

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA

MAESTRIA EN PROTECCION VEGETAL

✓ **CARACTERIZACION Y DETECCION POR LA REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL VIRUS ASOCIADO AL
AMARILLAMIENTO DE LA OKRA (*Abelmoschus esculentus*
Moench.) EN IGUALA, GUERRERO.**

T E S I S

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

JOAQUIN BERNARDO DIAZ RIVERA

CHAPINGO, EDO. MEXICO.

NOVIEMBRE 1999.



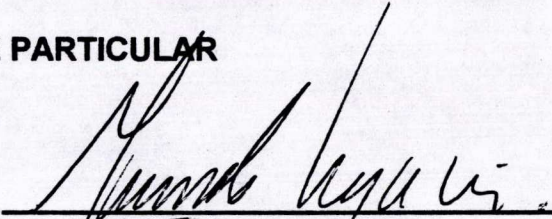
908771
BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.

LA PRESENTE TESIS TITULADA CARACTERIZACION Y DETECCION POR LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL VIRUS ASOCIADO AL AMARILLAMIENTO DE LA OKRA (*Abelmoschus esculentus* Moench.) EN IGUALA, GUERRERO. FUE REALIZADA POR JOAQUIN BERNARDO DIAZ RIVERA, BAJO LA DIRECCION DEL CONSEJO PARTICULAR INDICADO, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

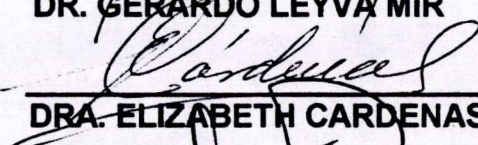
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL.

COMITE PARTICULAR

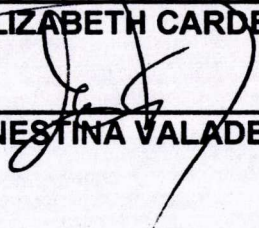
DIRECTOR:


DR. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


DRA. ELIZABETH CARDENAS SORIANO

ASESOR:


MC. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

34953

CHAPINGO, EDO. DE MEXICO. NOVIEMBRE DE 1999.

EL JURADO QUE REVISÓ ESTA TESIS Y APROBO EL EXAMEN DE GRADO DE **JOAQUÍN BERNARDO DÍAZ RIVERA**, AUTOR DE LA PRESENTE TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL ESTUBO CONSTITUIDO POR:

PRESIDENTE:


DR. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


DRA. ELIZABETH CARDENAS SORIANO

ASESOR:


M.C. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por todas las facilidades brindadas para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Dr Hector Feliz Alvizo Villazana por inculcarme el interés en el estudio de los virus fitopatógenos.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por la dirección de esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por todas las facilidades para trabajar en su laboratorio y su acertada asesoría durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Ernestina Valadéz Moctezuma por su valiosa colaboración para la realización de la parte de biología molecular de esta tesis.

A todos mis maestros de la maestría especialmente a los Doctores Sebastian Romero Cova, Guillermo Mondragon, Nahúm Marbán Mendoza y Victor Manuel Pinto.

A mi familia por su apoyo incondicional para que me pueda seguir superando.

A Virginia Azúa Carbajal por toda la comprensión y apoyo que me brindado desde que nos conocemos.

A todos mis compañeros de generación por su desinteresado apoyo en mi tiempo de estudiante.

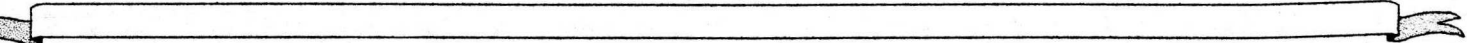
A Mario Natanael Díaz Arévalo por su comprensión durante mi larga etapa de estudiante.

Para la realización de metas importantes, siempre es necesario la colaboración de otras personas; esta tesis no hubiera sido posible sin la intervención de muchas personas, a las cuales no me gustaría pasar por alto, puesto que les estoy profundamente agradecido.

Así :

Mi más sincero agradecimiento a:

Virginia Azúa, Guadalupe Valdovinos, Ricardo, María Elisa, Sergio Ayvar, Alejandro Michel, Juan Pereyda, Alberto Quintero, Noel Reyes, Jorge Aguilar, Laura Delia Ortega, Cesáreo Rodríguez, Pablo Díaz Rivera, Anselmo Venegas, Rosalinda Flores Camacho, Vladimir, Alfonso Lucas, Antonio Segura, Gerardo Leyva Mir, Alvizo Villazana, Alejandro Gali, Angel Rebollar, Alejandra Elizalde, Martín Ramos y Ulises Gracia.



DEDICATORIA

A mi padre Pablo Díaz Aroztegui ♪ por su forma de vivir la vida, con arrojo hasta los últimos momentos.

Al maestro Benito Pinto Cortés ♪ por permitirme ser uno de los últimos alumnos que asesoró, durante sus últimos días de existencia.

INDICE	Pag.
DATOS BIOGRAFICOS	i
LISTA DE CUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ANEXOS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
I. INTRODUCCION	1
OBJETIVOS GENERALES	2
HIPOTESIS	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	5
2.1 Plagas y enfermedades de la okra	5
2.1.1 Plagas	5
2.1.2 Enfermedades	5
2.2 Virus que afectan a la okra	7
2.2.1 Geminivirus que afectan a la okra	7
2.2.1.1 Virus mosaico de las venas amarillas de la okra (BYVMV)	7
2.2.1.1.1 Rango de hospedantes	8
2.2.1.1.2 Transmisión.	9
2.2.1.1.3 Taxonomía y relaciones serológicas.	9
2.2.1.1.4 Epidemiología.	9
2.2.1.2 Virus enrollamiento de la hoja de la okra (OkLCB)	10
2.2.1.2.1 Distribución Geográfica	10
2.2.1.2.2 Rango de hospedantes.	10
2.2.1.2.3 Transmisión.	11
2.2.1.2.4 Taxonomía y virus relacionados serológicamente	11
2.2.2 Virus mosaico de la okra	11
2.2.2.1 Distribución geográfica	11
2.2.2.2 Síntomas	11
2.2.2.3 Propiedades Bioquímicas.	12
2.2.2.4 Transmisión	12
2.2.2.5 Citopatología	12
2.2.2.6 Taxonomía y relaciones serológicas	12
2.3 Cambios al nivel celular ocasionado por los virus en la okra	13
2.4 Comportamiento de los vectores	16
2.5 Detección de geminivirus de la okra	17
2.6 Papel de las técnicas moleculares	18
2.6.1 Estudios específicos de la aplicación de las técnicas moleculares en fitopatógenos	18
2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa	19
2.6.2.1 Detección de virus por PCR	20
2.6.2.1.1 Detección de germinivirus	20
2.6.3 Detección de germinivirus por sondas marcadas con digoxigenina	23

2.7 Manejo de enfermedades virosas de la okra	24
2.7.1 Control químico de vectores	24
2.7.2 Variedades resistentes	25
2.7.3 Prácticas culturales	25
2.8 Experimentos de campo paralelos a la investigación	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Áreas donde se llevo acabo la investigación	28
3.1 Colecta del material enfermo y vectores	28
3.2 Estimación de la incidencia de la enfermedad	29
3.3 Material vegetal	29
3.4 Identificación de insectos vectores	30
3.4.1 Áfidos	30
3.4.2 Mosquitas blancas	30
3.5 Establecimiento y cuidado de las plantas en el invernadero	30
3.6 Ensayo de inmunoabsorbancia con enzimas conjugadas (ELISA)	31
3.7 Búsqueda de inclusiones citoplasmáticas	32
3.8 Pruebas de Transmisión	32
3.8.1 Transmisión mecánica	32
3.8.1.1 Rango de hospedantes	33
3.8.7.1.2 Aislamiento de un virus críptico	33
3.8.2 Transmisión por semilla	33
3.8.3 Transmisión por injerto	34
3.8.4 Transmisión por mosquitas blancas	34
3.9 Microscopía electrónica	35
3.9.1 Tinción negativa	35
3.9.1.1 Clarificación del virus	35
3.9.2 Obtención de cortes ultradelgados	36
3.10 Extracción de ADN de la okra	37
3.10.1 Método de PlanDNAzol	37
3.10.2 Método de Dellaporta	38
3.10.3 Cuantificación de ADN por espectrofotometría	41
3.10.4 Electroforesis	41
3.11 Identificación se secuencias específicas de la cadena viral	42
3.11.1 Estandarización de la reacción de PCR	42
3.11 .1.1 Estandarización de la concentración de ADN	42
3.11.1.2 Estandarización de la enzima	44
3.11.1.3 Estandarización de la concentración de cloruro de magnesio	45
3.11.2 Reacción en cadena de la polimerasa	45
3.11.3 Electroforesis de los productos de la PCR	46
3.12 Experimentos de campo	46
IV. RESULTADOS	47
4.1 Colecta en campo	47
4.2 Síntomas de campo	47
4.3 Evaluación de la incidencia de la enfermedad en campo	47

4.4 Pruebas de ELISA	49
4.5 Pruebas de transmisión	50
4.5.1 Transmisión mecánica	50
4.5.1.1. Aislamiento de un virus críptico	50
4.5.2 Transmisión por semilla	52
4.5.3 Transmisión por injerto	52
4.5.4 Prueba de transmisión por vectores	52
4.5.4.1 Prueba de transmisión por mosquitas blancas	52
4.5.4.1.1 Identificación de mosquitas blancas	53
4.5.4.2 Pruebas de transmisión por áfidos	53
4.5.4.2.1 Identificación de áfidos	53
4.5.2.1. Aislamiento de un virus transmitido por áfidos	56
4.6 Inclusiones vírales	56
4.7 Microscopía electrónica	58
4.7.1 Tinción negativa	58
4.8 Extracción de ADN de okra	58
4.8.1 Concentración de ADN	58
4.8.2 Pureza del ADN	59
4.8.3 Calidad	59
4.9 Extracción definitiva de ADN	59
4.10 Estandarización de la PCR	61
4.10.1 Estandarización de la concentración de ADN	61
4.10.2 Estandarización de la enzima ADN Taq polimerasa	62
4.10.3 Estandarización de cloruro de magnesio	63
4.11 Prueba de PCR definitiva	64
4.12 Observaciones de campo	66
V. DISCUSION	67
5.1 Síntomas	67
5.2 Evaluación de la incidencia de la enfermedad en campo	67
5.3 Incidencia de la maleza en el campo	68
5.4 Pruebas de ELISA	69
5.5 Pruebas de transmisión	69
5.5.1 Transmisión mecánica	69
5.5.2 Transmisión por semilla	69
5.5.3 Transmisión por injerto	70
5.5.4. Aislamiento de un virus críptico	70
5.6 Identificación de vectores	71
5.6.1 Identificación de mosquita blanca	71
5.6.2 Identificación de áfidos	71
5.7 Pruebas de transmisión por vectores	72
5.7.1 Mosquitas blancas	72
5.7.2 Pruebas de transmisión por áfidos	73
5.8 Inclusiones vírales.	73
5.8 Gama de hospedantes con un virus transmitido por los áfidos.	74
5.9 Microscopía electrónica	75

5.9.1 Técnica de cortes ultradelgados	75
5.9.2 Tinción negativa	75
5.10 Extracción de ADN de la okra.	75
5.11 Estandarización de la PCR	75
5.12 Prueba definitiva de PCR	76
VI. CONCLUSIONES	77
VII RECOMENDACIONES	78
VIII. BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	85

DATOS BIOGRÁFICOS

Joaquín Bernardo Díaz Rivera nació en Xalapa, Veracruz el 16 de abril de 1972. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo del año de 1987 a 1994. Durante su desempeño profesional se ha enfocado a actividades de consultoría en despachos privados. En 1997 ingresa en el programa de la maestría en Protección Vegetal para concluir en 1999. Actualmente labora en la Dirección General de Sanidad Vegetal en el Departamento de Análisis de Riesgo y se desempeña como consultor técnico.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Datos seleccionados de transmisión de algunos virus fitopatógenos transmitidos por mosquitos blancos

Cuadro 2. Tratamientos y dosis aplicadas del experimento número 1 en Iguala Gro, 1998

Cuadro 3. Concentraciones de alcohol con el tiempo de lavado

Cuadro 4. Preparación de mezcla de reacción para estandarizar la concentración de ADN

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la estandarización de la enzima ADN Taq Polimerasa

Cuadro 6. Mezcla de reacción para estandarizar el cloruro de magnesio

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la prueba de PCR definitiva

Cuadro 8. Incidencia de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra en Iguala, Gro

Cuadro 9. Especies inoculadas con el virus que ocasiona mosaicos amarillos en okra

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de transmisión del virus que induce síntomas de amarillamiento en la okra

Cuadro 11. Especies susceptibles por inoculación mecánica a partir del virus transmitido por áfidos aislado en *Nicotiana occidentalis*

Cuadro 12. Concentraciones de ADN obtenidas por el método de PlanDNAzol y de Dellaporta para plantas sanas y enfermas de okra

Cuadro 13. Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280}

Cuadro 14. Características generales de los virus que afectan a la okra con relación al virus en estudio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que representa las formas replicativas de los ADN A y ADN B, de un típico geminivirus bipartita.

Figura 2. Síntomas de mosaico amarillo en hojas de okra.

Figura 3. Síntomas de mosaico clorótico en frutos de okra (C y E)

Figura 4. Esquema de transmisión mecánica para el aislamiento de un virus asintomático.

Figura 5. Micrografía a 10X de pupas de *Trialeurodes vaporariorum*, mostrando, papilas submarginales evidentes (1), setas caudales (2) y orificio vasiforme (3).

Figura 6. Micrografía a 40X de pupas de *Trialeurodes vaporariorum* mostrando papilas submarginales evidentes (1), seta caudal (2) y orificio basiforme (3).

Figura 7. Esquema de transmisión por vectores.

Figura 8. Micrografía a 100 X de inclusiones vírales amorfas en células epidérmicas de okra.

Figura 9. Micrografía a 100 X de inclusiones amorfas en células epidérmicas de okra.

Figura 10. Gel de electroforesis de los fragmentos amplificados por la PCR para estandarizar la concentración de ADN proveniente de una planta de okra enferma.

Figura 11. Gel de electroforesis para la estandarización la cantidad óptima de enzima taq polimerasa

Figura 12. Gel de electroforesis para la estandarización de la cantidad óptima de cloruro de magnesio.

Figura 13. Productos de la PCR.

