

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

IDENTIFICACION PARCIAL DE UN VIRUS ASOCIADO CON LOS
SINTOMAS DEL FRUTO BLANCO DEL CHAYOTE (*Sechium edule*
[Jacq.] Sw) EN VERACRUZ, MEXICO

TESIS

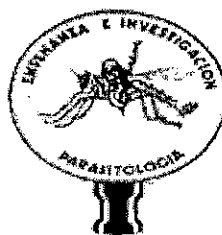
QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

JOSE LUIS CONTRERAS OVIEDO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Diciembre del 2005

Chapingo, Estado de México

IDENTIFICACION PARCIAL DE UN VIRUS ASOCIADO CON LOS
SINTOMAS DEL FRUTO BLANCO DEL CHAYOTE (*Sechium edule*
[Jacq.] Sw) EN VERACRUZ, MEXICO

Tesis realizada por **José Luis Contreras Oviedo**, bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

ASESOR:


DR. VICTOR MANUEL PINTO

ASESOR: :


DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala y al PROMEP por el apoyo financiero para la realización del presente posgrado.

Al M.C. Víctor Cisneros del Centro Oriente (C.R.U.O.) de la Universidad Autónoma Chapingo, por su apoyo para la realización de los muestreos y colecta de plantas enfermas en la región de Actopan, Ver.

Al M.C. Jorge Aguilar, jefe del laboratorio de virología del Centro nacional de Referencia fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal del la SAGARPA, por su apoyo para la realización de las pruebas de PCR para la detección de fitoplasmas, virus de ADN y rT-PCR del genoma viral en el mencionado laboratorio.

Al Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz, Profesor investigador de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades y apoyo para la realización de las pruebas de aislamiento y purificación de RNA de doble cadena y microscopia electrónica, en las instalaciones de dicho centro de investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en Jasso; Hidalgo, México en el año de 1953. concluyó la licenciatura en Agronomía en el año de 1981 en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. De 1981 a 1984 fue Coordinador General de la Unidad de Producción Agropecuaria Santa Elena, de la misma universidad, ubicada en el Estado de Tlaxcala. A finales de 1983 se integró al grupo de académicos que diseñaron y fundaron la Licenciatura en Biología Agropecuaria en la universidad Autónoma de Tlaxcala y fue coordinador de la misma en el periodo 1984 a 1988. Desde 1993 es coordinador del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la misma universidad. Además, desde el año de 1983, ha desarrollado actividades de extensionismo y capacitación agrícola en los Estados de Puebla y Tlaxcala.

DEDICATORIA

A mi hija Christian Scarlett .

A mis padres: Francisco Contreras Avendaño y Maria del Carmen Oviedo Martínez .

A mis hermanos Alma Rosa, Gloria Maria, Francisco, Edgardo, Maria Eulalia y Carmen Hilda.

INDICE

LISTA DE CUADROS	Pagina viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
HIPOTESIS.....	6
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	8
Transmisión mecánica.....	8
Pruebas de patogenicidad.....	9
Microscopía electrónica.....	9
Prueba serológica (DAS-ELISA).....	10
Extracción y análisis de ARN de doble cadena	10
RT-PCR	11
PCR específica para fitoplasmas.....	12
PCR específica para geminivirus	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
Transmisión mecánica.....	14

Pruebas de patogenicidad.....	16
Microscopía electrónica.....	17
Prueba serológica (DAS-ELISA).....	17
Extracción y análisis de ARN de doble cadena	18
RT-PCR	21
PCR específica para fitoplasmas.....	22
PCR específica para geminivirus	22
CONCLUSIONES.....	23
LITERATURA CITADA.....	24

LISTA DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1 Respuesta de las diversas plantas indicadoras usadas en el estudio, a los virus mas comunes en cucurbitáceas, comparadas con la respuesta presentada al virus en estudio (V E)	16

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Frutos maduros de chayote, con la característica falta de color de la enfermedad del "Fruto blanco"	2
Figura 2	Guías, zarcillos y frutos de diversas edades afectados por la enfermedad del "Fruto blanco del chayote".....	2
Figura 3	Manchas necroticas en <i>G. globosa</i> Inoculada con <i>S. edule</i> enfermo.....	15
Figura 4	Aclaramiento de nervaduras, mosaico e hiponastia en <i>C. pepo</i> . Inoculada con <i>G. globosa</i> enferma	15
Figura 5	Aclaramiento de nervaduras en hojas de chayote en campo	17
Figura 6	Hojas de chayote en invernadero, inoculadas con savia de <i>C. pepo</i> enferma, mostrando el mismo aclaramiento de nervaduras que las plantas de chayote en campo.....	17
Figura 7	Partícula viral en forma de varilla flexible en el extracto de <i>C. pepo</i> enferma.	18
Figura 8	Partículas virales en forma de varilla flexible.....	18
Figura 9	Electroforesis de RNAdc en poliacrilamida. Carril 1,7:	

	CMV; Carril 2: Fruto de <i>S. edule</i> enfermo; Carril 3: hojas de <i>S. edule</i> enfermo; Carril 4: <i>C. pepo</i> enferma + DNAasa; Carril 5: <i>C. pepo</i> enferma; Carril 6: <i>C. pepo</i> enferma + RNA asa.....	19
Figura 10	Electroforesis de RNAdc de plantas de <i>C. pepo</i> , en poliacrilamida: carril 1: CMV; 2. TMV; 3, 5,6: <i>C. pepo</i> enferma; 4: <i>C. pepo</i> sana; 7:TMV; 8: CMV.....	20
Figura 11	Electroforesis en agarosa al 0.8% de los productos de la RT-PCR. carril M = marcador Ladder 123 Gibco, Carril 1 = <i>C. pepo</i> 5 días, Carril 2 = <i>C. pepo</i> 15 días, +1 =PVY.	21
Figura 12	Electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de la RT-PCR. carril M = Marcador molecular Ladder 100 Promega, Carril (+1) = PVY; Carril 1 = <i>C. pepo</i> 5 días; Carril 2 = <i>C. pepo</i> 15 días.....	21

RESUMEN

IDENTIFICACION PARCIAL DE UN VIRUS ASOCIADO CON LOS SINTOMAS DEL FRUTO BLANCO DEL CHAYOTE (*Sechium edule* [Jacq.] Sw) EN VERACRUZ, MÉXICO.

José Luis Contreras Oviedo. Maestro en Ciencias.

Universidad Autónoma Chapingo.

Rodolfo de la Torre Almaráz, Director de Tesis.

