a 4°C.

- 5.- Colocar en hielo.
- 6.- Añadir a cada tubo 6 ml de solución II, agitar por inversión e incubar en hielo por 5 min.

Solución II.

NaOH 0.2 N (recientemente diluido en sol. stock 10 N).

SDS 1 por ciento

- 7.- Adicionar 6 ml de la solución III y agitar por inversión unas 50 veces. Incubar en hielo por 10 min.

Solución III.

Acetato de potasio 60.0 ml

Acido acético glacial 11.5 ml

Agua 28.5 ml

La solución resultante es de 3 M con respecto a potasio y 5M con respecto a acetato.

- 8.- A cada tubo añadir 1.25 ml de acetato de potasio de pH 4.8, agitar por inversión y se deja 20 min en hielo.
- 9.- Centrifugar a 8 000 rpm a 4°C.
- 10.- El sobrenadante pasarlo a tubos PA.

- 11.- Añadir una parte de isopropanol y agitar por 10 min a temperatura ambiente.
- 12.- Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min y eliminar el sobrenadante.
- 13.- Lavar la pastilla en 5 ml de etanol al 70 por ciento, centrifugar y secar la pastilla.
- 14.- Resuspender la pastilla en 200 ml de TE 2X (agua estéril) y pasarlo a un tubo eppendorf.
- 15.- Hacer digestiones con RNAsa, 10 ml por tubo durante 45 min a 37°C.
- 16.- Fenolizar (Fenol-cloroformo) 2X.
- 17.- Concentrar con 2-butanol.
- 18.- Añadir 40 ml de Acetato de Sodio 3M mas 2 a 2.5X de etanol y dejar durante 10 a 20 min a 10°C; centrifugar y lavar la pastilla con etanol al 70 por ciento, para posteriormente centrifugar y secar la pastilla (se dejó toda la noche).

APENDICE H

MARCAJE DE SONDA

- 1.- En un tubo eppendorf de 1 µl colocar 15 µl de agua desionizada estéril y 5 µl de la sonda linealizada preparada, colocar a 95°C durante 5 min para inmediatamente colocarlo en hielo para abrir las cadenas.
- 2.- Aplicar los nucleótidos 6 µl (2 µml de cada uno: Adenina, Tiamina y Guanina), el buffer 5X y la enzima Klinow para polimerizar.
- 3.- Posteriormente aplicar de 2 a 3 µl del nucleótido radiactivo (Citocina + fósforo radiactivo) en cuarto especial de radiactividad.
- 4.- Colocar a 37°C durante 1 hr.
- 5.- Por separado en un tubo eppendorf perforado (con una aguja de jeringa de insulina) colocar perlita y bajo éste otro tubo eppendorf sin perforar.
- 6.- En el tubo eppendorf con perlita vaciar el tubo con la sonda radiactivo, centrifugar a 3 000 rpm durante 5 min para atrapar en la perlita el sobrante radiactivo.

APENDICE I

PREPARACION DE MEMBRANAS

- 1.- Realizar cortes (discos) de hojas jóvenes con sacabocado flameado.
- 2.- Macerar las muestras sobre las membranas con un tubo de ensaye flameado; con unas pinzas estériles remover los residuos de fibra procurando no tocar las membranas con las manos.
- 3.- Duplicar las muestras sobre la membrana y agregar un testigo positivo y negativo.
- 4.- Anotar el arreglo de los discos con respecto al corte de la membrana con nombre y fecha.
- 5.- Dejar secar al aire libre
- 6.- Almacenar a temperatura ambiente dentro de bolsas de nylon.

APENDICE J

FIJACION DE ADN A MEMBRANAS (BLOTTING)

- 1.- En una charola colocar papel filtro e impregnar con NaOH 0.5 N, colocar las membranas durante 5 min.
- 2.- Cambiar las membranas a otra charola con papel filtro impregnadas con TRIS 1M pH 7.4, durante 5 min, agitando ocasionalmente.
- 3.- Transferir las membranas a otra charola con solución SSC 2X, durante 5 min, agitando ocasionalmente.
- 4.- Transferir nuevamente las membranas a etanol al 95 por ciento, durante 5 min agitando ocasionalmente.
- 5.- Secar sobre papel filtro.
- 6.- Colocar en bolsas de plástico y exponer por 12 seg a luz ultravioleta con la finalidad de fijar el ácido nucleico a las membranas.

APENDICE K**HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS POR MACERACION (NASH)**

- 1.- Colocar las membranas por separado en una bolsa de nylon selladas y con solución de prehibridación (permite cubrir todos los espacios vacíos de la membrana).