Figura 14. Experimento de campo para el evaluación de la incidencia de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra Iguala Gro. 1999.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Superficie sembrada y cosechada, producción, rendimiento, precio medio rural, y valor de la producción del cultivo de la okra (Angu o Gombo), por estados y total nacional para el año 1997.

Anexo 2, Figura 1. Distribución de la temperatura y precipitación en Iguala Gro.

Anexo 2. Datos climáticos del municipio de Iguala Gro.

Anexo 3. Lecturas de las muestras obtenidas en la prueba de ELISA.

Anexo 4. Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280} obtenidos por el método de PlanDNAzol

Anexo 5. Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280} obtenidos por el método de Dellaporta (minipreparación).

Anexo 6. Cálculos realizados para hacer un gel de exploración para observar la calidad del ADN obtenido por el método Dellaporta.

Anexo 7. Concentración de ADN y Relación R_{260}/R_{280} de las muestras definitivas utilizadas para PCR.

ABREVIATURAS

Kb	Kilobase
ADN	Ácido dexoxirribonucleico
ng	nanogramos
PCR	Reacción encadena de la polimerasa
μ M	micromolar
ton	Toneladas
ha	Hectárea
°C	Grado centígrado
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milimetro
h	hora
μ L	microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
g	gravedades
mM	milimolar
nm	nanómetros
U	Unidad de enzima
mg	Miligramo
r	correlación
pb	Pares de bases
MPM	Marcador de peso molecular

RESUMEN

Un virus afectando okra, en Iquala, Gro, fue transmitido por mosquitas blancas *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y por injerto a plantas de okra, no se transmitió mecánicamente tampoco por semilla. Con el microscopio electrónico aplicando la técnica de tinción negativa y microcortes no fue posible observar la partícula viral. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y uso de iniciadores degenerados para geminivirus, se estandarizaron las concentraciones de ADN genómico de la okra, la cantidad de enzima y de cloruro de magnesio, resultando que la amplificación se realiza desde 20, 40, 60, 80, y 100 ng de ADN, con 1 y 1.5 unidades de enzima taq polimerasa, y con 0.2 μ M de cloruro de magnesio; fue posible sintetizar y detectar un fragmento amplificados de ADN propio del virus de un peso molecular de 1.1 Kb. Se corrieron muestras de los fragmentos amplificados por PCR siguientes: ADN de okra con síntomas de virus, ADN de okra sana, ADN como testigo negativo y ADN de jitomate con síntomas de geminivirus como testigo positivo, se observó la presencia de la banda de 1.1 kb en las muestras de okra enferma y jitomate. Con lo anterior se logró demostrar que el virus del amarillamiento de la okra pertenece al grupo de los geminivirus.

Por otra parte fue posible la transmisión mecánica de otro virus que ocurre en asociación con el geminivirus que induce los síntomas de mosaicos amarillos, el virus induce inclusiones vírales de tipo amorfas próximas al núcleo, semejantes a las que inducen los virus del grupo de los potyvirus, se transmite por *Myzus persicae* y de manera mecánica a plantas diferenciales de *Nicotiana rustica* y *Capsicum annum*. Con lo anterior se demostró que la enfermedad del amarillamiento de la okra es ocasionada por un geminivirus y que puede estar asociado con otro virus posiblemente del grupo de los potyvirus.

Palabras clave: Geminivirus, okra, PCR, *Abelmoschus esculentus*.

SUMMARY

A virus affecting okra *Abelmoschus esculentus* (Moench) from Guerrero, México, have been transmitted for white fly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) and for grafting to okra plants, did not transmitted for seeds and mechanical inoculation. With microscopy electron analysis particles like-virus not were found. The polymerase chain reaction (PCR) used primers degenerate for geminivirus, to make the standing of concentrations the DNA genomic of the okra, for enzyme units, and magnesium chloride. To obtain the amplification from 20, 40, 60, 80 y 100 ng of DNA genomic, with 1 and 1.5 enzyme unit taq polymerase, whit 0.2 μ M of magnesium chloride. The PCR-amplified DNA fragments there were the 1.1 kb weight molecular. The healthy plant DNA of okra tested whit other plants diseased of okra and tomato *Lycopersicon esculentum*, and DNA corn *Zea mays* result in the electrophoretic pattern with presence of one band in okra and tomato diseased. Was demonstrated than the okra yellowish virus to belong is geminiviridae group. Was did detecting other virus associating at geminivirus, this virus induced the formation of amorphous cytoplasmatic body inclusions into epidermis cell like to produce the potyvirus is transmitted for *Myzus persicae* and mechanical inoculation at *Nicotiana rustica* y *Capsicum annuum* plant.

Keyword: Okra, geminivirus, characterization, PCR.

I. INTRODUCCIÓN

La Okra *Abelmoschus esculentus* (L) Moench, es una hortaliza de interés comercial destinada principalmente a la exportación, la cual tiene mucha importancia para nuestro país, ya que en el año 1997 un total de 4,560 has se sembraron a nivel nacional, de las cuales 785 fueron de riego y 3,775 de temporal, con esta superficie se obtuvieron 29,329 toneladas de producción, que generaron un valor de la producción \$ 70, 415, 501.00.

Los estados donde se cultivaba okra en la República Mexicana, son: Guerrero, Tamaulipas, Morelos, Michoacán y Yucatán con 261, 3,970, 252, 35 y 40 hectáreas sembradas respectivamente (SAGAR, 1997).

En el estado de Guerrero se estimó una superficie sembrada para el año 1997 de 261 has, siendo, 247 de riego y 14 de temporal, la superficie cosechada no tuvo diferencia con respecto a la superficie sembrada, y se obtuvo una producción de 1,482 y 98 ton para riego y temporal respectivamente, consecuencia de un rendimiento de 6.0 ton/ha en promedio, con lo cual se generó un valor de la producción de \$ 4 872 524.00 (SAGAR, 1997).

Los principales países consumidores de este producto son E.U.A., Canadá y Japón, por esta razón genera divisas a nuestro país, adicionalmente, constituye una importante fuente de empleo, consecuencia de la cantidad de mano de obra que se requiere, sobre todo en el período de la cosecha, con lo que contribuye al arraigo de la población en el lugar donde se produce (Pereyda *et al.*, 1998).

Las vainas o frutos se utilizan principalmente para la elaboración de alimentos, como son sopas, ensaladas y varias preparaciones culinarias, pero también

existe una fuerte agroindustria dedicada a la elaboración de salmueras, (Sánchez, 1985).

Una de las cualidades de la okra es su alto valor nutritivo, expresado en su alto contenido de vitaminas, minerales, así como de proteínas y un bajo aporte en calorías, características deseables para los mercados externos. Con relación a las vitaminas se ha reportado a la A, C, y E; en cuanto a los minerales contienen al Calcio, Hierro y Fósforo. También las semillas presentan un elevado contenido de aceites y proteína (Sánchez, 1985).

Realmente por la magnitud de las estadísticas se podría pensar que es un cultivo de relativa escasa importancia económica, no obstante los problemas fitosanitarios que se presentan en esta especie constituyen un tema primordial, sobre todo, por la reducida investigación nacional e internacional que se ha generado en torno a la okra y en particular con sus problemas de plagas y enfermedades. Por esto nos abocaremos a la revisión de estos temas, haciendo énfasis en las enfermedades de tipo viral.

Como la mayoría de los cultivos, la okra es afectada por problemas fitosanitarios, destacando los organismos pertenecientes al grupo de los hongos, los insectos y los virus principalmente, dentro de estos últimos, se sabe que a nivel mundial, se han reportado varios que afectan al cultivo de okra, causando pérdidas en rendimiento muy severas y en ocasiones totales, algunos de los virus reportados son: okra mosaic tymovirus, okra leaf-curl bigeminivirus y virus mosaico amarillo de las venas de la okra (Pereyda *et al.* 1998; Brunt *et al.* 1996).

En la región de Iguala, Guerrero se presenta una enfermedad que ocasiona mosaicos de color amarillo en las hojas de la okra y un moteado clorótico en los frutos por lo que ocasiona pérdidas severas en el rendimiento y calidad del producto, ya que llega a matar a la planta, pero principalmente ocasiona un manchado del fruto, provocando perdidas de hasta el 70 % en el momento del empaque del producto, de esta enfermedad se desconoce totalmente el agente

causal, únicamente se sospecha que pueda estar involucrado algún virus. Ayvar y Michel (1998). Así, con este primer acercamiento, se pretende determinar el agente causal de la enfermedad, los mecanismos de transmisión y otras características que pueden dar algunas evidencias sobre la etiología de esta enfermedad, que permita definir medidas de control más apropiadas por lo que en este trabajo se consideraron los objetivos siguientes.

OBJETIVOS GENERALES

1. Identificar y caracterizar biológicamente el agente causal de la enfermedad del mosaico amarillo de la hoja de la okra.
2. Aplicar la técnica de PCR, con fines de diagnóstico de virus fitopatógenos y en particular para identificar al agente causal del amarillamiento de la hoja de la okra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar biológicamente al virus o virus asociados al amarillamiento de la hoja de la okra.
- Utilizar la microscopía de luz y electrónica con la finalidad de observar algún tipo de partícula semejante a virus, así como los efectos histopatológicos de la enfermedad.
- Demostrar las formas de transmisión así como los vectores de la enfermedad del amarillamiento de hoja de la okra.
- Aplicar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con la finalidad de desarrollar una metodología rápida y precisa para detección de virus semejantes a geminivirus.

HIPOTESIS

- Dados los síntomas de la enfermedad que presenta la okra se sospecha que esta podría ser ocasionada por un virus o un complejo perteneciente al grupo de los geminivirus.
- Las enfermedades virales en plantas requieren para su transmisión, en muchos casos, de la presencia de un organismo vector, en la transmisión de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra podrían estar involucrados insectos vectores como mosquitas blancas, áfidos o coleópteros.
- El juego de iniciadores PAL1c1978 y PAR1-c496 permiten sintetizar por PCR un segmento de ADN de tamaño determinado (1.1 ó 1.4 kb) característico del grupo de los geminivirus.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Plagas y enfermedades de la okra.

La okra presenta una serie de problemas fitosanitarios desde etapas muy tempranas de su desarrollo, dichas plagas son semejantes a las del algodón, ya que las dos plantas pertenecen a la misma familia (malvaceae) (Jaramillo, 1993).

2.1.1 Plagas

Dentro de las plagas se encuentran a los trozadores, que son larvas de diferentes géneros (*Agrotis spp.* ó *Spodoptera spp.*) que durante la noche cortan las plantas pequeñas al ras del suelo. Otras especies que se reportan son los grillos del género *Grillus* o *Guillotalpa*; las hormigas, áfidos, diabroticas, el "lorito verde" *Empoasca spp.* Otras plagas afectan directamente al fruto como son: larvas de los géneros *Spodoptera* y *Heliothis*, así como chinches del fruto (*Leptoglossus spp.*) (Jaramillo, 1993).

Por su parte Pereyda *et al.*, (1998) indica que las plagas más importantes en la región de Iguala Gro. son: grillos, insectos defoliadores y trozadores, trips, pulgones, mosquitas blancas, minadores, perforadores de fruto y pedúnculo entre otras.

2.1.2 Enfermedades.

Jaramillo, (1993) reporta como enfermedades para la okra las siguientes:

Virosis.- De acuerdo a este autor la virosis es la principal enfermedad de la okra y es producida por varios tipos de virus (dos o tres). Las plantas obtenidas de semillas enfermas parecen ser más susceptibles a la enfermedad. Cuando la planta es atacada por virosis, las hojas, ramas y tallos detienen su crecimiento y se deforman completamente.

Otro grupo de enfermedades citadas por Jaramillo, (1993) corresponde a *Cercospora sp* la cual forma manchas de color café redondeadas, la enfermedad concentra su ataque generalmente en las hojas más viejas y no constituye una limitante para el cultivo.

Asimismo enfermedad de la mancha vellosa producida por el hongo *Chaenephora sp*, se presenta en las hojas y flores como una vellosidad de aspecto aterciopelado, su presencia se ve favorecida por la humedad en el cultivo.

Existe una enfermedad denominada mancha de *Alternaria*, este hongo ataca tanto a las hojas como al fruto, en las hojas produce manchas irregulares con bordes oscuros redondeados de un halo o borde claro; el centro de la mancha se necrosa y se cae, cuando ataca a los frutos estos mueren (Jaramillo, 1993).

Por su parte Romero, (1994) reporta como una enfermedad de importancia a la mancha foliar de la okra ocasionada por el género *Phyllosticta hibiscina*, otra especie de importancia es *Choanephora infundibulifera* la cual se reporta que ataca flores de okra en la India e Islas Occidentales y Sudamérica. Asimismo tambien se han encontrado sobre flores marchitas de okra a *Choanephora cucurbitarum*.

Para Pereyda, (1999) refiere como las enfermedades más frecuentes, para la etapa inicial de desarrollo se reporta a la secadera ocasionada por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, en plantas de mayor edad se ha reportado el daño por nematodos agalladores del género *Meloidogyne* que a su vez va asociado al ataque de *Fusarium*, otras enfermedades son la cenicilla *Oidium sp*; manchas foliares causadas por *Cercospora sp* y *Phyllosticta sp*; manchado del pedúnculo causada por *Ascochyta*; pudrición de las hojas, flores y frutos por *Chaenephora infundibulata*; así como la sarna del fruto de etiología no determinada. No obstante la principal limitante que enfrenta el cultivo en la actualidad es el amarillamiento de la hoja y del fruto, que se observa desde las primeras etapas fenológicas de la planta y que dependiendo de la estación del año y del manejo sanitario, las perdidas pueden alcanzar o superar el 50 % a 60 % de la cosecha.

2.2 Virus que afectan la okra.

La okra es afectada por virus, actualmente se reportan a nivel internacional tres, dos de los cuales pertenecen al grupo de los Geminivirus, uno a los Tymovirus (Brunt *et al.*, 1996); Fami, 1976). Dada la importancia de estos virus dentro de nuestro problema de estudio, a continuación se describen sus características principales.

2.2.1 Geminivirus que afectan a la okra.

De acuerdo a Torres *et al.*, (1996) los geminivirus son un grupo de virus fitopatógenos que tienen una molécula de ADN de cadena simple, con partículas isométricas. Xiong (1999), indica que los geminivirus tienen viriones no envueltos, el nucleocapside es geminado de 18-20 nm de diámetro, 30 nm de longitud, simetría icosaédrica, 22 capsómeros por nucleótidos. Los viriones contienen una molécula (bipartita) de uno o dos segmentos, el segundo segmento de ADN "ADN B", es similar al ADN A, que se llega a encontrar en algunas especies. La cadena de ADN es cerrada circular y simple. La longitud total del genoma es de 2500-3000 y de 4800-5600 nucleótidos en moléculas de uno y dos segmentos respectivamente. Una característica muy importante de los virus del tipo geminivirus es que estos no se transmiten mecánicamente, sin embargo Honda *et al.*, (1983) reporta la utilización de dos amortiguadores, uno de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.8 y otro de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.8 con los cuales logró transmitir mecánicamente, al mung bean yellow mosaic virus en Tailandia, geminivirus transmitido por mosquitas blancas.