Se separó un virus de plantas de chayote (*Sechium edule* [Jacq.] Sw), cultivadas en la región de Actopan, Veracruz, con síntomas de mosaico y deformación severa de hojas, decoloración de zarcillos, guías y frutos, por lo que a esta enfermedad se le denominó "fruto blanco del chayote". Se determinó que el virus relacionado con los síntomas de fruto blanco, era mecánicamente transmisible, con un rango estrecho de hospedantes, causando solo lesiones locales necróticas en las hojas inoculadas de *Gomphrena globosa*; en hojas de *Cucurbita pepo* causó lesiones locales cloróticas, después mosaico con deformación severa y reducción del tamaño de tallos y hojas. En plantas de chayote producidas en el invernadero e inoculadas con este virus se observaron lesiones locales cloróticas o moteados, después mosaico y deformación de hojas y tallos. Se determinó que el patógeno asociado con la enfermedad del fruto blanco del chayote era un virus de RNA de cadena sencilla, con forma de varilla flexible de aproximadamente 650 nm de longitud, probablemente

relacionado con la familia Potyviridae. El ensayo rt-PCR confirmó que la enfermedad del fruto blanco del chayote es causada por una especie de Potyvirus aún desconocida.

Palabras clave: Virus ARN, Potyvirus

ABSTRACT

José Luis Contreras Oviedo.

THE PARTIAL IDENTIFICATION OF A VIRUS ASSOCIATED WITH THE CHAYOTE (*Sechium edule* [Jacq.] Sw) WHITE FRUIT SYMPTOMS IN VERACRUZ, MEXICO

December 8 of 2005

(under the direction of Rodolfo De La Torre Almaráz)

ABSTRACT

A virus was isolated from leaves and chayote plants (*Sechium Edule* [Jacq.] Sw), grown in the region of Actopan, Veracruz, Mexico, that had symptoms of mosaic and severe leaf deformation, as well as discoloration in tendrils, main stems, and fruit. The disease was therefore called the "Chayote White Fruit". It was determined that the virus related to the white fruit symptoms was mechanically transmissible to a narrow range of hosts, producing only local necrotic lesions in *Gomphrena globosa* leaves; in *Cucurbita pepo* L. leaves, it produced localized chlorotic lesions, followed by severe deformation and a reduction in leaf and shoot size. Localized chlorotic or mottled lesions were first observed in chayote plants grown in greenhouses that had been inoculated with this virus and later, mosaic and deformation on leaves were observed. It was determined that the pathogen related with the chayote white fruit disease was a single strand RNA virus, with a flexible rod shape 650 nm long that probably

belongs to the Potyviridae family. The rt-PCR test confirmed that the chayote white fruit disease is produced by a still undetermined Potyvirus species.

Key words: RNA viruses, Potyviruses.

INTRODUCCION

El chayote (*Sechium edule* [Jacq.] Sw) es una planta originaria de las regiones tropicales del sur de la República Mexicana y Centro América (Cook, 1901). Históricamente ha sido una planta de traspatio. Actualmente se cultiva en el Continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta América del Sur y Las Antillas. También se siembra en las regiones tropicales y subtropicales de Malasia, Australia, Nueva Zelanda, India, el sur de Europa y Algeria (Newstrom, 1985).

En nuestro país, se cultiva de manera comercial principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco y Veracruz, destinando la mayoría de su producción a la exportación hacia los Estados Unidos de Norteamérica. En el estado de Veracruz, se cultivan alrededor de 2000 Has. distribuidas en aproximadamente 14 municipios de la zona central, destacando el municipio de Actopan, la zona de Orizaba-Iztaczoquitlán y la zona de Coscomatepec-Huatusco.

A partir de 1997, los productores de la región de Actopan, Ver. han venido enfrentando pérdidas económicas debido a la aparición de una enfermedad, al parecer de origen desconocido, que ellos han denominado como "frutos blancos" (Figura 1), mismos que son rechazados en los mercados nacionales e internacionales.

Los síntomas que presentan las plantas que producen este tipo de frutos son la falta de la pigmentación verde en guías, zarcillos y característicamente en los frutos, mientras en las hojas maduras de las plantas enfermas se observan mosaicos y deformación de hojas. Los síntomas se pueden presentar en cualquier etapa de desarrollo del cultivo (Figura 2).

Las plantas afectadas no presentan síntomas necróticos, pudriciones, marchitez ni alteraciones del crecimiento y tampoco mueren prematuramente. El síndrome ha sido atribuido a deficiencias nutricionales o a alteraciones genéticas. Sin embargo, por el tipo de daños que manifiestan las plantas enfermas, es probable que esta enfermedad sea causada por virus o patógenos similares, por tanto los objetivos del presente trabajo fueron determinar y caracterizar al agente causal de la enfermedad del fruto blanco del chayote que se cultiva en la región de Actopan, Veracruz, México.

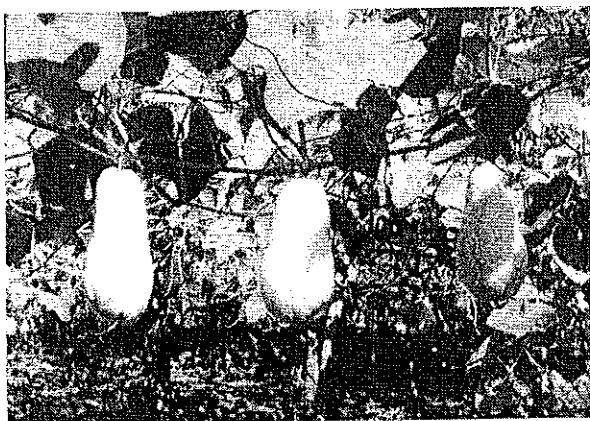


Figura 1.- Frutos maduros de chayote, con la característica falta de color de la enfermedad del "Fruto blanco".



Figura 2.- Guías, zarcillos y frutos de diversas edades afectados por la enfermedad del "Fruto blanco del chayote"

ANTECEDENTES.

El chayote (*Sechium edule* [Jacq.] Sw) pertenece a la familia de las cucurbitáceas, en la que se incluyen géneros y especies de mucha importancia en la alimentación mundial, como: calabazas (*Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. maxima*, *C. mixta.*), melón (*Cucumis melo*) , sandía (*Citrullus lanatus*) y pepino (*Cucumis sativus*). Estas plantas han recibido mucha atención científica por la importancia alimenticia que representan, disponiéndose en la actualidad de una gran cantidad de información acerca de los diversos patógenos que las atacan. En lo referente a los virus que pueden atacar a las cucurbitáceas, se sabe que existen un numero considerable de virus y algunos viroides capaces de infectar natural o artificialmente a una o varias especies de cucurbitáceas. De ellos, solamente 25 virus y un viroide han sido detectados en infecciones naturales (Alvizo y Lozoya,1987).