Solución de Prehibridación:

6X SSC

5X Denhardt's reactivo

0.5 por ciento SDS

100 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado

Reactivo de Denhardt's 50X:

5gr Ficoll (Tipo 400 farmacéutico)

5gr Polivinilpirrolidona

5gr Suero de albúmina de bovino

Aforar a 500 ml y filtrar a través de un filtro de acetato de celulosa y conservar a -20°C

- 2.- Colocar a 55°C con agitación durante 3 a 6 hr.
- 3.- En un tubo eppendorf colocar 15 μl de H_2O desionizada estéril y 5 μl de la sonda linealizada preparada, colocar a 95°C durante 5 min para inmediatamente colocarlo en hielo, posteriormente aplicarlo a las membranas ya lizadas, dejándolo a 37°C durante toda la noche, agitándose constantemente para hibridar.
- 4.- Preparar la radiografía en film Kodak X-Omat a a -70°C .
- 5.- Dejar de 24 a 48 hr para el revelado.

APENDICE L

ENSAYO DE INMUNOADSORCION CON ENZIMAS LIGADAS (ELISA)

- 1.- Sensibilización de la placa. Adicionar 100 μ l de anticuerpo (gammaglobulina) diluida en Buffer de cobertura a cada orificio e incubar de 2 a 4 hr a 37°C o toda la noche a 4°C.

Buffer de Cobertura.

1.59 gr Na_2CO_3

2.93 gr NaHCO_3

0.2 gr NaNO_3

pH 9.6

- 2.- Aforar a 1 lt de agua destilada.
- 3.- Lavar la placa. Llenar los orificios con PBS-Tween y dejar reposar durante 3-5 min. Vaciar la placa. Repetir el proceso tres veces, al final eliminar los restos de la solución de lavado.

PBS-Tween.

8.0 gr NaCl

0.2 gr NH_2PO_4

2.9 gr Na_2HPO_4

0.2 gr KCl

0.2 gr NaN_3

0.5 ml Tween 20

pH 7.4

Aforar a 1 lt con agua destilada.

- 4.- Bloqueo. Cubrir los orificios con buffer de bloqueo aplicando 300 μ l en cada uno.

Dejar 2 hr a 37°C.

Buffer de Bloqueo.

Albúmina de huevo 1 por ciento

PBS

- 5.- Colocación de la muestra (conteniendo el antígeno). Añadir a cada orificio 100 μ l de la muestra prueba (maceradas y diluidas a una relación de 1:10 en buffer de extracción). Incubar por 4 hr a 37°C o toda la noche a 4°C.

Buffer de Maceración.

1.65 gr General Extrac Buffer

1.0 ml Tween 20

50 ml Agua destilada o 1.39 gr Sulfito de sodio

20 gr PVP MW 24-40 000

0.2 gr NaN_3

2.0 gr Albúmina de huevo

20 gr Tween 20

pH 7.4

- 6.- Diluir en 1 lt de PBS-Tween y almacenar a 4°C
- 7.- Lavar con PBS-Tween.
- 8.- Adición del conjugado enzimático. Aplicar 100 μ l del conjugado enzimático previamente diluido en Buffer de Conjugado. Dejar de 3 a 6 hr a 37°C o toda la noche a 4°C.

Buffer de Conjugado.

0.1 gr Albúmina de huevo

1.0 gr PVP

0.01 gr NaN_3

pH 7.4

Diluir en 50 ml de PBS-Tween.

9.- Lavar con PBS-Tween.

10.- Adición del sustrato. Adicionar 100 μl del sustrato apropiado a cada orificio e incubar a temperatura ambiente por el tiempo necesario para observar la reacción (15 min a 1 hr).

Buffer de Sustrato.

97 ml Diethanolamina

0.2 gr NaN_3

pH 9.8

Aforar a 1 lt con agua destilada.

Sustrato.

5 ml Buffer de sustrato

1 pastillas PNP

Reacción positiva. Si esta presente el virus se tomará de transparente a amarillo.

Parar la reacción con una solución apropiada (NaOH 3M o H_2SO_4 3M).

APENDICE M

UNIDADES DE MEDIDA Y SUS ABREVIACIONES

Unidad	Abreviación
Milímetro (s)	mm
Nanómetro	nm
Molar	M
Normal	N
Minimolar	mM
Litro (s)	lt
Mililitro (s)	ml
Microlitro (s)	μ l
Gramo (s)	gr
Miligramo (s)	mg
Nanogramo (s)	ng
Hora (s)	hr
Minuto (s)	min
Segundos (s)	seg
Revoluciones por minuto	rpm
Libras por pulgada cuadrada	Lb/in ²
Celcius o Centígrado	°C
Potencial Hidrógeno	pH
Kilobase (s)	Kb