Dentro de este grupo se encuentran, el virus mosaico de las venas amarillas de la okra y el acortamiento de la hoja de la okra (okra leaf-curl geminivirus) (Brunt *et al.*, 1996).

2.2.1.1 Virus mosaico de las venas amarillas de la okra (BYVMV).

Sin lugar a dudas, uno de los virus de la okra más estudiados en la actualidad corresponde al virus mosaico de las amarillas (BYVMV), en este sentido Torres *et al.*, (1996) relaciona a los geminivirus por pertenecer al grupo III de los geminivirus que son transmitidos por mosquitas blancas y atacan a plantas

dicotiledoneas; por tal razón se ha decidido incluir en esta revisión todos los reportes científicos disponibles, con la finalidad de que puedan servir como un punto de referencia que nos ayude a comprender a las enfermedades viróticas causadas por geminivirus y que son transmitidas por mosquitas blancas. Anju *et al.*, (1993) caracterizan al agente causal de la enfermedad mosaico de las venas amarillas de la okra, el cual es un geminivirus con una partícula de 18 x 30 nanómetros de tamaño.

Singh, (1990) a partir de okra infectada con el virus mosaico de las venas amarillas descubrió la presencia de una pequeña, esférica geminada partícula semejante a virus en forma de agregado al buscar en el floema. En material infectado con el virus enation leaf-curl se observó una partícula baciliforme semejante a virus, siendo observada con los elementos de detección. Este es el primer reporte de la asociación de una partícula baciliforme semejante a virus asociada a la transmisión por mosquitas blancas. Brunt *et al.*, (1996) describen de manera general al BYVMV indicando lo siguiente:

El virus mosaico de las venas amarillas de la Bhendi, -como se le conoce en la base de datos-, fue reportado por primera vez en *Hibiscus esculentus* en Bombay, India (Kulkarni citado por Brunt *et al.*, 1996). Los síntomas son persistentes, consisten de aclaramiento de nervaduras seguido por engrosamiento, los frutos y las hojas reducen su tamaño. En la okra se presentan aclaramientos de nervaduras seguido por amarillamiento y engrosamiento.

2.2.1.1.1 Rango de hospedantes

Algunas de las especies susceptibles se encuentran *Althaea rosea* donde ocasiona enchinamiento y arrugamientos de hojas *Hibiscus esculentus* donde es posible conservar y replicar el virus, esta especie es la más adecuada para ensayos ya que ocasiona lesiones locales o en general en la planta (Brunt *et al.*, 1996).

Dentro de las especies no susceptibles se encuentran *Ageratum conyzoides*, *Cajanus cajan*, *Croton bomplaadianus*, *Glycine max* y *Lablab purpureus*.

2.2.1.1.2 Transmisión.

Dehal *et al.*, (1993) relaciona a la transmisión de Geminivirus en Nepal, incluyendo al mosaico de las venas amarillas con la especie *Bemisia tabaci*, esta no induce síntomas de fitotoxicidad en plantas indicadoras y no genera el patrón de bandas en la prueba de esterasas típica de *Bemisia argentifolii*. Brunt *et al.*, (1996) señala que la transmisión es de manera persistente, el virus se retiene cuando muda el vector, no es un virus replicativo y no se transmite transovaricamente, tampoco se transmite por semilla, mecánicamente, por contacto entre plantas, por polen, pero sí por injerto.

2.2.1.1.3 Taxonomía y relaciones serológicas.

Anju *et al.*, (1993) presentó al BYVMV como un virus relacionado estrechamente con el indian cassava mosaic bigeminivirus (ICMV), cuando se realizaron pruebas de ELISA usando un antisuero policlonal de ICMV, el virus mosaico de las venas amarillas de la okra resultó más estrechamente relacionado al ICMV que al african cassava mosaic bigeminivirus.

2.2.1.1.5 Epidemiología.

Nath *et al.*, (1995) indicaron una correlación positiva ($r=0.085$) entre la incidencia del virus mosaico de las venas amarillas de la okra y la población de mosquitas blancas (*Bemisia tabaci*). Mientras una fuerte correlación negativa ($r=-0.84$) fue obtenida entre la incidencia de la enfermedad y el rendimiento de fruto.

Sing, (1990) investigó las condiciones ambientales, como la sequía con ambiente caluroso con escasa o nula precipitación, las cuales fueron propicias para el desarrollo de la enfermedad del mosaico de las venas amarillas de la okra y también para la multiplicación del vector *Bemisia tabaci*. En contraste el frío con alta humedad relativa y precipitación reduce la multiplicación de la mosquita blanca y su distribución.

2.2.1. 2 Virus del enrollamiento de la hoja de la okra (OkLCB).

2.2.1.2.1 Distribución Geográfica

Este virus fue encontrado por primera vez por Kirkpatrick 1930, (citado por Brunt *et al.*, 1996) en Sudán en *Hibiscus esculentus*. Los viriones son geminados con diámetro de 20 nm, con un contorno redondeado y ocurren en bajas concentraciones en la savia de plantas enfermas (Brunt *et al.*, 1997).

Por su parte Fami, (1976) indica que utilizando la técnica de cortes ultra delgados de tejidos para plántulas sanas y enfermas de okra que fueron examinadas bajo el microscopio electrónico no se encontraron partículas semejantes a virus. En este sentido el esfuerzo por determinar la naturaleza del agente causal ha sido seriamente impedido porque el patógeno no es transmisible por la sabia.

Este virus induce síntomas como son engrosamientos de nervaduras, acortamiento de las hojas, enaciones, vainas poco desarrolladas y pequeñas con síntomas como moteados cloróticos en los frutos y en consecuencia la planta detiene su crecimiento Fami (1976).

Este mismo autor señala que la enfermedad ocasionada por el virus okra leaf curl es más devastadora durante la estación lluviosa en Nigeria. La magnitud de las pérdidas depende del periodo de la infección. En infecciones tempranas las plantas detienen su crecimiento, usualmente no alcanzan los 60 cm con pocas o ninguna vaina. En cambio en infecciones tardías las vainas que se desarrollan únicamente reducen su tamaño. El primer síntoma de la enfermedad es el engrosamiento de las nervaduras. Actualmente se reporta confinado al continente africano en Chad, Costa de Ivoire Nigeria y Sudan (Brunt *et al.*, 1997).

2.2.1.2.2 Rango de hospedantes.

Las familias que presentan especies susceptibles son Malvaceas, y Solanaceas, reportándose especies como *Gossypium hirsutum*, *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana tabacum*. Para la prueba de rango de hospedantes se transmitió por injerto y por mosquitas blancas a las especies indicadas,

induciendo síntomas de arrugamiento de hojas, en todas las especies excepto tabaco en el cual desarrollo un moteado ligero; la recuperación de los síntomas a plántulas de okra sanas fue exitosa en cada caso (Fami, 1976).

2.2.1.2.3 Transmisión.

Givord citado por Brunt *et al.*, (1997) transmitió el virus por un vector, un insecto *Bemisia tabaci*, dicha transmisión es de una manera persistente, también puede ser inoculado por injerto. Por otra parte no presenta transmisión por inoculación mecánica ni por semilla.

2.2.1.2.4 Taxonomía y virus relacionados serológicamente

El virus del enrollamiento de la hoja de la okra pertenece a la familia Geminiviridae miembro del subgrupo III, es decir, geminivirus que son transmitidos por mosquita blanca, *Bemisia tabaci*, y afecta a especies dicotiledoneas, está relacionado serológicamente con el african cassava mosaic virus (Brunt *et al.*, 1997).

2.2.2 Virus mosaico de la Okra.

2.2.2.1 Distribución geográfica.

Fue reportado primeramente por Givord *et al.*, (1972) en *Hibiscus esculentus*; en Costa de Ivoire Nigeria, solo se ha reportado en Nigeria.

2.2.2.2 Síntomas

Síntomas persistentes, en todas las familias excepto en Malvaceae, consistiendo de mosaico clorótico de nervaduras y bandeo. Otras familias presentan clorosis intervenal, clorosis y bandeo de nervaduras (Brunt *et al.*, 1997). Por su parte Fami, (1976) observó síntomas tales como diferentes tipos de mosaicos amarillo brillante en la mayoría de las variedades, en el campo mientras más exótica es una variedad, el síntomas de mosaico amarillento se intercala con islas de color verde, los frutos de plantas infectadas también se ven afectados por un moteado clorótico.

2.2.2.3 Propiedades Bioquímicas.

Los viriones contienen 32 % de ácido nucleico, 68 % de proteína, 0 % lípidos. El Genoma consiste de RNA de cadena simple, unipartita de sentido positivo con un RNA subgenómico que codifica en ambas direcciones (arriba y abajo) una proteína para el capsido. La composición es 17.2 % Guanina, 17.5 % Adenina, 39.8 % Citocina y de 25.5 % Uracilo. La infectividad es conservada cuando se desproteiniza con fenol o detergente. El genoma tiene una estructura de ARN de transferencia con actividad aceptora de valina (Brunt *et al.*, 1997).

2.2.2.4 Transmisión.

Se transmite principalmente por insectos vectores del género *Podagrica* que incluye especies como *decolorata*, *uniforma*, *sjostedti* son los más importantes en Costa de Ivoire Nigeria. Posiblemente *Bemisia tabaci* sea un vector en Nigeria, pero esto requiere confirmación. No es transmitido por *Aphis gossypii*; otros insectos que lo transmiten de manera no persistente son *Chrysolagria cuprina*, *Lagria villosa*, *Medythia quaterna*, *Ootheca mutabilis*, *Nisotra dilecta*. Se transmite por inoculación mecánica y por injerto, pero no por semilla (Brunt *et al.*, 1997).

Con relación a la transmisión por semilla Fami, (1976) señala que las semillas provenientes de plantas enfermas son generalmente no viables con referencia a semillas de plantas sanas.

2.2.2.5 Citopatología

Los viriones son encontrados en hojas y raíces, en núcleos o en mitocondrias, otros cambios celulares son vesículas de doble membrana y pequeñas que se encuentran en la periferia de los cloroplastos, los cuales llegan a ser rodeados completamente, vacuolados y desorganizados (Brunt *et al.* 1997).

2.2.2.6 Taxonomía y relaciones serológicas.

El virus mosaico de la okra pertenece al grupo de los Tymovirus, esta relacionado serologicamente con los siguientes virus: kennedya yellow mosaic, desmodium yellow mottle, clitoria yellow vein y cacao yellow mosaic virus, estos

virus están estrechamente relacionados y otros tymoviruses se relacionan de manera distanciada (Brunt *et al.* 1997).

2.3 Cambios al nivel celular ocasionado por los virus en la okra.

Xiong (1999a), presenta de manera general el efecto de la infección viral en las plantas, ocasionando diversas alteraciones en el metabolismo celular, como en la fotosíntesis, nutrición y balance hormonal entre otros. De esta manera, algunos virus como el turnip yellow mosaic virus, induce fragmentación de los cloroplastos y formación de vesículas grandes. Las alteraciones de los cloroplastos pueden derivar en síntomas de clorosis así como retraso del crecimiento. Algunos reportes han indicado que la alteración de los cloroplastos está acompañada por alteraciones de otros orgánulos. Otro efecto es en el balance hormonal resultando en malformación de algunas vegetales tales como tumores, achaparramientos y enchinamientos de hojas. Por otra parte los virus que se encuentran confinados al floema inducen síntomas de amarillamiento en toda la planta, esto se debe a que el virus interfiere en las funciones del floema como son la obtención y movimiento de nutrientes de una parte de la planta a otra.

Nagar (citado por Xiong 1999a), considera que la mayoría de las células en una planta madura están diferenciadas totalmente. Estas células no contienen niveles detectables de enzimas para la duplicación de ADN o de proliferación de antígeno nuclear celular (PANC), las cuales están asociadas con cierta enzima ADN polimerasa. Estos autores usando inmunolocalización para demostrar que las proteínas para la duplicación del geminivirus tomato golden mosaic virus (TGMV) se han localizado en el núcleo de células diferenciadas totalmente. La infección del TGMV resulta en una acumulación significativa en el hospedante de proteínas para la síntesis de ADN y PANC. La PANC es un factor accesorio para la ADN polimerasa delta, que no está presente en niveles detectables en células diferenciadas de plantas sanas. Estos datos sugieren que las proteínas del gen AC1 del geminivirus pueden reactivar la maquinaria de duplicación de células de plantas quiescentes para la duplicación del ADN viral.

Nazeer *et al.* (1994), indican que la resistencia genética al virus mosaico amarillo de las venas amarillas de la okra, involucra la presencia en variedades resistentes de fenoles totales, fenoles ortodihidroxi, flavonoides, proteínas totales y proteínas solubles. Las enzimas peroxidasas y polifenol oxidasas no presentan diferencias significativas entre plantas enfermas y las libres del virus. Sin embargo mediante inoculaciones del virus puedan inducirse cambios en estos constituyentes. Después de la inoculación, los fenoles totales, fenoles ortodihidroxi y flavonoides decrecen en líneas resistentes acompañadas por un incremento en peroxidasas, en tanto que en líneas susceptibles ocurre lo contrario.

Así Nazeer *et al.* (1994), concluyen concentraciones de fenoles y los productos de oxidación por ejemplo quinonas, formadas por el incremento de peroxidasas y polifenol oxidasas puede ser responsable de una reducción en la multiplicación del virus en las líneas resistentes.

Bhagat y Vadav (1997), analizando el contenido de carbohidratos de las hojas de tres variedades de okra relacionado con la infección del Geminivirus mosaico de las venas amarillas, encontraron que las variedades susceptibles inoculadas con el virus presentan una alta concentración de carbohidratos reducidos y no reducidos, así como carbohidratos totales, comparado con la concentración en plantas resistentes.

Tofazzal *et al.* (1989), al estudiar el efecto de la infección viral de un virus no especificado en la okra encontraron que la infección viral reduce el contenido de clorofila "a", "b" y a + b, y de beta-caroteno en todos los órganos estudiados en comparación con plantas de okra sanas, obteniendo como conclusión, que la infección viral altera la actividad de la enzima involucrada en la síntesis de beta-caroteno y clorofila.