Los reportes de virus en cucurbitáceas en campos agrícolas de México son bastantes, destacando los de Maine *et al.*, 1969 y Nelson *et al.*, 1966, quienes reportaron la presencia de Cucumber mosaic virus (CMV), Squash mosaic virus (SqMV), Watermelon mosaic virus variante 2 (WMV-2) y Papaya ring spot virus (PRSV-W); Verdugo, en 1983 reporta al Tobacco ringspot virus (TRSV); Nameth *et al.*, en 1985 reportan el Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). Mas recientemente, en 1990, Silva y Delgadillo (1990) reportan la presencia de los mismos virus en campos de calabacita en el noreste del Estado de Sinaloa y, Aguilar y Lozoya confirman la presencia de CMV, SqMV, ZYMV y WMV en el estado de Morelos.

Respecto a las enfermedades del chayote causadas por virus, viroides o fitoplasmas, poca información ha sido generada a nivel mundial y nula a nivel nacional, debido tal vez a la poca atención científica que se le ha dado a esta especie por su corta historia agrícola comercial.

En 1985, Silveira, Ávila y Muñoz, en Brasil, reportaron haber aislado partículas del virus de la marchites manchada del tomate (TSWV) de hojas de chayote.

En 1997, Hord *et al.* reportaron la presencia en campos de cultivo comercial de chayote en Costa Rica, de un virus que causaba manchas y anillos cloróticos en hojas, mosaico y deformación de las hojas, al que llamaron virus del mosaico del chayote (ChMV). El virus fue aislado de plantas de chayote naturalmente infectadas en campo y subsecuentemente los síntomas observados en campo fueron reproducido en chayote, por inoculaciones artificiales con el virus bajo condiciones de invernadero.

Las conclusiones del trabajo de estos investigadores indicaron que la enfermedad estudiada era causada por un virus de RNA de cadena sencilla con un tamaño molecular estimado de aprox. 5.7 Kb, con partículas virales de forma icosaédrica de 29 nm de diámetro. Se observaron conglomerados de partículas virales rodeando a los cloroplastos de las células del mesófilo e inclusiones citoplasmáticas, cristalinas y angulares en células guarda, epidérmicas y en los tricomas. El virus fue nombrado "virus del mosaico del chayote" (ChMV) y fue provisionalmente ubicado en el grupo Tymovirus. En 1999, Yuki *et al.*, en un trabajo en el que analizaron mas de 600 muestras de cucurbitáceas procedentes de 38 de 40 regiones agrícolas del estado de Sao Paulo, Brasil para detectar la presencia, distribución e incidencia relativa de los

virus: Cucumber mosaic Virus (CMV), Papaya Ringspot virus-watermelon (PRSV-W), Watermelon mosaic Virus-2 (WMV-2), Zucchini Letal Chlorosis Virus (ZLCV), Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV) reportaron haber encontrado, mediante pruebas de ELISA, que de 23 muestras de chayote analizadas y que presentaban síntomas que sugerían la presencia de virus (clorosis, aclaramiento de nervaduras, moteado, deformación de hojas, frutos deformes y/o pequeños, decolorados, etc), cuatro dieron reacción positiva con antisuero de PRSV-W, una con anti-ZLCV y el resto dio reacción negativa para los demás antisueros, no significando esto que no estuviera presente algún virus. En el año 2000, Bernal *et al.* lograron definir el rango de hospedantes del virus estudiado por Hord *et al.*, en 1997, así como la secuencia nucleotídica de su RNA genómico, demostrando que el ChMV es una nueva especie del género Tymovirus. En el mismo año, Montano *et al.* en Brasil, detectó y clasificó el fitoplasma que podría ser la causa de la enfermedad conocida como "Chayote Witches-broom" (ChWB), que ocasiona que las plantas presentes crecimientos en forma de "escoba de bruja", achaparramiento y amarillamiento generalizado, malformación de hojas, caída de flores y frutos y malformación de frutos.

HIPÓTESIS

La enfermedad del fruto blanco del chayote es la causa de la pérdida gradual de la producción de esta planta en las regiones productoras de la región de Actopan, Veracruz. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de mosaicos y deformación de hojas, pero típicamente se distingue por la decoloración total de los frutos. Las plantas afectadas no presentan síntomas necróticos, pudriciones, marchitez ni alteraciones del crecimiento. Por el tipo de daños que manifiestan las plantas enfermas, es probable que esta enfermedad sea causada por uno o varios virus o agentes transmisibles similares de naturaleza desconocida o no descritos en México.

OBJETIVOS

Por la naturaleza de los síntomas observados en plantas de chayote con la enfermedad del fruto blanco y ante la posibilidad que esta enfermedad sea causada por virus o agentes transmisibles similares los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1.- determinar y caracterizar al agente causal de la enfermedad del fruto blanco del chayote que se cultiva en la región de Actopan, Veracruz, México.

MATERIALES Y METODOS

Después de descartar la posibilidad de que la enfermedad pudiera ser causada por un hongo, bacteria o nematodo, por la ausencia de síntomas o signos relacionados con esos patógenos, se determinó que existía la posibilidad de que el o los agentes causales de la enfermedad del "fruto blanco del chayote" pudiera ser un virus o agentes transmisibles similares, como fitoplasma, no conocidos en México, se procedió a desarrollar el conjunto de pruebas que se describen a continuación a fin de conocer algunas de las características biológicas de los agentes involucrados, necesarias para poder realizar una adecuada identificación taxonómica, además de verificar los postulados de Koch, modificados por Bos en 1981 para virus de plantas (Dijkstra *et al.*, 1998).

Transmisión mecánica.

Porciones de epidermis de fruto de chayote con los síntomas de fruto blanco fueron macerados con solución buffer de fosfatos (0.01M pH 7.0) en un mortero estéril. Con ayuda de un hisopo de algodón, se frotó el macerado en las hojas de tres series de plántulas con dos a cuatro hojas verdaderas, de las siguientes especies: *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *Capsicum annuum* L., *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* L, *Nicotiana benthamiana* L., *N. Glutinosa* L., *N. clevelandii* L.y *N. Tabacum* L. var *xanthi* , previamente espolvoreadas con carborundum. Las hojas inoculadas fueron lavadas con agua corriente para eliminar los residuos de abrasivo y de macerado. Las plantas se incubaron en invernadero a 25- 30°C, con fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa del 70%, hasta la aparición de síntomas o durante un periodo

máximo de 30 días. Con las plantas que desarrollaron síntomas, se realizó una nueva prueba de transmisión mecánica en tres serie de plántulas similar a la anterior, incluyendo además las siguientes especies: *Cucurbita pepo* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Cucumis sativus* L., *Vicia faba* L., *Pisum sativum* L. Dentro de las plantas indicadores que dieron resultado positivo a dicha inoculación, se seleccionó, para mantener y propagar el virus involucrado en la enfermedad, a aquella en la que los síntomas fueron muy evidentes, el periodo de incubación haya sido el más corto y el tejido vegetal no presentara características que dificultaran la transmisión mecánica a otras plantas (Kurstak, 1981; May, 1985).