Sarma *et al.* (1995), en el virus mosaico de las venas amarillas, encontró que los constituyentes químicos de las hojas de la okra tales como clorofila total "a" y "b", carbohidratos reducidos, contenido de fósforo y potasio se reducen con la infección viral, mientras que el contenido de fenoles totales, azúcares totales, azúcares no reducidos, nitrógeno y proteínas se incrementa; en este sentido, la

variación de estos compuestos puede variar en función de la edad de la planta. Otra variable analizada, fueron los frutos verdes, en los cuales el contenido de azúcares totales reducidos, azúcares no reducidos, nitrógeno y proteínas, fósforo y potasio decrece por la infección del virus.

Singh *et al.* (1983), coincide con Sarma *et al.* (1995), cuando plantean que el virus mosaico de las venas amarillas de la okra, incrementa la cantidad de azúcares reducidos y no reducidos (excepto en frutos), dextrinas, resinas, nitrógeno total, nitrato y nitrito en las hojas, tallos y frutos de la okra. El almidón, amonio y aminoácidos libres y totales decrecen en partes de las plantas enfermas.

Johri y Padhi (1985), estudiaron el efecto del virus mosaico amarillo de las venas en la fisiología de la okra. Encontrando que los niveles de clorofila y los carbohidratos en okra infectada, declinan con el incremento en la severidad, mientras que los niveles de los ácidos nucleicos incrementan en plantas infectadas, las proteínas totales decrecen en tejidos enfermos y su fracción insoluble incrementa tanto como la fracción soluble. El contenido de fósforo total fue bajo en estados iniciales y posteriormente en la mayoría fue igual, seguido por un incremento en fósforo de lípidos y ácidos nucleicos en la fracción fósforo.

2.4 Comportamiento de los vectores.

Alvizo (1997), hace una recopilación de algunos datos de virus transmitidos por mosquitas blancas. De donde se resume la información presente en el cuadro siguiente:

Cuadro 1. Datos seleccionados de transmisión de algunos virus fitopatógenos transmitidos por mosquitas blancas.

Virus	Vector	Periodo de alimentación mínimo para adquisición	Periodo de alimentación mínimo para Inoculación	Periodo de incubación	Periodo de retención
Beet pseudo yellows	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	1 h	6 h	6 h	4-6 días
Bhendi yellow vein mosaic	<i>Bemisia. Tabaci</i>	30 min	10 min	6-8 h	24 días
Cotton leaf crumple	<i>B. tabaci</i>	4-8 horas	1-2 h	20 h	5 d
Cotton leaf curl	<i>B. gossypiperda</i>	3 horas	30 min	8-24 h	7 d
Malvaceae infectious chlorosis	<i>B. tabaci</i>	--	--	--	22 d
Malvastrum yellow vein mosaic	<i>B. tabaci</i>	30 min	30 min	4 h	16
Sida yellow mosaic	<i>B. tabaci</i>	15 min	15 min	--	7 d

Del cuadro anterior se destaca que el virus mosaico de las venas amarillas (bhendi yellow vein mosaic), presenta las características de transmisión más eficientes comparados con los otros virus, debido a que presenta un periodo alimentación mínimo para adquirir el virus de 30 minutos, para después ser capaz de inocularlo transcurriendo un mínimo de 10 minutos y finalmente ser retenido dentro del vector infectivo durante 24 días, equivalente al periodo de vida del vector.

Con relación a los áfidos Alvizo (1997), recopiló información donde se presenta a *Aphis gossypii* como vector del virus maize dwarf mosaic virus, sunflower yellow blotch y virus mosaico amarillo zucchini.

Gill y Rataul, (1990) estudiaron en el laboratorio la conducta alimenticia sobre tejido vegetal de varias especies de insectos vectores de virus, descubriendo para *Myzus persicae* y *Bemisia tabaci* que durante el periodo de alimentación el camino del estilete llega al floema, no así el *Aphis gossypii* que llega a la epidermis. La ruta del estilete de todas las especies fue inter/intracelular.

Mohanty y Basu (1990), en un estudio de la habilidad para transmitir el virus mosaico de las venas amarillas por parte de las mosquitas blancas detectó que no existe efecto significativo en la habilidad para transmitir el virus cuando las mosquitas son criadas en diferentes plantas. La habilidad para la transmisión del virus fue influida por las condiciones climáticas.

2.5 Detección de geminivirus de la okra.

Harrison *et al.* (1997), a partir de algodón con el geminivirus de acortamiento de hojas del mismo cultivo, logró transmitirlo por medio de mosquitas blancas (*Bemisia tabaci*) a 7 plantas considerando frijol, tabaco, tomate y okra, causando síntomas de acortamiento de hojas y engrosamiento de nervaduras. La presencia del virus fue corroborada con pruebas de ELISA de triple sandwich de anticuerpos (TAS-ELISA) por medio de 11 de 31 anticuerpos monoclonales, realizando repeticiones para partículas de tres tipos de geminivirus: cassava african mosaic, cassava indian mosaic y okra leaf-curl bigeminivirus; la reacción se intensificó y fue acelerada cuando a la extracción del fluido de tejido contenía sulfito de sodio.

Los virus en algodón y en okra con síntomas de acortamiento de hojas o síntomas de amarillamiento de hojas son también detectados por PCR con 3 pares de iniciadores específicos de CLCuV-PK (acortamiento de hojas del algodón aislamiento Paquistan).

Liu *et al.* (1998), indican que la secuencia a partir del geminivirus de acortamiento de hojas afectando okra, es Guanina la misma secuencia como los provenientes de algodón. Aislamientos a partir del mosaico de las venas amarillas de la okra fueron de dos tipos (201 y 301) ambos distintos entre sí,

pero estrechamente relacionados a los virus aislados a partir de algodón. Concluyendo que los virus que afectan al algodón en la zona de estudio es causado por varias variantes distintas del virus y que es posible la recombinación con el virus mosaico de las venas amarillas de la okra y otro geminivirus no especificados que han intervenido en su evolución.

2.6 Papel de las técnicas moleculares en la protección vegetal.

Las técnicas moleculares en la actualidad se han empleado como un complemento a las metodológicas de caracterización morfológica de organismos patógenos, con dichas técnicas es posible detectar diferencias mínimas entre los organismos y clasificarlo en categorías inferiores, por ejemplo razas, patovares (Valadez 1999). El mismo autor indica que actualmente se han diseñado estrategias que ofrecen un amplio potencial para poder utilizarse en estudios de diversidad genética y taxonómica de microorganismos tales como:

- Análisis de ácidos nucleicos (plasmidos y cromosomas) que incluyen técnicas de hibridación con sondas específicas de ácidos nucleicos, técnicas de secuenciación y síntesis discreta de ADN (PCR).
- Análisis de proteínas, análisis de liposacáridos, y análisis químicos que consideran cromatografía líquido-gas incluso espectrofotometría de masas.

2.6.1 Estudios específicos de la aplicación de las técnicas moleculares en fitopatógenos.

De acuerdo con Cordova, (1999) la reacción encadena de la polimerasa, es actualmente la mejor técnica para la detección y diagnóstico de enfermedades ocasionadas por fitoplasmas.

Gómez, (1999) reporta los viroides como los patógenos más pequeños conocidos en la actualidad, ellos pueden ser caracterizados por métodos químicos, biológicos y moleculares.

Existen varios métodos de para la detección de agentes infecciosos en material vegetal entre los que se pueden citar el ensayo de inmunoabsorción ligado a

enzima (ELISA), electroforesis secuencial (sPAGE), aislamiento de procariotes en medio de cultivo (bacterias, espiroplasmas), análisis de ARN de doble cadena, microscopía electrónica de inmunoadsorción y la hibridación de ácidos nucleicos, sin embargo para el caso de los viroides se usa las plantas indicadoras, el análisis electrofórico en geles de poliacrilamida y más recientemente la hibridación molecular y la amplificación enzimática de ácidos nucleicos.

Silva *et al.*, (1998) indica que a partir del año 1985 cuando Kary Mullis descubrió la reacción en cadena de la polimerasa PCR, se marcó un hito en la historia de la biología molecular. Esta técnica ha permitido la detección y caracterización molecular de fitopatógenos tan diversos como hongos, bacterias, rickettsias, virus, viroides y fitoplasmas.

2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Veilleux, (1999) refiere a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una técnica de la biología molecular rápida de amplio uso por las razones siguientes: es un medio muy rápido y económico para producir un gran número de copias de moléculas de ADN a partir de mínimas cantidades de un material fuente de ADN, aun cuando la fuente de ADN se encuentra en una baja concentración.

De acuerdo con Silva *et al.*, (1998) la reacción en cadena de la polimerasa es (PCR) es una síntesis de polimerización enzimática que se lleva a cabo en ciclos térmicos. La enzima participante es una enzima termoestable y en la reacción secuencias de ADN son copiadas muchas veces *in vitro*. El producto de la polimerización del primer ciclo sirve de molde para el siguiente, de tal modo que el número de copias del ADN blanco se duplica exponencialmente en cada ciclo de polimerización. Por ejemplo, partiendo de una molécula de ADN, 30 ciclos de síntesis producirán una cantidad estimada de un billón de moléculas nuevas de ADN. El producto nuevo sintetizado permite visualizar el segmento en un gel de agarosa o poliacrilamida. La PCR incluye en cada ciclo tres pasos fundamentales que son: desnaturalización, apareamiento y extensión.

La desnaturalización consiste en la separación de dos cadenas de ADN en hebras sencillas, esto se fundamenta en que las uniones de las cadenas duplex por enlaces de puentes de hidrógeno pueden ser fácilmente sueltos a 94 °C.

El apareamiento del ADN requiere de enzima ADN polimerasa, una cadena de ADN pre-existente que actúa como molde y de un pequeño segmento sintético que se usa para alargar o extender la cadena que se denomina iniciador o primers y es un oligonucleótido de 15 a 30 bases nucleotídicas. Para aparear o hibridar este oligonucleótido a la molécula molde, se requiere de una temperatura de 45-65 ° C dependiendo del ensayo.

El tercer paso del ciclo es la extensión del iniciador, mediante una polimerización, en dirección 5' a 3' por medio de una ADN polimerasa y desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs). Esta extensión de los iniciadores resultará en una copia del ADN (ADNc). La ADN polimerasa funciona óptimamente a 72 ° C.

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo y dan por resultado que la molécula de ADN de doble cadena sea copiada para producir dos cadenas de ADN "hijas". En el segundo ciclo las cadenas de ADN se convierten en 4, y así sucesivamente.

2.6.2.1 Detección de virus por PCR.

2.6.2.1.1 Detección de geminivirus

De acuerdo con Rojas *et al.*, (1993) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica específica y extremadamente sensible para detección e identificación de patógenos vegetales. La especificidad de la PCR se basa en el uso de iniciadores oligonucleótidos que son complementarios a una región blanco del genoma que se desea amplificar. Una de las ventajas es que se puede partir de una pequeña muestra de tejido vegetal, la cual puede estar congelada, fresca, o seca, que resulta adecuada para la PCR. El método de la PCR ha sido utilizado para la detección y determinación de la variabilidad de virus fitopatógenos, donde se han reportado a los virus del tipo luteovirus, potyvirus, geminivirus transmitidos chicharritas que infectan plantas

nocotiledoneas y geminivirus transmitidos por mosquitos blancos que afecta al tomate, una dicotiledonea. En este sentido también se ha reportado por Epaminondas *et al.*, (1994) la utilización de la técnica para detección de geminivirus de genoma bipartita que infectan tomates en México. De esta manera es posible aplicar la PCR para detección e identificación de geminivirus porque ellos se replican por la vía de una doble cadena, ADN circular intermedio –forma replicativa- la cual puede servir como plantilla para la amplificación de la PCR.

Rojas *et al.*, (1993) utilizó iniciadores degenerados para geminivirus transmitidos por mosquitos blancos los cuales fueron diseñados para alinearse a regiones de secuencias altamente conservadas de los marcos de lectura abiertos, o las regiones comunes de ADN-A y ADN-B. Un iniciador degenerado es una mezcla de moléculas en las cuales los nucleótidos hacia una o más posiciones definidas difieren por el diseño. El número degenerado para un iniciador es el producto de todas las opciones combinadas que designa tantos como puedan ocurrir en cada una de las posiciones del iniciador.

La elección de los primers PAV1v1978 para el segmento ADN-A y PAR1c496 fue designada para alinear dentro del marco de lectura abierta AL1, el cual codifica para una proteína asociada con la duplicación, y el marco de lectura abierta AR1, el cual codifica para la proteína del cápside respectivamente.

El iniciador PAV1v1978, fue diseñado para alinearse a la cadena de sentido complementaria a la forma replicativa a partir de AL1, cuya secuencia codifica a Tir-Gli-Lis-Tir-Met-Tri-Ala; dicha secuencia es conservada y los nucleótidos trifosfato-obligatorios, supuestamente son sitios en las proteínas asociadas a la duplicación viral (figura 1).

Los mismos autores presentan al iniciador PAR1c496 que fue diseñado para alinearse a la cadena de sentido del marco de lectura abierta AR1; esta secuencia codifica para una secuencia derivada de amino ácidos conservada Pro-Met-Tir-Arg-Lis-Pro-Arg, la cual está localizada próxima a la terminación amino de la capa proteica (figura 1). La secuencia de los dos iniciadores mencionados es la siguiente:

PAL1v1978
PAR1c496

5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3'
5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3'

Donde aplica el código IUPAC siendo Y = C,T; R=A,G; N=A,C,G,T,.

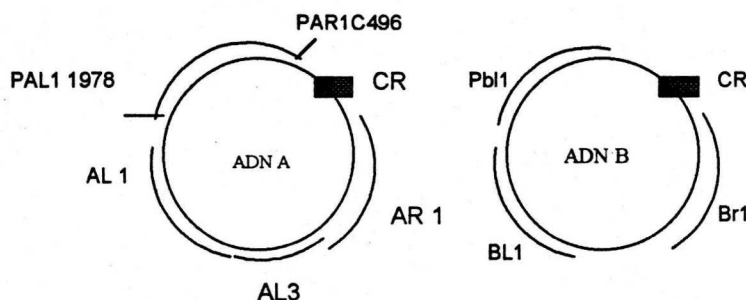


Figura 1. Esquema que representa las formas replicativas de los ADN A y ADN B, de un típico geminivirus bipartita. AL1 y BR1= marcos de lectura abierta, CR = región común, la línea de los iniciadores indica el fragmento amplificado por la PCR. Tomado de Rojas 1993.

Por otra parte Epaminondas *et al.*, (1994) coincide en la utilización de iniciadores PAVLlv1978 y PAR1c496 para amplificar un DNA-B, y así como en la metodología de extracción del ADN utilizada por Rojas *et al* 1993; esto con la finalidad de realizar la caracterización molecular de geminivirus que infectan tomates en México.

Concluyendo Rojas *et al.*, (1993) obtuvo con los iniciadores PAL1v1978 y PAR1c496 un fragmento amplificado de 1.1 kb para geminivirus como el soybean golden mosaic geminivirus, bean golden mosaic geminivirus proveniente de Guatemala y geminivirus de tomate provenientes de México; otro fragmento de 1.4 kb se amplificó para los virus tomato yellows leaf curl geminivirus proveniente de Egipto y legume weed geminivirus originario de Malawi

Wilsler *et al.*, (1998) demostraron que la mosquita blanca es capaz de transmitir virus del tipo closterovirus dentro de los cuales están incluido beet pseudo-yellows virus (BPYV), cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), lettuce chlorosis virus (LCV), tomato infectious chlorosis virus (ToCV) y un grupo

relacionado a los closterovirus que infecta papa dulce, potato chlorotic stunt virus (SPCSV).

Tian *et al* (1996), para detección de virus transmitidos por mosquitas blancas y del grupo closterovirus utilizaron RT-PCR e iniciadores oligonucleotidos degenerados, donde estos iniciadores corresponden al gen que tiene un 70% de homología y que codifica una proteína de heat shock. De esta manera los iniciadores oligonucleótidos son diseñados con una secuencia idéntica al motif 1 fosfato (HSP-P-1) para ser complementarios a la secuencia correspondiente al motif 2 fosfato (HSP-P-2), y a la posición del nucleotido degenerado que no es idéntica. Este procedimiento se utilizó para la generación de ADNc específicos para virus lettuce infectious yellows closterovirus (LIYV), tomato infectious chlorosis virus (TICV), beet pseudoyellow virus (BPYV), cucurbit yellow stuning disorder virus (CYSDV) y lettuce chlorosis virus (LCV). Los cDNAs resultantes para LIYV, TICV, BPYV, y CYSDV fueron clonados, y fue determinada y comparada su secuencia de nucleotidos y de aminoácidos. También se generaron sondas para cada cDNA clonado y se uso entonces para identificar y diferenciar respectivamente a los virus trasmitidos por mosquita blanca en extractos de plantas. Esta metodología fue aplicada para identificar a otros virus que son transmitidos por mosquitas blancas y no pertenecen a los geminivirus.

2. 6.3 Detección de germinivirus por sondas marcadas con Digoxigenina.

Harper y Creamer, (1995) utilizando la técnica de hibridación dot blot, sondas marcadas con digoxigenina y colorimetría visual detectaron a los virus fitopatógeno, considerando a, squash leaf curl virus y beet curly top virus, así como zucchini yellow mosaic potyvirus, lettuce infectious yellows virus, y beet yellows closterovirus. Estos mismos autores indican que la técnica de hibridación de ácidos nucleicos es muy sensible y específica. Por ejemplo para detectar un geminivirus específico se puede utilizar el componente A del DNA como sonda general para hibridación en la mayoría de los casos de geminivirus trasmitidos por mosquitas blancas, mientras que una sonda derivada a partir del

componente B del DNA permite identificar de qué virus se trata específicamente. De esta manera las sondas marcadas con digoxigenina se vislumbran como una alternativa segura, de bajo impacto ambiental y de bajo costo en comparación con las sondas marcadas con radioactividad. Una de las desventajas de este método es que se requiere de una metodología especial de preparación de las muestras para cada virus o para cada tejido vegetal y no se han adaptado los métodos para un rango más amplio de virus.

2.7 Manejo de enfermedades virosas de la okra.

2.7.1 Control químico de vectores.

Borad *et al.*, (1993) indican que el porcentaje de incidencia de la enfermedad incrementa progresivamente con el correspondiente incremento del vector *Bemisia tabaci*, los adultos y los síntomas de la enfermedad del virus mosaico de la venas amarillas fue observado 16-20 días después de la siembra.

Bhagat *et al.*, (1997) probaron la eficiencia de tres insecticidas (carbofuran, forato, y metil axidemeton) solos o en combinación para el control de vector *Bemisia tabaci*, transmisor del virus mosaico de la venas amarillas de la okra, donde obtuvieron que la aplicación al suelo de carbofuran a 1 kg de i. a. /ha a la siembra y 20 días después de la siembra, seguida por una aplicación de oxidemeton metil a dosis de 250 ml de i. a./ha 45 días después de la siembra, reduce significativamente la población del vector resultando en una reducción de la incidencia de la enfermedad e incremento del rendimiento.

Borah y Nath (1995), aplicando dimetoato al 0.03 % a los 15-30 días después de la germinación resultó en el mejor tratamiento para el control de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* vector del geminivirus mosaico de las venas amarillas de la okra.

Singh *et al.* (1989) reportan la realización de un experimento para controlar al vector del virus mosaico de las venas amarillas por aplicaciones de insecticidas, fechas de siembra y utilización de barreras vegetales. El virus fue controlado por tres aplicaciones de fosfamidón (0.02 %) o dimeton s metil (0.025 %) una

aplicación simple al suelo de foratox (15 kg/ha) o al intercalar a la okra con *Vigna unguiculata* o *V. radiata*. Los tratamientos con insecticidas resultaron más efectivos para aumentar el rendimiento comparado con los otros.

Murthy y Reddy (1992) obtuvieron que con aplicaciones de carbofuran en gránulos al suelo en la siembra seguido por 2 aplicaciones de monocrotofos con un intervalo de 48 días para el control del vector *Bemisia tabaci*. El tratamiento temprano fue importante para prevenir la infección durante los primeros 20 días después de la siembra.

2.7.2 Variedades resistentes

Sangar, (1997) reporta en un estudio realizado en la India donde se probaron ocho variedades de okra para resistencia genética al virus mosaico de las venas amarillas de la okra, resultando altamente resistentes las variedades Arka Anamika, Arka Abhay y moderadamente resistentes Parbhani Kranti y V-6. Dhankhar (1996) y Srivastava *et al.* (1995) indican que la variedad Varsh Uphar es derivada de la cruce de la selección Sam 1X x Parbhani kranti, así como HRB55 son resistentes al virus mosaico de las venas amarillas de la okra.

El mismo autor pero con otros colaboradores en 1996 reportan a la variedad Parbhni Kranti como una variedad resistente al virus mosaico de las venas amarillas de la okra así como el híbrido P-7 fue moderadamente resistente.

2.7.3 Prácticas culturales.

Khan y Mukhopadhyay, (1985) estudiaron el efecto en la incidencia del virus mosaico amarillo de las venas amarillas de la okra del acolchado con polietileno amarillo, encontrando que éste reduce significativamente la aparición del virus, el efecto en la aparición de los síntomas alcanza los 69 días después de la siembra en los tratamientos acolchados en comparación con solo 28 días en los cultivos no acolchados. La incidencia de la enfermedad fue de 24.3 % en cultivo acolchado en comparación con el testigo que fue de 58.6 %.

Otro experimento que se realizó fue la asociación okra-calabaza la cual eleva la incidencia total de la enfermedad así como tasa de distribución. La incidencia

de la enfermedad fue de un 96.43 % en el cultivo asociado en comparación con el testigo que resultó en un 42.17.

Chowdhury *et al.* (1992), al probar extractos vegetales contra el virus mosaico de las venas amarillas, extractos en alcohol de *Callistemon*, *Datura*, *Agave* y *Zingiber officinale*, resultaron en un buen grado de inhibición de síntomas cuando se aplicó a la okra bajo condiciones de campo. Una baja tasa de diseminación de la enfermedad fue observada en plantas tratadas comparadas con el testigo al cual, sólo se le aplicó agua. La mortalidad del vector fue de 20-80 % cuando se realizaron experimentos de confinamiento de mosquitas blancas durante 30 minutos en una caja petri y tratadas con los extractos.

Mazumber *et al.*, (1996) en un estudio de la incidencia del virus mosaico amarillo de la okra con relación a la variedad y población del vector bajo diferentes fechas de siembra, observaron una correlación simple positiva asociada entre la incidencia de la enfermedad y la población de mosquitas blancas, temperatura, humedad relativa (en las tardes), precipitación y número de días lluviosos.

Singh *et al* (1994), reporta que las siembras tardías presentan mayor incidencia de mosaico de las venas amarillas de la okra comparado con siembras tempranas.

2.8 Experimentos de campo paralelos a la investigación.

Ayvar y Michel, (1998) realizaron un experimento para evaluar la incidencia de la enfermedad y la asociación con algún vector, donde establecieron los siguiente tratamientos:

Cuadro 2. Tratamientos y dosis aplicadas en el experimento número 1 en Iguala 1998.

Número de tratamientos	Tratamientos	Dosis
1	Testigo	0.0
2	Gaucho + Imidacloprid (Bayer)	35 g/lb – 1 l/ha
3	Talstar+ orthene	0.25 l – 0.5 l/ha
4	Vydate + Endosulfan	1 l + 1 l/ha
5	Saf-T-Side + Bio J	20 ml+ 20 ml / l de H ₂ O
6	Agribon	

Independientemente de las consideraciones que requieran estos tratamientos, para este experimento, no se obtuvieron resultados debido a que durante el periodo de establecimiento (26 de junio) no se presentó la enfermedad en ningún tratamiento en el lote experimental, por lo que fue necesaria una repetición.

En otro experimento donde se establecieron los mismos tratamientos, fue posible observar personalmente el comportamiento de algunos de ellos y que a su vez Pereyda *et al.*, (1998) reporta que el tratamiento de Imidacloprid de Bayer mostró mejor uniformidad en la altura y aspecto de las plantas, el tono de las hojas, fue más oscuro, y no se observaron perforaciones causadas por insectos masticadores. Con relación al tratamiento de Agribon (figura 12) este resulta prometedor, ya que bajo este tratamiento la incidencia de la enfermedad es de 0 %; a diferencia del tratamiento de imidacloprid donde sí se logra encontrar algunas plantas con el amarillamiento característico. Los otros tratamientos no presentan algún comportamiento especial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas donde se llevo acabo la investigación

El trabajo de investigación se realizó en el invernadero y laboratorio de virus fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Las pruebas de identificación de secuencias específicas de la cadena viral se efectuaron en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la misma Universidad. Las observaciones en el microscopio electrónico y microscopio de luz se llevaron a cabo en el Instituto de Fitosanidad del Colegio Postgraduados.

3.1 Colecta del material enfermo y vectores

Con la finalidad de obtener el material vegetal infectado, así como insectos vectores del virus, se efectuaron tres viajes de colecta en la zona productora de okra en Iguala, Guerrero. Este municipio está ubicado a los 18° 22 ' y 99° 33' a una altitud de 635 msnm. presentando un clima Aw_o (w) (i') que significa cálido con un temperatura media anual sobre 22 ° C, con lluvias en verano con poca oscilación térmica y marcha de la temperatura tipo ganges (García 1981).

Dentro del valle de Iguala se colectó material vegetal y vectores en tres sitios diferentes debido a la seguridad de que se encontrarían plantas enfermas, siendo los siguientes:

Sitio 1. Al este de la Ciudad de Iguala en una parcela propiedad de Zacarías Velázquez miembro de la Asociación de Productores "El Pentágono".

Sitio 2. A un costado de la carretera Iguala-Cocula a la altura del kilometro 14, propiedad de la Asociación de Productores "Agroproductores y Comercializadora de Okra".

Sitio 3. Ubicado al este de la Ciudad de Iguala a un costado del canal principal de riego de la presa Valerio Trujano.

Las plantas de okra enfermas, se seleccionaron al azar y de manera especial aquellas que presentaban síntomas de amarillamiento inicial en las hojas y que presentaron un tamaño entre 20-30 cm de altura; es decir, se aplicó una estrategia de muestreo dirigido. Estas plantas se trajeron al invernadero donde completaron su ciclo de desarrollo y soportaron mejor el transporte durante 5 horas de viaje sin sufrir un estrés demasiado severo.

Para coleccionar las mosquitas blancas, se tomaron dos vasos con fondo de tela tipo tul, para atraparlas cuando estuvieran en reposo en plantas de okra o en la maleza; se tomaron con un movimiento rápido juntando los dos vasos. Estos vasos fueron unidos y sellados con cinta adhesiva tipo maskin tape. Se tomaron seis muestras con 30-60 insectos aproximadamente y se colocaron en una hielera, para ser transportadas a la Universidad.

Para el caso de los áfidos que serían ocupados en las pruebas de transmisión, se coleccionaron ninfas que fueron transportadas con todo y la planta de okra de la cual se alimentaban, y se introdujeron en una jaula de madera cubierta con tela tul.

3.2 Estimación de la incidencia de la enfermedad en campo

En los tres sitios mencionados se seleccionó al azar un cuadrante de 20 x 20 metros y se contó el número total de plantas presentes en el cuadrante y el número de plantas enfermas con síntomas de mosaico amarillo, para obtener una relación, asimismo fue posible estimar el daño en frutos cosechados, para tal efecto se tomó una muestra al azar de una reja cosechada consistente de 100 frutos y se contó el número de frutos con síntomas de mosaico clorótico en la muestra.

3.3 Material vegetal

El genotipo de okra cultivado comercialmente en Iguala, el mismo que fue coleccionado y utilizado en todas las pruebas de transmisión y extracción de ADN corresponde a la variedad Clempson Spineless, la semilla de planta sana fue

proporcionada por personal del Colegio Superior de Agricultura del estado de Guerrero.

3.4 Identificación de insectos vectores

3.4.1 Áfidos

Los áfidos ninfas y adultos alados fueron colectados y conservados en alcohol 70 % para ser identificados en el laboratorio de Entomología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola, utilizando para tal efecto, un microscopio estereoscópico y claves entomológicas del orden publicadas por Urias *et al* (1992), así como las de Peña y Bujanos (1992).

3.4.2 Identificación de mosquitos blancos

Con pupas del cuarto instar colectadas en lotes donde se presentó la enfermedad, se procedió a realizar el montaje de pupas; para tal efecto se aplicó un aclarado con lactofenol calentándose durante 5 minutos, y una vez aclaradas las pupas, se depositaron en un portaobjetos que contenía una gota de fitossiede (reactivo compuesto por tetraclorato, yodo, glicerina y agua destilada) y se cubrió con un cubreobjeto precortado, se calentó durante otros 5 minutos para posteriormente ser visto en el microscopio de luz. Para identificar y verificar la presencia de una sola especie, se requirió de al menos 50 montajes diferentes, se aplicaron las claves de Martin (1987), y se confirmó con la Dra Laura Delia Ortega Arenas (Profesor investigador del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados).