Pruebas de patogenicidad

Se plantaron cinco frutos de chayote que mostraban claros indicios de germinación de la semilla (presencia de raicecillas), en macetas de 20 cm de diámetro y se incubaron en invernadero a 25- 30°C. Cuando se encontraban en tercera hoja, cuatro plantas fueron inoculadas mecánicamente con macerado de hojas de plantas de zucchini en la que se ha venido conservando el virus extraído del fruto de chayote infectado. La quinta planta se utilizó como testigo (Dijkstra, J., and P.C. De Jager. 1998).

Microscopia electrónica

Sobre una rejilla de cobre de 300-400 mesh, recubierta de formvar (0.25% en dicloroetano), se colocó una gota de 50 µL de savia de planta de calabacita enferma. La muestra fue fijada con glutaraldehído al 1% en buffer de fosfatos (0.01M pH 7.0) durante 15 min. y teñida posteriormente con acetato de uranilo

(2%, pH 4.2) Para la observación de las rejillas se utilizó un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL 100 CX (Hitchborn- Hills, 1965).

Prueba serológica (DAS-ELISA)

Con el propósito de detectar la posible presencia de algún potyvirus conocido, se utilizó la técnica de inmunoadsorción enzimática en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA), para desarrollarse en dos días (Clark y Adams, 1977), usando muestras de tejido foliar de plantas de *C. pepo* infectadas y fruto de chayote. Se utilizaron antisueros policlonales comerciales (Agdia, Co) para la detección de los virus causantes de: Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco etch virus (TEV), Watermelon mosaic virus- 2 (WMV-2). La absorbancia de las posibles reacciones antígeno-anticuerpo se registraron en un Microlector con filtro de 405 nm, alrededor de 20-30 min después de la adición del sustrato. La prueba se consideraría válida si la relación Testigo (+) / Testigo (-) es mayor o igual 10:1 y, positiva la reacción si la absorbancia de la muestra problema es igual o mayor a 3 veces la lectura del T(-) o si la lectura del T(-) era menor de 0.033.

Extracción y análisis de ARN de doble cadena

La extracción y análisis del RNAdc se realizó usando el procedimiento descrito por Valverde *et al.*, 1990, usando hojas y frutos jóvenes de chayote colectados en campo y hojas de plantas de zucchini sanas y de aquellas en las que se ha conservado el virus. La electroforesis del RNAdc obtenido se realizó en geles de 1.5 mm X 7 cm X 8 cm de poliacrilamida al 0.8 %, Se incluyeron como controles positivos muestras de TMV y CMV. Las condiciones de electroforesis

fueron: 2:15 h a 100 voltios y temperatura de laboratorio. Los geles fueron teñidos con solución de nitrato de plata (0.011 M).

RT-PCR

El RNA total de plantas de *C. pepo* infectadas con el virus en estudio, se extrajo mediante el método del trizol (GibcoBRL, Life Technologies). Utilizando 100 mg de hojas de plantas de *C. pepo* que fueron inoculadas 5, 15 y 30 días antes de la prueba.

La Reacción en cadena de la polimerasa ligada a la transcripción inversa del RNA viral, se realizó usando los iniciadores POT1 (5'-GAC-TGG-ATC-CAT-TBT-CDA-TRC-ACC-3') (GenLab, Baton Rouge, LA 70803) y POT2 (5'-GAC-GAA-TTC-TGY-GAY-GCB-GAT-GGY-3') (GenLab, Baton Rouge, LA 70803), diseñados para la amplificación de una región específica del gen de la proteína de la cápside de los Potyvirus. El programa de RT-PCR usado fue: desnaturalización del RNA 5 min a 70°C; transcripción inversa: 5 min a 94°C; clonación del DNA: 94°C/1 min, 50°C/2 min, 72°C/3 min durante 32 ciclos; 72°C 7 min y 4°C .

La electroforesis de los productos de la RT-PCR se realizó en geles de agarosa al 0.8 y 1.5%, de 10 cm x 8 cm usando marcadores moleculares Ladder 125 Gibco y Ladder 100 Promega, respectivamente. Se incluyó como control positivo producto de RT-PCR de PVY (virus Y de la papa), Las condiciones de electroforesis fueron: 85 voltios hasta que las muestras entraran al gel y a 100 voltios durante 20 min a temperatura de laboratorio (Sambrook *et al.*, 1989).

Los sustratos y reactivos utilizados en la RT-PCR del genoma viral fueron: Buffer 10X 2.5 µl, DTT 2.5 µl, dNTP's 0.625 µl, Taq polimerasa (Perkin-Elmer) 0.5 µl, Reverso transcriptasa 0.5 µl, RNA total 3.0 µl, iniciador POT1 2.0 µl, iniciador POT2 2.0 µl y agua 11.375 µl .

PCR específica para fitoplasmas

La detección de fitoplasmas por pruebas moleculares se realizó en tres etapas: la extracción del ADN total del tejido enfermo de planta de chayote, la replicación de alguna parte específica general del ADN de los fitoplasmas y la electroforesis del producto de la PCR. La extracción del DNA total se realizó mediante el método del DNA-zol (GibcoBRL, Life Technologies). Una vez obtenido el DNA total, mediante la PCR se procedió a la clonación de una región de 1800 Pb, correspondiente al gen 16Sr y la región intergénica del fitoplasma del ALC, usando los iniciadores P1/P7 y la electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5%. Las condiciones de la electroforesis fueron: 85 voltios hasta que las muestras entraran al gel y a 100 voltios durante 20 min a temperatura de laboratorio (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR específica para geminivirus

Utilizando el método propuesto por Dellaporta *et al.* (1983), se extrajo el DNA total de muestras de chayote con síntomas de mosaico y de las plantas inoculadas por transmisión mecánica y se realizó la prueba de PCR para detectar la posible presencia de geminivirus. Los testigos negativos utilizados en todos los ensayos de caracterización fueron el ADN extraído de plantas sanas de chayote cultivadas en el invernadero y el testigo positivo fue el ADN

de plantas de okra infectadas con un geminivirus previamente identificado en México (De La Torre *et al.*, 2004).

La amplificación del ADN viral por PCR se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos PALv 1978 y PARc496 que amplifican un fragmento de 1.1 kb correspondiente a una parte de la proteína Rep ACI, toda la región común e intergenética y parte de la proteína de la cápside (AVI) del componente A de geminivirus pertenecientes al género *Begomovirus*. También se usaron los primers PBLv 2040 y PCRC 1 que amplifican un fragmento de 0.600 Kb localizado en una parte del gen de la proteína del movimiento (BLI) y hasta el inicio de la región común contenido en el componente B (Rojas *et al.*, 1993).