3.5 Establecimiento y cuidado de las plantas en el invernadero

Para la conservación del virus se establecieron, plantas de okra con síntomas de amarillamiento colectadas en campo, en macetas de plástico de 5 L, con el mismo suelo en el que se sembraron originalmente. Dado que la okra es una planta de clima tropical durante el invierno se acondicionó el invernadero con focos encendidos y un calentador para elevar la temperatura durante la noche,

de esta manera se mantuvo la temperatura nocturna en un promedio de 25-28 °C; durante el día se mantenía alrededor de los 30-35 ° C.

Para las pruebas de transmisión, se utilizaron plantas de okra var. "Clemson Spineless", proveniente de semilla de Iguala Gro. y crecidas en macetas de poliestireno de 1 L con suelo esterilizado con bromuro de metilo que fueron fertilizadas regularmente con una solución nutritiva de triple 17, y cuando fue necesario se aplicó metalaxil 2 g/L de agua para el control de *Pythium*.

3.6 Ensayo de inmunoabsorbancia con enzimas conjugadas (ELISA)

Para realizar esto se tomaron quince muestras de hojas de okra con síntomas de amarillamiento proveniente de Iguala, Guerrero de las cuales se obtuvo 2 gramos de la nervadura. También se aplicó la prueba a 5 maleza diferentes que expresaban síntomas de mosaico amarillo semejante a la okra, de las cuales se pesó 1 gramo de nervadura central, que fue molido con el amortiguador de extracción para ELISA y colectado en una bolsa de nylon o plástico de 10 x 15 cm. En cada pozo de una placa previamente sensibilizada con el antisuero policlonal para geminivirus de la casa comercial Agdia para geminivirus se colocaron 100 µL del macerado (antígeno), se dejó toda una noche incubando a 4 ° C.

Al final del periodo de incubación, la placa de ELISA se lavó 3 veces.

Posteriormente la placa se golpeó con firmeza contra un papel secante hasta eliminar el exceso de PBST.

Se adicionó el conjugado (anticuerpo + fosfatasa alcalina), en donde los anticuerpos se adhieren solamente a las partículas del antígeno. Posteriormente cada pozo se le agregaron 100 µL del conjugado (enzima + gammaglobulina) diluido, y se incubó la placa durante 4 horas a temperatura del laboratorio; después se eliminó el conjugado enzimático y se lavó de manera similar como se describió antes.

El paso siguiente consistió en agregar el sustrato para la fosfasa alcalina que fue de 100 µl para cada pozo. La placa se colocó en la obscuridad para después observar la coloración en un lector de placas de ELISA.

3.7 Búsqueda de inclusiones virales

De hojas de okra de campo con síntomas de mosaico amarillo se desprendió la epidermis del envés, y en la nervadura principal se realizó un raspado con lija de agua humedecida de 600 mallas. Los fragmentos de epidermis se colocaron en las colorantes: azul de bromofenol mercurio, que tiñe proteínas de color azul y en rodamina verde de metilo, que tiñe al ADN de color azul y a las inclusiones de color violeta. Se dejaron teñir durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron; el azul de bromofenol con agua de la llave y la rodamina verde de metilo con agua destilada. Finalmente se montaron en glicerina para ser observadas en el microscopio de luz. Para el caso del tejido raspado, la tinción se llevó a cabo con dos gotas de Azure A, más una gota de fosfato de sodio dibásico; se dejaron teñir durante 15 minutos y se lavaron con alcohol al 80 %, se montaron con glicerina y observaron en el microscopio de luz.

3.8 Pruebas de transmisión

3.8.1 Transmisión mecánica

El inóculo obtenido de plantas de campo con síntomas de la enfermedad en cuestión, se preparó moliendo el tejido vegetal infectado en una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH 7.0, en una relación 1:3 p/v. Con un isopo de algodón humedecido de la savia enferma, se frotó sobre las hojas de la planta de okra sana, previamente espolvoreadas con carborundum de 600 mallas, y se espero para la observación de los síntomas hasta 1 mes.

3.8.1.1 Rango de hospedantes

Para la prueba de rango de hospedantes se inocularon mecánicamente las siguientes familias y especies:

Chenopodiáceas (*Chenopodium album*, *Ch. Amaranticolor* y *Ch. quinoa*); Cucurbitáceas (*Cucurbita pepo*); Solanáceas (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *Capsicum annuum*, *Datura stramonium* y *Lycopersicon esculentum*); Fabáceas (*Phaseolus vulgaris* y *Vicia faba*); Malváceas (*Abelmoschus esculentus*, *Gossypium hirsutum* y *Hibiscus sabdarifa*) con 3 repeticiones.

3.8.1.2 Aislamiento de un virus críptico

Con plantas de okra con síntomas de mosaicos amarillos se realizaron pruebas de transmisión mecánica, a plantas de okra sanas, cuando se observó que estas no expresaban síntomas, se tomaron hojas y se inocularon plantas de *Nicotiana occidentalis* para observar la presencia de síntomas, esta prueba se repitió 3 veces con 5 plantas de okra sana y 5 plantas de *Nicotiana occidentalis*.

3.8.2 Transmisión por semilla

Se establecieron 150 plantas con semillas de okra comercial provenientes de planta sana, aunque existe la sospecha de que el virus pudo estar presente en el embrión de la semilla ya que se mantuvieron aisladas de insectos vectores, y después se observó la presencia de síntomas de la enfermedad.

Por otra parte se sembraron 50 semillas, obtenidas en el invernadero y procedentes de plantas de okra con síntomas de amarillamiento, que tiempo atrás fueron colectadas en campo. En este caso lo único que se realizó fue cortar los pocos frutos que se formaron y se secaron las semillas, para después ser utilizadas en la prueba de transmisión.

3.8.3 Transmisión por injerto

Se injertaron 8 plantas de okra sanas de tres meses de edad, con yemas provenientes de una planta de okra enferma por el virus, proveniente de campo, que expresaba síntomas de mosaico amarillo; la zona de unión fue sellada con parafilm. Con la finalidad de mantener la humedad relativa, las plantas se cubrieron con una bolsa de plástico, se les proporcionaron 12 horas de luz durante la noche para mantener la temperatura nocturna en 25-30 °C en el invernadero y se tuvieron durante un mes para la observación de síntomas bajo condiciones de aislamiento de insectos vectores.

Otro experimento realizado con la finalidad de aislar el virus fueron los injertos de 5 plantas de *Nicotiana occidentalis* realizados con yemas de okra procedentes de plantas con síntomas de mosaicos amarillos, el procedimiento fue similar a lo mencionado anteriormente.

3.8.4 Transmisión por mosquita blanca

En una jaula de madera que contenía plantas de okra con síntomas de mosaico amarillo provenientes de Iguala Gro. fueron liberadas mosquitas blancas colectadas en el campo, con la finalidad de que adquirieran el virus; después se introdujeron 10 plantas de okra sanas que presentaban 2 hojas verdaderas. Cabe mencionar que las plantas enfermas así como los vectores, fueron colectados y transportados el mismo día, y ya se contaba con las plántulas de okra sana para realizar la prueba de transmisión en el invernadero de Chapingo. Para esta prueba, dado que se trataba de mosquitas blancas que estaban adaptadas a altas temperaturas (26 –30 °C), se prestó especial atención para proporcionar un ambiente cálido en el invernadero, apoyados con un calentador y focos encendidos simultáneamente durante la noche y sólo el calentador en el día.

3.9 Microscopía electrónica

Agrios (1991), reporta que una de las pruebas más contundentes para la caracterización de un virus y demostración de su presencia en un tejido vegetal es la observación de la partícula viral en el microscopio electrónico.

3.9.1 Tinción negativa

Siguiendo la metodología de Ureña (1986) para microscopia electrónica, se tomaron hojas de planta de okra que expresaban síntomas de mosaico amarillo, hojas con síntomas de mosaico blanco y brotes tiernos de ramitas con hojas enfermas, todos provenientes de campo, estos tejidos se maceraron en los contrastantes ácido fosfotúngstico 1 % pH 6.9 y acetato de uranilo 2 % y una vez que se tuvo el macerado, se decanto de tal manera que solo se tuviera la solución sin tejido y en ésta se colocó una rejilla de cobre, se sacó y se dejó en una caja de petri hasta que éste secó para poder ser observada al microscopio electrónico.

3.9.1.1 Clarificación del virus

Para la clarificación del virus se siguió la metodología de Givord (1973); para estos se tomaron 5 gramos de tejido fresco de plantas de okra con síntomas de mosaico amarillo, se extrajo la savia del foliolo con el amortiguador de fosfato de sodio N 0.01 pH 7 adicionado con bentonita 1% y disulfito de sodio 0.5%, utilizando un volumen de 1.5 con relación al peso de tejido fresco.

Se centrifugó durante 20 min a 10 000 revoluciones por minuto (8160g) se extrae el sobrenadante se incubó a 4°C por una hora con *n*-butanol y se vuelve a centrifugar 5 min a 3 000 rpm (735 g) para extraer posteriormente la fase acuosa. El clarificado se utilizó para observación en el microscopio electrónico después de haber sido teñido con acetato de uranilo y colocado en una micromembrana.

3.9.2 Obtención de cortes ultradelgados

Siguiendo la técnica de Ureña (1986) desarrollada para el microscopio electrónico, se tomaron hojas de okra obtenidas en el campo con síntomas de mosaico amarillo, mosaico blanco, y brotes tiernos de ramitas que expresaban los síntomas. Las muestras se seccionaron en porciones de 1x1 mm, e inmediatamente las porciones se colocaron en un fijador de glutaraldehído 6.5 % en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.2, después de una 1 h los tejidos se lavaron con tres cambios de amortiguador y en el último cambio se mantuvieron toda la noche. Para el día siguiente se eliminó el amortiguador y se adicionó tetraóxido de osmio 1% en agua y se dejó durante 4 horas. Posteriormente se eliminó y se lavó tres veces con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.2 con intervalos de 15 minutos, posteriormente se realizó la deshidratación con alcohol etílico, con los tiempos indicados:

Cuadro 3. Concentraciones de alcohol etílico.

Alcohol	Tiempo (min)
Alcohol 50 %	15
Alcohol 70 %	15
Alcohol 90 %	15
Alcohol 100 %	20
Alcohol 100 %	20
Alcohol 100 %	20

Por otra parte se preparó una resina que mezcló los reactivos siguientes:

Dioxido de vinilciclohexano (VCA)	2.5 ml.
Diglicidil eter de polipropilenglicol	1.4 ml.
Anhidrido nonenil succinico (NSA)	6.5 ml.
Dimetilaminoetanol (DMAE)	0.1 ml.

Al tejido deshidratado se le agregó la resina y se dejó toda la noche en un "revolucionador" lento para que se mantuviera en movimiento.

Finalmente en cápsulas de plástico se depositó un cuadrito de tejido y se llenó con resina nueva hasta la tercera parte de la cápsula; las cápsulas se incubaron 60 °C durante 24 h para que la resina polimerizara.

El material incluido en resina se preparó para hacer los cortes ultrafinos. Estos se realizaron en un ultramicrotomo, los de color gris se montaron en rejillas de cobre previamente preparadas con una membrana de formvar 0.25 %, y fueron teñidos con acetato de uranilo, citrato de plomo y colorante de Reynolds.

Para la tinción con el colorante de Reynolds se procedió de la siguiente manera:

En una caja petri grande se colocó papel filtro en el fondo y se colocaron arriba de 3-5 perlas de hidróxido de sodio y en el papel filtro se depositaron con mucho cuidado unas gotas de colorante Reynolds, en cada gota de este colorante de Reynolds se colocaron 3 rejillas, previamente teñidas con el acetato de uranilo, por un tiempo de 15 minutos; y en seguida se procedió a lavar las rejillas con en el primer colorante. De esta manera las rejillas quedan listas para ser observadas al microscopio electrónico.

3.10 Extracción de ADN de Okra

Para efectuar la extracción de ADN de la okra, se aplicaron dos métodos diferentes, el de PlantDNAzol y el método de Dellaporta (Dellaporta *et al* 1983), con la finalidad de determinar, cual de ellos producía un ADN de mejor calidad, pureza y mayor rendimiento; el ADN se utilizaría posteriormente para la prueba de PCR.

3.10.1 Método de PlantDNAzol

El método de PlantDNAzol desarrollado por Ausubel *et al.* (1990) se utilizó para extracción del ADN de la okra, el cual involucra los siguientes pasos. Extracción de ADN, precipitación de ADN, lavado de ADN y solubilización, una vez purificado el ADN se cuantificó el ADN por medio de un espectrometro, y se determinó su calidad en un gel de agarosa al 0.8%.

Para realizar esto, se tomaron 5 muestras de okra enferma procedente de Iguala y 5 muestras de plantas sanas (sin síntomas). Se pesaron 0.2 g de cada muestra, se molieron en un mortero con nitrógeno líquido y con una espátula se transfirió el polvo homogeneizado a un tubo de centrifuga; se le adicionaron 600 µl de plantDNAzol se agitó y se dejó reposando durante 5 minutos a una temperatura ambiente (22-24 °C). Posteriormente se eliminó el plantDNAzol y se adicionaron 600 µL de cloroformo con la finalidad de eliminar algunos pigmentos y el tubo se transfirió a un agitador durante 5 minutos, adicionalmente se mezcló vigorosamente por inversión y se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 rpm (16, 000 g). Después se extrajo la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf. Posteriormente se agregaron 450 µL de etanol absoluto a cada tubo para precipitar el ADN, el contenido se mezcló por inversión durante 6-8 veces para centrifugar nuevamente a 4 minutos a 10 000 rpm (8,160 g), se eliminó el sobrenadante.

Otra etapa de la extracción de ADN requiere de un lavado. Para preparar una solución de lavado se mezcla el plantDNAzol con 0.75 volúmenes de etanol absoluto, se adicionan 600 µL de la solución de lavado por tubo y se centrifugó 2 minutos a 10 000 rpm (8,160 g). Se eliminó por decantación el sobrenadante y se adicionó nuevamente etanol al 70%, se centrifugó de nuevo 2 minutos a 10 000 rpm (8,160 g).

Con la finalidad de eliminar el exceso de etanol y secar la pastilla de ADN los tubos se incubaron en una estufa a 37° C durante 10 minutos.

Para la solubilización del ADN, se adicionó amortiguador TE¹ (600 µL por tubo).

3.10.2 Método de Dellaporta

Para el aislamiento de ADN de alto peso molecular se utilizó el método de Dellaporta *et al.* 1983

¹ TE compuesto de (Tris-HCL 10 m M a pH 8.0, EDTA 1 mM)

Minipreparación

Se tomaron 8 muestras de tejido vegetal de okra, 5 con síntomas de mosaico amarillo y 3 provenientes de hojas sanas.

Se pesaron 0.2 g de tejido por cada muestra y se pulverizaron con nitrógeno líquido con ayuda de un mortero estéril, el tejido se transfirió a tubos Eppendorf. A cada tubo se le adicionó amortiguador de Dellaporta² y 2-b mercaptoetanol, y se incubó a 65° C durante 10 minutos.

Después se adicionaron 200 µL de acetato de potasio por cada tubo y se incubó durante 60 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm (11, 750 g) durante 15 minutos.

Se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, donde previamente se había puesto isopropanol, paso seguido los tubos se incuban en el congelador a -20 °C durante 30 minutos.

Cumplido este tiempo las muestras se centrifugaron 10 minutos a 14 000 rpm (16 000 g) y se elimina el sobrenadante. A continuación se adiciona etanol 70% para eliminar algunas sales que hubieran quedado adheridas a la pastilla de ADN y se centrifugaron nuevamente durante 5 minutos a 10 000 rpm (8160 g). Una vez realizado lo anterior el sobrenadante se eliminó por decantación y los tubos se incubaron a 37 °C durante 15 minutos para eliminar el exceso de etanol.

Finalmente a las muestras se les agregó amortiguador TE para que el ADN se solubilización del ADN y posteriormente se realizara la solubilización del ADN efectuar la correspondiente cuantificación.

Maxipreparación

Con la finalidad de obtener una cantidad apropiada de ADN se realizó un "maxi prep" con el método de Dellaporta con la finalidad de purificar una cantidad

² El amortiguador de Dellaporta está constituido por 100 m M de Tris, 50 m M de EDTA pH 8, 500 m M de Cloruro de Sodio y SDS al 1.3%.

mayor de ADN, pero ahora adaptado a un volumen mayor de tejido para obtener una mayor cantidad de ADN en comparación con la minipreparación. Para llevar a cabo el protocolo de Dellaporta se tomaron 2 muestras de plantas sanas obtenidas en el invernadero y 3 muestras de plantas enfermas que expresaban síntomas de mosaicos amarillos y nervaduras engrosadas procedentes de Iguala Guerrero.

La cantidad de tejido que fue pesado es como sigue: plantas sanas 1.5 gramos de cada una de las dos muestras, asimismo de las plantas enfermas se tomo 0.67, 1.2 y 1,9 gramos por muestra de cada planta.

Posteriormente el material fresco se maceró con nitrógeno líquido y se agrega 20 ml de amortiguador de extracción (Tris -HCl 100 m M a pH 8, EDTA 50 m M, Na Cl 500 m M, SDS al 1.3 %) y después se aplicó 30 ml 2-mercaptoetanol 10. mM.

Paso seguido se incubó a 65 ° C por 10 minutos. Se adicionó acetato de potasio 5 M y se incubó 60 minutos en hielo.

A continuación se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 8000 g y el sobrenadante obtenido se filtró con un sistema de filtración a base de embudos y suavitela, el filtrado fue obtenido en un microtubo conteniendo 600 µL de isopropanol preenfriado para después ser incubado a 4° C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos mediante el alcohol en el que fueron depositados.

Después se colectó la madeja de ADN con un gancho de vidrio y se le adicionó un 700 µL de solución para diluir (Tris-HCl 50 m M a pH 8, EDTA 10 m M).

Cumplido lo anterior después de disolver la pastilla mediante un movimiento ascendente-descendente suave, se agregó 4 µl de una enzima ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 1.5 horas y posteriormente se detuvo la reacción con 75 µL de acetato de sodio 3 M y 500 µL de isopropanol frío, y se procedió a precipitar a 4° C durante 2 horas.

Posteriormente se eliminó el isopropanol se seco la pastilla en la estufa a 37 °C durante una hora y se lavó con etanol al 70 %. Se agita y se elimina el etanol

para después de que se ha secado bien el mismo, se procede a resuspender la pastilla en amortiguador TE a un pH de 8 (TRIS HCl 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM) y así se conserva en el refrigerador a una temperatura de 4 ° C. Para después cuantificar el ADN en el espectrometro, y correrlo en un gel para observar su integridad.

3.10.3 Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Para los dos métodos aplicados en la purificación del ADN se realizó la cuantificación por espectrofotometría como se indica:

Se preparó una dilución 1:10 del ADN en agua destilada; y se leyó en un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda Bio 2.1 UV/VIS a una longitud de onda 260 nm con la que se determinó la cantidad de ADN presente en la muestra así como la relación A_{260}/A_{280} que permitió estimar la pureza de la muestra.

La cuantificación de la concentración de ADN se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen total en la celda}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

$$\text{Mg. de ADN} = (\text{Factor de dilución}) (50)(\text{lectura a 260 nm del espectrómetro})$$

La concentración estará dada en $\mu\text{g/mL}$. La pureza de ADN se determina dividiendo la lectura 280 nm. Un ADN de buena pureza deberá dar un valor entre 1.8 y 2.0.

3.10.4. Electroforesis

Con la finalidad de verificar que el ADN purificado era de alto peso molecular se sometieron a electroforesis 1 μg de la dilución de AND. Para esto se preparó un gel de agarosa al 0.8% en donde se pesaron 0.56 g de agarosa que se disolvieron en 70 mL de amortiguador TAE³ 1 X, y una vez disuelta la agarosa en el horno de microondas, se enfrió y se vertió a un portageles que contenía al peine de acrílico apropiado.

Una vez que el gel hubo solidificado, se retiró el peine.

Paso seguido se “carga” el gel con el volumen de ADN correspondiente, más un décimo de amortiguador de carga⁴, una vez realizado esto se procedió a correr la electroforesis a 80 vol, después se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos, para poder observar las bandas en un transluminador de luz ultravioleta.

Para utilizar el ADN en la tecnología de la PCR es necesario eliminar el ARN de cada muestra, para lo cual se adiciona la enzima ARNasa a una concentración de 10 mg/mL, se incubó a 37°C durante 60 minutos para permitir que se desarrolle la reacción. Posteriormente, para detener la reacción se adiciona 6 µL acetato de sodio 3 M y 36 µL de isopropanol y se introduce en un congelador a -20 °C durante 8 minutos para después centrifugar a 10 000 rpm (8,160 g).

3.11 Identificación de secuencias específicas de la cadena viral

3.11.1 Estandarización de la reacción de PCR

3.11.1.1 Estandarización de la concentración de ADN

Para la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa fue necesario considerar la cantidad óptima de cada uno de los diferentes reactantes: la concentración de ADN, concentración de enzima Taq polimerasa, la concentración de cloruro de magnesio y la concentración de cada uno de los iniciadores a usar. Para este caso, solo se estandarizaron los tres primeros, ya que los iniciadores se utilizaron de acuerdo a lo referido por Rojas. (1993).

Para establecer la cantidad óptima de del ADN viral se diseñó el experimento referido en el cuadro 4, en donde se utilizaron desde 20 hasta 100 ng de ADN, manteniendo constantes el cloruro de magnesio (2 µM), la enzima Taq polimerasa (1 unidad) y los iniciadores (2 µM).

³ TAE esta compuesto de TRIS base 40 mM , acetato de sodio 5 mM, Na₂ , EDTA 1 mM a pH 7.5

⁴ El amortiguador de carga esta constituido por: TRIS 50 mM, EDTA 5 mM, glicerol 25 %, Xileno cianol 2 mg/mL, azul de bromofenol 2 mg/mL en agua bidestilada.

Para realizar la estandarización de la PCR se consideró la muestra número 9 de las extracciones de ADN. Esta muestra que tenía una concentración de 0.823 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, de este tubo se tomó un 1 μl que se diluyó en 81 μL de agua destilada para que quedara en una concentración final de 10 ng / μL .

Los iniciadores PAL1c 1978 y PAR1-c496 se mandaron a sintetizar a un laboratorio en Estados Unidos de la casa comercial GIBCO y correspondieron a las secuencias reportadas en la revisión de literatura, las especificaciones se pueden observar en el anexo. Dichos iniciadores se disolvieron en amortiguador de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para obtener una concentración aceptable y medible con la puntas disponibles en el laboratorio, los iniciadores se disolvieron de tal manera que al tomar 0.25 μl resultara en una concentración 0.2 μM que es la utilizada para la PCR.

Se requirió de amortiguador 10 X para PCR de la casa comercial GIBCO. Los dNTPs utilizados fueron de la casa comercial GIBCO a una concentración de 500 μM .

El cloruro de magnesio (MgCl) también de la misma casa comercial viene a una concentración de 50 mM.

La enzima utilizada Taq polimerasa viene a 5 unidades por microlitro y fue de la casa comercial Perkin Elmer.

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para estandarizar la concentración de ADN.

Tubo	$\text{H}_2\text{O bi}$	dNTPs	amortig	MgCl_2	Iniciadores		Enzima	ADN ¹
					PAL1c 1978	PAR1-c496		
1	10,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	0
2	9,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	1
3	8,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	2
4	7,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	3
5	6,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	4
6	5,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	5

Notas: Las cantidades están dadas en microlitros

ADN extraído de planta enferma de okra colectada en Iguala.

El tubo 1 se utiliza como blanco ya que no contiene ADN.

En los tubos del 2-6 se probaron las cantidades de 20,40,60,80 y 100 ng de ADN de tejido vegetal de planta enferma.

El procedimiento consintió en colocar en tubos de 500 µl nuevos y estériles las cantidades especificadas en el cuadro anterior en el orden siguiente: agua bidestilada, dNTPs, amortiguador, cloruro de magnesio, iniciadores, ADN, enzima y que entre todo resultó en un volumen final de 25 µl, finalmente se cubrió la mezcla con 25 µl aceite mineral esteril (SIGMA), se centrifugó brevemente la mezcla y se procedió a llevar a cabo la reacción en un termociclador Perkin Elmer con el programa siguiente:

Un periodo de pre-desnaturalización de 2 minutos a 94 °C, después un ciclo a 94 ° C durante 1 minuto para la desnaturalización, seguido de 1 minuto a 50 grados centígrados para alineamiento de los iniciadores y 3 minutos a 72 °C para extensión. En este programa se repitieron 30 ciclos.

3.11.1.2 Estandarización de la enzima

Para realizar la estandarización de la enzima se siguió el mismo procedimiento de la estandarización del ADN, solo que ahora se varió la cantidad de enzima desde 0, 0.5,1.5, y 2 unidades por reacción. Las cantidades de cada reactivo se presentan en el cuadro siguiente:

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la estandarización de la enzima taq polimerasa.

Tubo	H ₂ O bi	dNTPs	amorti.	MgCl ₂	Iniciadores		Enzima taq polimerasa	ADN
					PALic 1978	PAR1- c496		
1	10,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0	20 ng
2	9,9	10	2,5	1	0,25	0,25	0,1	20 ng
3	9,8	10	2,5	1	0,25	0,25	0,2	20 ng
4	9,7	10	2,5	1	0,25	0,25	0,3	20 ng
5	9,6	10	2,5	1	0,25	0,25	0,4	20 ng

Nota:La de ADN se determinó por la estandarización previa.
Las cantidades están dadas en microlitros

3.11.1.3 Estandarización de la concentración de cloruro de magnesio

El cloruro de magnesio se estandarizó de la misma manera que lo anterior, solo que ahora se varió la cantidad de cloruro de magnesio 0, 0.5, 1.0 y 2.0 μM . Estas cantidades se consideraron en función de lo reportado previamente en la literatura (Rojas 1993). Las cantidades de cada reactivo se presentan en el cuadro siguiente:

Cuadro 6. Mezcla de reacción para estandarizar el cloruro de magnesio.

Tubo	H ₂ O	DNTPs	amorti.	MgCl ₂	Iniciadores		Enzima	ADN
					PALic 1978	PAR1- c496		
							taq polimerasa	
1	10.8	10	2.5	0	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng
2	10.3	10	2.5	0.5	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng
3	9.8	10	2.5	1	0.25	0.25	0.2 (1U)	20 ng
4	8.8	10	2.5	2	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng

Nota: Las cantidades están dadas en microlitros

La concentración de ADN se determinó por la estandarización previa.

3.11.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la reacción definitiva de PCR se consideraron muestras de ADN de planta sana de okra, una muestra de planta de okra enferma, una muestra de jitomate como testigo positivo para geminivirus proporcionada por el Departamento de Biotecnología de Sanidad Vegetal⁵, una muestra de ADN de maíz de planta como testigo negativo, ya que se considera al maíz, puesto que este cultivo no es hospedero del virus de la okra. En esta reacción definitiva se consideró el cuadro siguiente:

⁵ A cargo del Biólogo Jorge Aguilar.

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la prueba de PCR definitiva.

Tubo	H ₂ O	DNTPs	amorti.	MgCl ₂	Iniciadores		Enzima taq polimerasa	ADN
					PALlc 1978	PAR1- c496		
1 a	9.8	10	2.5	1	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng
1 b	9.7	10	2.5	1	0.25	0.25	0.3 (1.5 U)	20 ng
2 a	9.8	10	2.5	1	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng
2 b	9.7	10	2.5	1	0.25	0.25	0.3 (1.5 U)	20 ng
3 a	9.8	10	2.5	1	0.25	0.25	0.2 (1 U)	20 ng
3 b	9.7	10	2.5	1	0.25	0.25	0.3 (1.5 U)	20 ng
4 a	9.8	10	2.5	1	0.25	0.25	0.2 (1.5 U)	20 ng
4 b	9.7	10	2.5	1	0.25	0.25	0.3 (1.5 U)	20 ng

Nota: Las cantidades están dadas en microlitros

La concentración de ADN se determinó por la estandarización previa.

1 a y b = okra enferma

2 a y b = jitomate control (+)

3 a y b = okra sana

4 a y b = maíz control (-)

3.11.3 Electroforesis de los productos de la PCR

Para observar el tamaño de los fragmentos sintetizados por la estandarización de los diferentes reactantes así como de la prueba final de PCR, prepararon geles de agarosa al 1.2 % y se corrieron electroforesis, bajo el procedimiento indicado anteriormente, para estimar el peso molecular de los fragmentos sintetizados en cada caso, se utilizó un marcador de peso molecular de la casa comercial GIBCO, de 100 pb para la estandarización de los reactantes y 1000 pb para la prueba definitiva de PCR.