La mezcla final de reacción de la PCR (50 μ L volumen total) consistió en: 2.5 μ L l de $MgCl_2$ 50 mM, 5 μ L l de buffer de reacción 10x, 1 μ L l de mezcla de dNTPs 10 mM (cada nucleótido), 1 μ L de cada oligonucleótido 10 μ L M, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Amplitaq DNA polimerasa, Invitrogen), y 1 μ L de DNA (100 ng) de las muestras de chayote. La mezcla de reacción fue incubada en un termociclador GeneAmp PCR System 2400, iniciando con un preincubación a 95°C por 3 minutos y consumando 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 1 min, 55 °C por un min y medio y 2 min a 72 °C; además de un tiempo de extensión de 7 minutos a 72 °C. Los productos amplificados fueron analizados directamente por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 %, a 80 Volts /1 h (Rojas *et al.* 1993; Mehta *et al.*, 1994; Surzycki, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transmisión mecánica

A los 14 días de la transmisión mecánica en el primer rango de hospedante solamente se observaron manchas necroticas locales en *Gomphrena globosa* (Figura 3), el resto de las plantas no presento síntoma alguno. En la segunda inoculación mecánica, utilizando extracto de tejido enfermo de *G. globosa* en un grupo de plantas diferenciales igual al anterior en el que se incluyeron plantas de *Cucúrbita pepo* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Cucumis sativus* L., *Vicia faba* L. , *Pisum sativum* L. , solamente se observó el desarrollo de manchas necroticas locales en *Gomphrena globosa* a los 14 días y aclaramiento de nervaduras, ligero mosaico e hiponastia en hojas de *C. pepo* de siete días de edad o cuando presentaban la primera hoja verdadera totalmente desplegada, a los 5 días de la inoculación (Foto 4), acentuándose dichos síntomas con el tiempo hasta desarrollar necrosis del tejido foliar y la muerte de las plántulas en un lapso aproximado de 30 días.

De las dos especies vegetales que desarrollaron síntomas (*G. globosa* y *C. Pepo*), se seleccionó a *C. Pepo* como el hospedante más adecuado para propagar y mantener o conservar el virus relacionado con la enfermedad del chayote, ya que en esta especie se desarrollan síntomas muy evidentes, el periodo de incubación del virus es muy corto: 5 días; la especie vegetal es de muy fácil propagación, la susceptibilidad de *C. pepo* al virus en estudio es muy alta ya que se pudo desarrollar síntomas en plantas inoculadas hasta treinta

días después de la emergencia y el tejido vegetal no presenta problema alguno para usarse en la transmisión mecánica.



Foto 3.- Manchas necroticas en *G. globosa* Inoculada con *S. edule* enfermo.



Foto 4.- Aclaramiento de nervaduras, mosaico e hiponastia en *C. pepo*. Inoculada con *G. globosa* enferma

Por la respuesta de las diversas plantas indicadoras utilizadas en las pruebas de transmisión mecánica, comparadas con las respuestas de las mismas especies vegetales a los virus más comunes en cucurbitáceas (Cuadro 1), podemos decir que el virus en estudio es un virus que no ha sido reportado en infecciones naturales en plantas de dicha familia.

Cuadro 1.- Respuesta de las diversas plantas indicadoras usadas en el estudio, a los virus mas comunes en cucurbitáceas, comparadas con la respuesta presentada al virus en estudio (V E)

	V E	CMV	TEV	SqMV	ZYM V	WMV-2	PRSV- W	TRS V
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Capsicum annuum</i>	-	+	+	¿	¿	-	¿	¿
<i>Gomphrena globosa</i>	+	+	+	¿	+	+	¿	+
<i>Datura stramonium</i>	-	+	+	-	¿	+	¿	+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	¿	¿	¿	¿	+	¿	¿
<i>Nicotiana tabacum</i> v.	-	+	+	¿	¿	+	¿	+
<i>Xanthi</i>								
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	+	+	-	¿	+	¿	+
<i>Nicotiana clevelandii</i>	-	+	+	-	¿	+	¿	+
<i>Cucurbita pepo</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	+	+	-	+	+	¿	+
<i>Cucumis sativus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vicia faba</i>	-	+	¿	-	¿	+	¿	+
<i>Pisum sativum</i>	-	+	-	+	+	+	¿	+

(+) Las plantas desarrollan algún síntoma.

(-) Las plantas no desarrollan síntoma alguno.

(¿) No se dispone de información

Prueba de patogenicidad

A los 30 días después de la inoculación mecánica de plantas de chayote en invernadero, utilizando extracto de planta enferma de *C. pepo* se observó en las cuatro plantas tratadas, el mismo síntoma de aclaramiento de nervaduras de las hojas de chayote (Figuras 5 y 6) que el observado en plantas enfermas

de plantaciones comerciales en el sitio de estudio, desarrollándose posteriormente mosaico y deformación de las hojas.

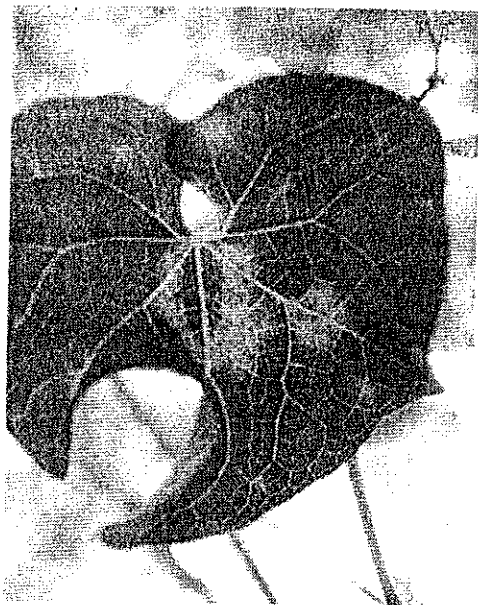


Figura 5.- Aclaramiento de nervaduras en hojas de chayote en campo

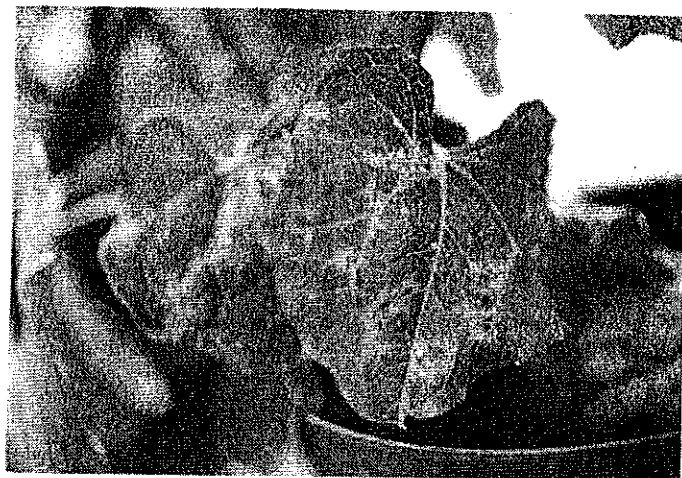


Figura 6.- Hojas de chayote en invernadero, inoculadas con savia de *C. pepo* enferma, mostrando el mismo aclaramiento de nervaduras que las plantas de chayote en campo.

Microscopia electrónica

La observación de preparaciones de extracto de planta de *C. pepo* enferma en tinción negativa, en el microscopio electrónico mostró la presencia de partículas virales en forma de varilla flexible (Figuras 7 y 8) de aproximadamente 650 nm de longitud. Que por sus dimensiones podrían corresponder a algún virus de la familia Potyviridae.

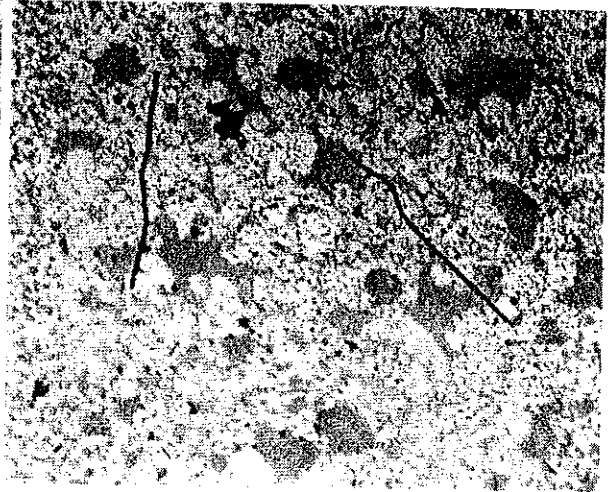
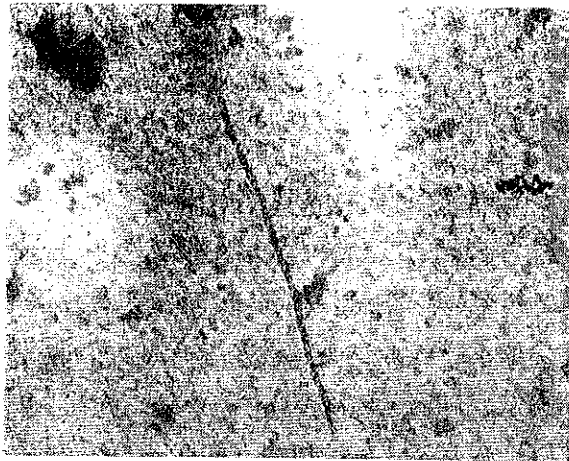


Figura 7. Partícula viral en forma de varilla flexible en el extracto de *C. pepo* enferma.

Figura 8. Partículas virales en forma de varilla flexible

Prueba serológica (DAS-ELISA)

La prueba antígeno- anticuerpo realizada con extracto de frutos de *S. edule* y plantas de *C. pepo* enferma y los anticuerpos policlonales para la detección de CMV, TEV y WMV-2 dio resultados negativos para los tres antisueros utilizados.

Extracción y análisis de RNA de doble cadena

El analisis electroforético de los productos del tratamiento tanto de plantas y frutos de *S. edule* enfermas y colectadas en campo y de plantas de *C. pepo* tanto sanas como enfermas, según el metodo descrito por Valverde (1990), nos indica que en ambas especies se pudo aislar la forma replicativa (RF o dsRNA) del genoma de un virus de RNA de cadena sencilla, como se puede observar en los carriles 2,3,4 y 5 de la Figura 9 en las que observa una banda de acumulación de RNA de aproximadamente 6×10^6 Daltons, teniendo como referencia el patron electroforetico del CMV, virus de RNAs. Asi mismo, en el

experimento, el producto de la extracción de ácido nucleico de plantas enfermas fue tratado con nucleasas, permitiendo demostrar que el genoma del virus en estudio es de RNA, como se observa en el carril 6 de la Figura 9.

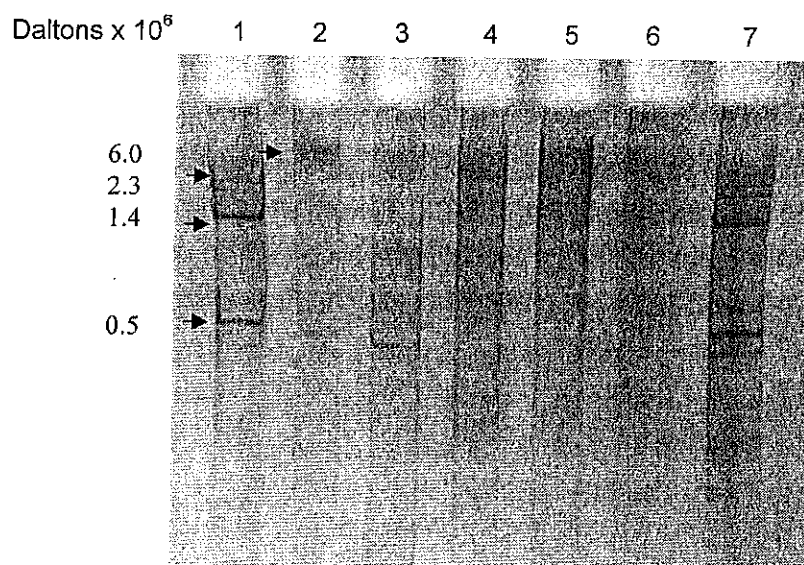


Figura 9. Electroforesis de RNAdc en poliacrilamida. Carril 1,7: CMV; Carril 2: Fruto de *S. edule* enfermo; Carril 3: hojas de *S. edule* enfermo; Carril 4: *C. pepo* enferma + DNAasa; Carril 5: *C. pepo* enferma; Carril 6: *C. pepo* enferma + RNA asa

Con esta misma prueba se descartó la posibilidad de que las plantas de *C. pepo* estuvieran infectadas previamente a la inoculación mecánica como se demuestra en la electroforesis presentada en la Figura 10, en la que se observa el patrón electroforético de tres plantas de *C. pepo* infectadas mecánicamente con extracto de chayote enfermo y de una planta de *C. pepo* sana. En el patrón electroforético de las tres plantas enfermas (carriles 3,5 y 6) se observa una banda de acumulación de RNAdc de aproximadamente 6.0×10^6 Daltons, misma que no se observa en el carril 4, correspondiente a la planta sana.

Como se puede ver, tanto en las figuras 9 y 10, la cantidad de RNA de doble cadena extraído tanto de plantas de chayote como de calabacita, fue reducido, lo cual según Valverde, puede deberse a que el virus en estudio puede ser un potyvirus o un luteovirus. Así mismo, en las mismas figuras y en los carriles correspondientes a plantas de chayote o de calabacita, se observan ligeras bandas de acumulación de dcRNA de muy bajo peso molecular lo cual según el mismo autor puede pertenecer a dcRNA celular vegetal o a RFs de RNA subgenomicos derivados del RNA viral o de origen desconocido.

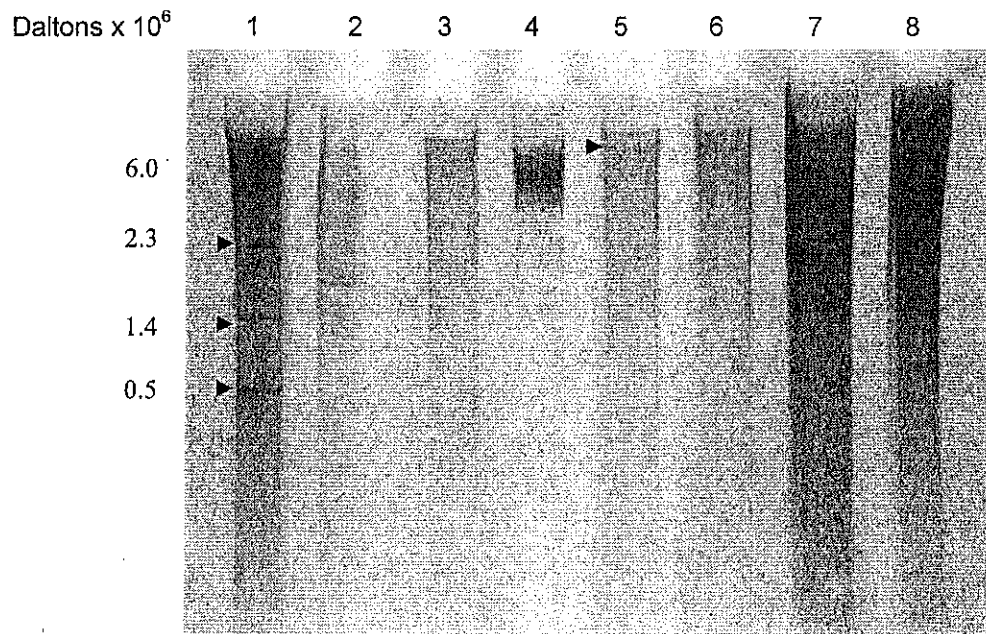


Figura 10. Electroforesis de RNAdc de plantas de *C. pepo*, en poliacrilamida: carril 1: CMV; 2: TMV; 3, 5,6: *C. pepo* enferma; 4: *C. pepo* sana; 7:TMV; 8: CMV

RT-PCR

El programa de RT-PCR empleado, utilizando iniciadores específicos para potyvirus, permitió la clonación de fracciones de aproximadamente 1000 Pb del genoma del virus de plantas de *C. pepo* de 15 días de haber sido inoculadas, como se observa en las Figuras 11 y 12.

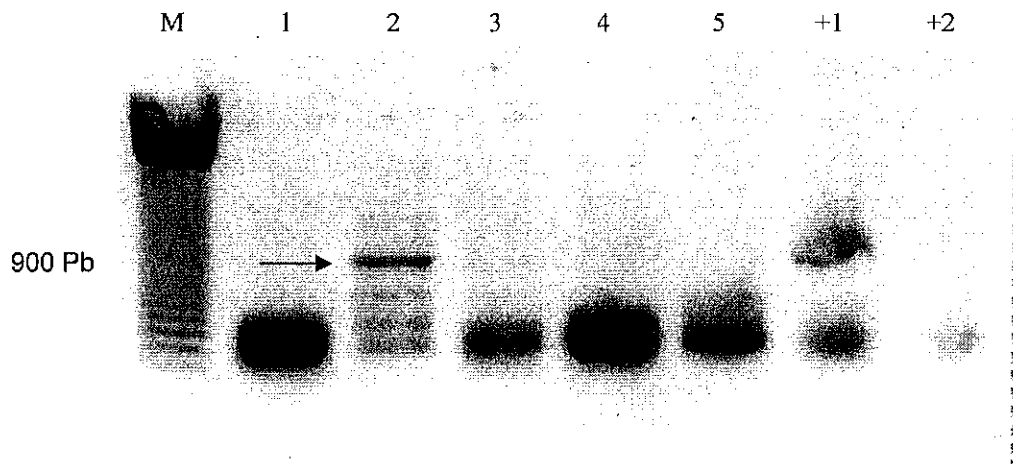


Figura 11. Electroforesis en agarosa al 0.8% de los productos de la RT-PCR. carril **M**= marcador Ladder 123 Gibco, Carril **1**= *C. pepo* 5 días, Carril **2**= *C. pepo* 15 días, **+1**=PVY.

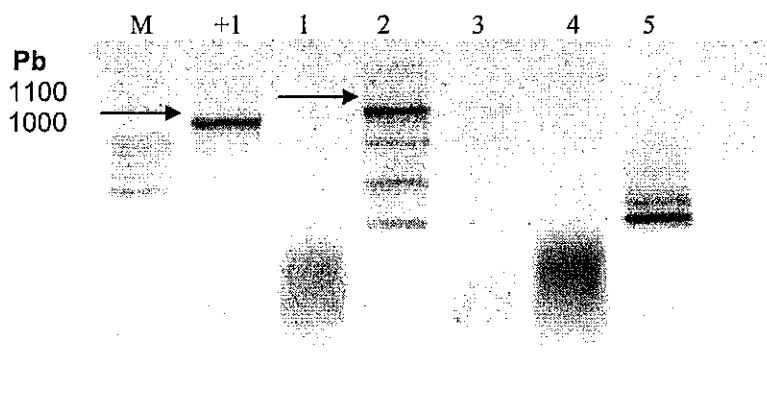


Figura 12. Electroforesis en agarosa al 1.5% de los productos de la RT-PCR. carril **M**= Marcador molecular Ladder 100 Promega, Carril **(+1)**= PVY; Carril **1**= *C. pepo* 5 días; Carril **2**= *C. pepo* 15 días,

Comparando los patrones electroforéticos de las figuras 11 y 12 se puede observar que en el primer caso existe una banda de acumulación de producto de la rt-PCR de 900 Pb y en la segunda, se observa una banda de aproximadamente 1100 Pb, lo cual sugiere la probabilidad de la presencia de mas de un virus del mismo grupo, es decir, de los potyvirus, lo cual es posible dado que los primers utilizados pueden amplificar la región específica del gen de la proteína de la cápside de los Potyvirus, que fluctúa entre los 800 y los 1100 Pb, dependiendo del grupo de virus de esa familia al que pertenezca el virus en estudio. Por otro lado, los resultados de las diversas pruebas de rt-PCR realizadas nos permiten afirmar que es mas factible lograr la clonación esperada utilizando plantas de *C. pepo* que hayan sido inoculadas 15 días antes de la prueba y que el material vegetativo necesario para la extracción de ARN debe de ser colectado en el momento mismo de la realización de la prueba.

PCR para determinar fitoplasmas

La electroforesis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa con el DNA total extraídos tanto de plantas de chayote como de zuchinni, muestra que no hubo clonación alguna, para ambas especies vegetales, de la región del ADN de los fitoplasmas que se debería clonar si algún patógeno de este grupo estuviera presente, mismo que si se obtuvo con el ADN del testigo positivo, es decir del fitoplasma del ALC.

PCR específica para geminivirus

De igual manera, en la reacción en cadena de la polimerasa con el DNA total extraídos tanto de plantas de chayote como de zuchhinni, para detectar la

presencia de algún virus de ADN, el resultado fue negativo. La prueba se consideró válida ya que en la electroforesis de los productos de la PRC si se observó el resultado de la clonación de la fracción de ADN esperada, en el ADN del testigo.

CONCLUSIONES

Los síntomas de los frutos blancos del chayote son causados por cuando menos un virus mecánicamente transmisible solo a plantas de *G. globosa*, en donde causó lesiones locales necróticas y a plantas de *C. pepo* causando mosaico y deformación severa de hojas en cinco días después de la inoculación. El virus fue muy virulento y capaz de infectar plantas de *C. pepo* en cualquier etapa de crecimiento y provocar la muerte de la misma en tres a cuatro semanas después de la inoculación. Las pruebas de patogenicidad realizadas con el virus separado de plantas de chayote cultivado en campo e inoculado en *G. globosa*, de ésta a *C. pepo* y finalmente de *C. pepo* a *S. edule*, causó síntomas similares a los observados en plantas de chayote en campo, lo que permite afirmar que el agente causal de la enfermedad del fruto blanco es un virus. rechazando las hipótesis de que la enfermedad podría ser causada por un fitoplasma, ya que dichos patógenos no se transmiten mecánicamente y de que el síndrome podría ser de origen genético. Así mismo, la prueba de PCR para fitoplasmas confirma que los síntomas del fruto blanco no están relacionados con la presencia de organismos parecidos a fitoplasmas. El resultado negativo de la prueba de PCR para geminivirus descarta la posibilidad de que algún virus de ADN esté relacionado con esta enfermedad. La prueba de RNA de doble cadena confirmó que dicho virus pertenece a los virus de RNA de cadena sencilla, con forma de varilla flexible de aproximadamente 700 nm de longitud según los resultados obtenidos en la observaciones realizadas en el microscopio electrónico. Los resultados de la prueba de DAS-ELISA descartan la posibilidad de que el virus asociado con la

enfermedad del fruto blanco esté relacionado serológicamente con CMV, TEV o WMV-2. Los ensayos de RT-PCR confirmaron que dicho virus pertenece al grupo de los potyvirus, que por sus características permiten suponer que se trata de un virus no descrito en México y que tentativamente podría definirse como "Virus de los frutos blancos del Chayote" (ChWFFV).

LITERATURA CITADA

- Aguilar R. R. y Lozoya S.H. 1994. Virosis de cucurbitáceas en el Estado de Morelos. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 12, Num. 1, 1994
- Alvizo Villasana, H. y Lozoya S. H. 1987. Temas de virología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. CONACYT.
- Bernal, J.J., Jimenez, I., Moreno, M., Hord, M., Rivera, C., Koenig, R., and Rodriguez-Cerezo, E. 2000. Chayote mosaic virus, a new tymovirus infecting cucurbitaceae. *Phytopathology* 90: 1098-1104
- Brown, J. K. and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.
- Clark, M. F. and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Cook, O. F. 1901. The chayote: a tropical vegetable. U. S. Dept. Agric. Division of Botany. Bull. No. 28:1-31
- Dallwitz, Paine and Zurcher (1993). Known susceptibilities of Cucurbitaceae. *In*: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Dellaporta, S. L., J. Woods and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Dijkstra, J., and P.C. De Jager. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and

- exercises. Edit. Springer, Berlin. 459 pp.
- Kurstak, E. 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp 935
- Hitchborn, J.H. and Hills J. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. Virology 27:528- 540.
- Hord, M., Villalobos, W., Macaya-Lizano, A. Y Rivera C. 1997. Chayote mosaic, a new disease in *Sechium edule*, caused by a tymovirus. Plant Dis. 81:374-378.
- May, B.W. 1985. Virology. A practical approach. Edit: Oxford University Press. NY. pp 5-7
- Mehta, P., J. A. Wyman, M. K. Nakhla and D. P. Maxwell. 1994. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* with 2 tomato infecting geminiviruses. Journal of Economic Entomology 87: 1285-1290.
- Montano, H.G., Davis, R.E., Dally, E.L., Pimentel, J.P., and Brioso, P.S. 2000. Identification and phylogenetic análisis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. Plant Dis. 84:429-436
- Newstrom, L.E. 1985. Evidence for the origin of chayote *Sechium edule* (cucurbitaceae). Economic Botany 45:3 410-428.
- Rojas, M. R., R. L. Gilberston, D. R. Russell and D. P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the Polymerase Chain Reaction to detect whitefly-transmitted Geminiviruses. Plant Disease 77: 340-347.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Surzycki, S. 1999. Basic techniques in molecular biology. Springer-Verlag Berlin. pp 233-262.
- Silva V.S., y Delgadillo S.F. 1990. Virosis de la calabacita (*Cucurbita pepo* L.) en el noreste de Sinaloa. Revista Mexicana de Fitopatología 8:1,1990.
- Silveira, W. G. Jr., Avila, A. C. Y Muñoz, J. O. 1985. Chayote (*Sechium edule*) a new host of tomato spotted wilt virus. Fitopatología brasileira 10 : 661-665.
- Valverde, R. A., T. S. Nameth, and L. R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Diseases 74: 255-258.
- Walkey, D.G. A. 1986. Applied Plant Virology. Edit: John Wiley & Sons. New York. pp 329
- Yuki, V. A., Resende,J., Kitajima, E.,Barroso, P.,Kuniyuki, H.,Groppo, G. y pavan, M. 1999. Ocurrente, ditribution and relative incidence of five virus infecting cucurbits in the State of Sao Paulo, Brazil. Plant Dis. 84:516-520