3.12 Experimentos de campo

Simultáneamente a las pruebas de laboratorio planteadas a este trabajo, en los campos experimentales de la Escuela Superior de Agricultura de Iguala Gro. se realizaban investigaciones de campo, con la finalidad de evaluar diferentes tratamientos para el control y aislamiento del cultivo de los vectores del virus. Los resultados de estos experimentos ya fueron presentados en la revisión de literatura.

IV. RESULTADOS

4.1 Colecta en campo.

Por cada salida de colecta se tomaron de 10 a 15 plantas enfermas, con los síntomas que se mencionan enseguida, estas plantas se utilizaron para las pruebas de transmisión y pruebas de laboratorio.

Los insectos que se colectaron fueron mosquitas blancas y áfidos, para las moscas se capturan vivas aproximadamente 50-100 por cada jaula de vaso que sobrevivieron el traslado sólo la primera colecta.

Con relación a los áfidos se colectaron con todo y la planta hospedante, no se realizó alguna aproximación de la cantidad de áfidos colectados, únicamente nos percatábamos que se encontrara por lo menos una colonia en el hospedante. Estos insectos posteriormente serían identificados.

4.2 Síntomas en campo.

En campo se encontraron síntomas de la enfermedad en las hojas consistiendo de mosaicos amarillos con acortamiento de la lámina foliar (figura 2) y mosaicos color blanco, ambos síntomas se observan tanto en hojas maduras como en brotes tiernos, que se manifiestan en la okra desde el estado de plántula. Los frutos presentan un moteado clorótico (figura 3), siendo este el problema principal que afecta a los productores, ya que en el momento del empaque, genera pérdidas debido a las estrictas normas de calidad de los productos destinados a la exportación.

4.3 Evaluación de la incidencia de la enfermedad en campo

Se realizó la evaluación de la incidencia de la enfermedad en tres cultivos diferentes de la zona productora de Iguala, obteniendo los siguientes resultados.



Figura 2. Mosaicos amarillos

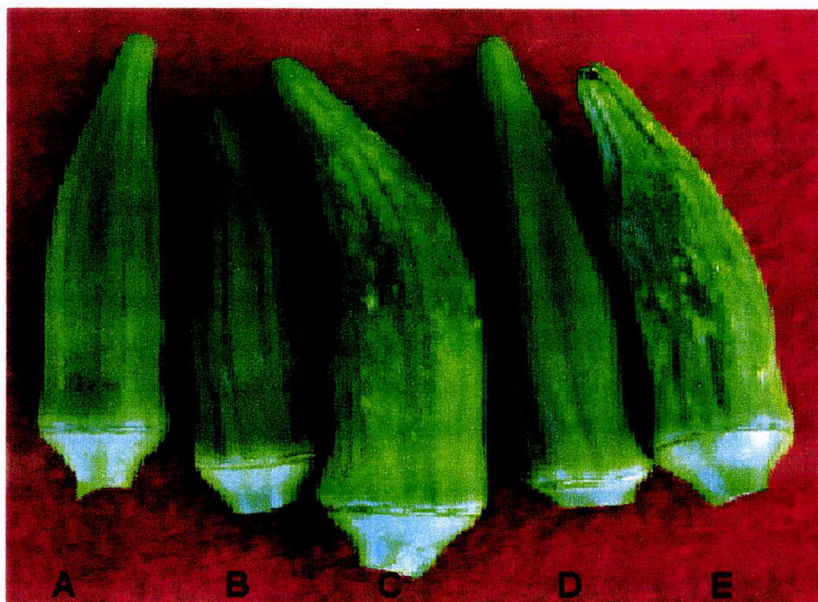


Figura 3. Síntomas de mosaico clorótico en frutos de okra (C y E).

Cuadro 8. Incidencia de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra en Iguala, Gro.

Sitio	Edad de las plantas (días después de la siembra)	Incidencia (%)
1	50	6
2	50	8.5
3	60	46

La incidencia esta por la definición de un cuadrante al azar de 20 m² donde se obtuvo la relación de las plantas presentes en total y a las plantas enfermas, debido al tipo de siembra mateado casi chorrillo.

En el tercer sitio se presentó una intensidad 13 veces mayor, puesto que el cultivo tiene mayor edad y la enfermedad tiende a incrementarse con esta de acuerdo a las observaciones de Pereyda *et al* (1998). Las incidencias encontradas coinciden con las reportadas por los mismos autores citados en sus evaluaciones de campo en la región.

Adicionalmente en el sitio número tres, dado que se encontraba en periodo de cosecha, fue posible evaluar la incidencia del moteado clorótico en frutos, característico de la infección viral, resultando una incidencia de 14 frutos con síntomas en una muestra aleatoria de 100 frutos, analizando este dato al parecer no es significativo, sin embargo es de las incidencias en fruto menores que se han reportado, (comunicación personal Pereyda 1999)¹. Además, este sitio presenta la particularidad de que fue establecido en asociación con maíz, lo que seguramente repercutió en la dispersión de la enfermedad en el espacio, aunque esta apreciación requiere de una comprobación.

4.3 Pruebas de ELISA.

Dados los síntomas de la enfermedad, se sospecho que esta pudiera ser ocasionada por un virus del grupo de los geminivirus; en este sentido, se realizaron dos pruebas de ELISA con un antisuero policlonal para geminivirus, las cuales indicaron resultados negativos (anexo 3).

¹ Ing. Juan Pereyda Hernández. Universidad Autónoma del Estado de Guerrero.

4.4 Pruebas de transmisión

4.4.1 Transmisión mecánica.

Con los amortiguadores de fosfato de potasio 1.0 M pH 7.0 y 7.8 no fue posible la transmisión mecánica del virus que ocasiona los mosaicos amarillos en ninguno de los múltiples intentos (cuadro 8).

Cuadro 9. Especies que se incluyeron en la prueba de transmisión mecánica para el virus que induce síntomas de mosaicos amarillo en la okra.

Familia	Especie	Número de plantas infectadas
Chenopodiaceas	<i>Chenopodium album</i>	negativo
	<i>Ch. Amaranticolor</i>	negativo
	<i>Chenopodium quinoa</i>	negativo
Cucurbitiaceas	<i>Cucurbita pepo</i>	negativo
Solanaceas	<i>Nicotiana benthamiana</i>	negativo
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	negativo
	<i>Nicotiana occidentalis</i>	negativo
	<i>Nicotiana rustica</i>	negativo
	<i>Capsicum annum</i>	negativo
	<i>Datura stramonion</i>	negativo
	<i>Lycopersicon esculentus</i>	negativo
Fabaceas	<i>Phaseolus vulgaris</i>	negativo
	<i>Glicine max</i>	negativo
Malvaceas	<i>Abelmoschus esculentus</i>	negativo
	<i>Gossypium hirsutum</i>	negativo
	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	negativo

4.4.1.1. Aislamiento de un virus críptico.

Los virus crípticos no inducen síntomas en las plantas, también se les denomina virus latentes Agrios, (1991). Mediante pruebas de transmisión mecánicas fue posible detectar un virus latente que se presenta en la planta de okra en combinación con el virus que induce los síntomas de mosaico amarillo y acortamiento de hojas.

El procedimiento que se siguió para obtenerlo fue la inoculación mecánica de plantas de okra sanas con plantas enfermas posteriormente se tomaron estas plantas asintomáticas con las que se inocularon plantas de tabaco *Nicotiana occidentalis*, esta planta de tabaco si manifestó síntomas del virus que consistieron en necrosamiento de las hojas y muerte de la planta; con respecto

a lo anterior fue posible establecer un esquema de transmisión que se puede observar en la figura 4.

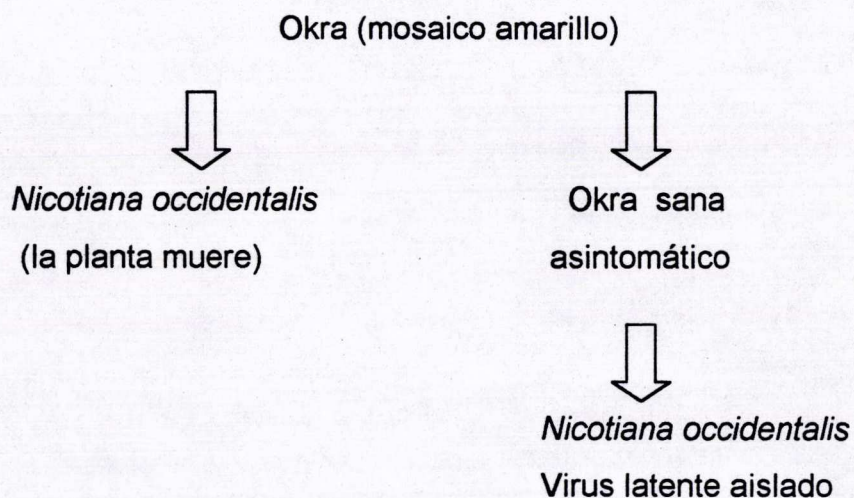


Figura 4. Esquema de transmisión mecánica para el aislamiento de un virus críptico

4.4.2 Transmisión por semilla.

No se presentaron síntomas en ninguna planta proveniente de las semillas obtenidas de planta sana cuadro 10.

De la segunda prueba con semillas provenientes de plantas enfermas, los resultados fueron: que todas las semillas germinaron normalmente y no manifestaron el síntoma de amarillamiento en la hoja típicos de la enfermedad.

4.4.3 Transmisión por injerto.

Esta prueba resultó en una planta enferma con síntoma de mosaicos y acortamientos de las hojas idénticos a la planta enferma. Las 7 plantas restantes no presentaron síntomas (cuadro 10), el período de incubación fue de 30 días. Lo anterior nos indica que es posible reproducir los síntomas mediante transmisiones por injertos.

4.4.4 Pruebas de transmisión por vectores

4.4.4.1 Prueba de transmisión por mosquitas blancas.

De las dos ocasiones que se realizó la prueba de transmisión por mosquitas blancas, se observaron tres plantas con síntomas de mosaico amarillo en las hojas (cuadro 10), lo que indica que es muy probable que el virus se transmita por mosquitas blancas.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de transmisión del virus que induce síntomas de amarillamiento en la okra.

Transmisión	Plantas inoculadas	(+)/ ₁	(-)	Frecuencia
Injerto	8	1	7	1/8
Semilla	200 *	0	200	0/200
Mosquitas blancas	10	3	7	3/10
Mecánica	25	0		0/25

Semillas sembradas.

‡ Síntomas idénticos de amarillamiento de las hojas y reducción de lamina foliar.

4.4.4.1.2 Identificación de mosquitas blancas.

De los 50 montajes realizados para identificar a las mosquitas blancas, se identificó la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en todos los casos, las características que permiten identificar esta especie son las papilas submarginales y orificio vasiforme circular; en la figura 5 y 6 es posible observar las estructuras que nos permitieron llegar a este resultado.

4.4.4.2 Pruebas de transmisión por áfidos.

Se estableció una colonia de áfidos procedentes de Iguala Guerrero, de donde se tomaron áfidos de color verde y áfidos de color amarillo para inocular plantas de okra sanas, estos insectos se mantuvieron durante dos días en contacto, utilizando para tal fin jaulas de vaso; a los 30 días se observaron dos plantas enfermas, una presentó síntomas de enchinamiento de hojas y otra con acortamiento de lamina foliar. De estas plantas infectadas vía vectores se realizó, una transmisión mecánica (figura 7) a *Nicotiana occidentalis* y *Datura stramonium* con la finalidad de observar los síntomas. La especie de áfido que transmitió el virus fue *Myzus persicae*. Otra cuestión interesante, es que algunos áfidos venían parásitados con una avispa *Afidius spp*, lo cual por una parte redujo la eficiencia de la transmisión en el invernadero y por otra parte puede ser importante su consideración como mecanismo de control natural de áfidos en la zona de Iguala.

4.4.4.2 Identificación de áfidos.

En todas las colectas de áfidos realizadas en la zona de estudio se identificó al *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* (posiblemente el *Myzus persicae* esté implicado en la transmisión de un virus, pero esto requiere confirmación y su debida caracterización).

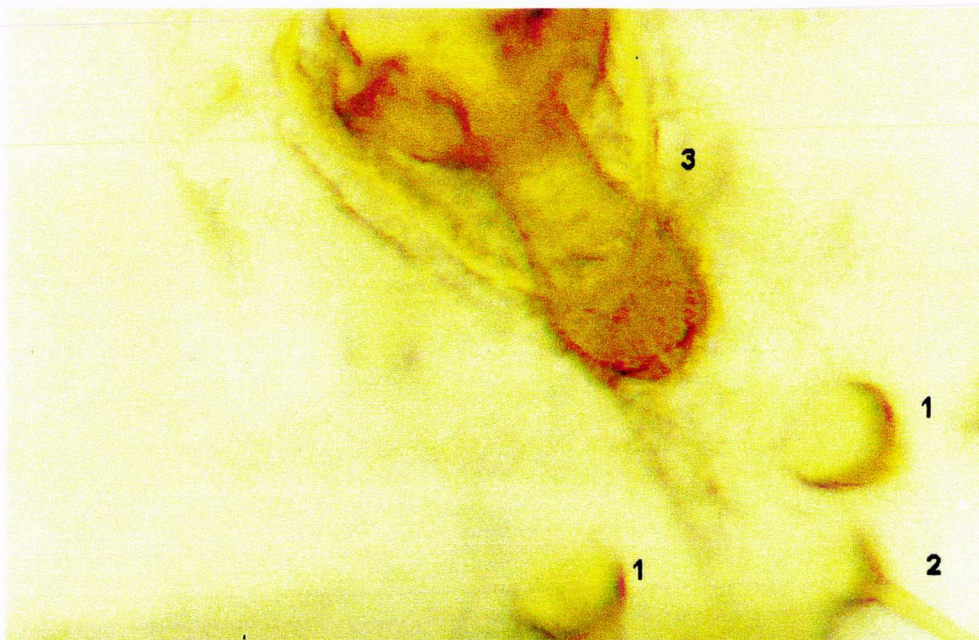


Figura 5. Micrografía a 40X de pupas de *Trialeorodes vaporariorum*, mostrando, papilas submarginales evidentes (1), setas caudales (2) y orificio vasiforme (3).

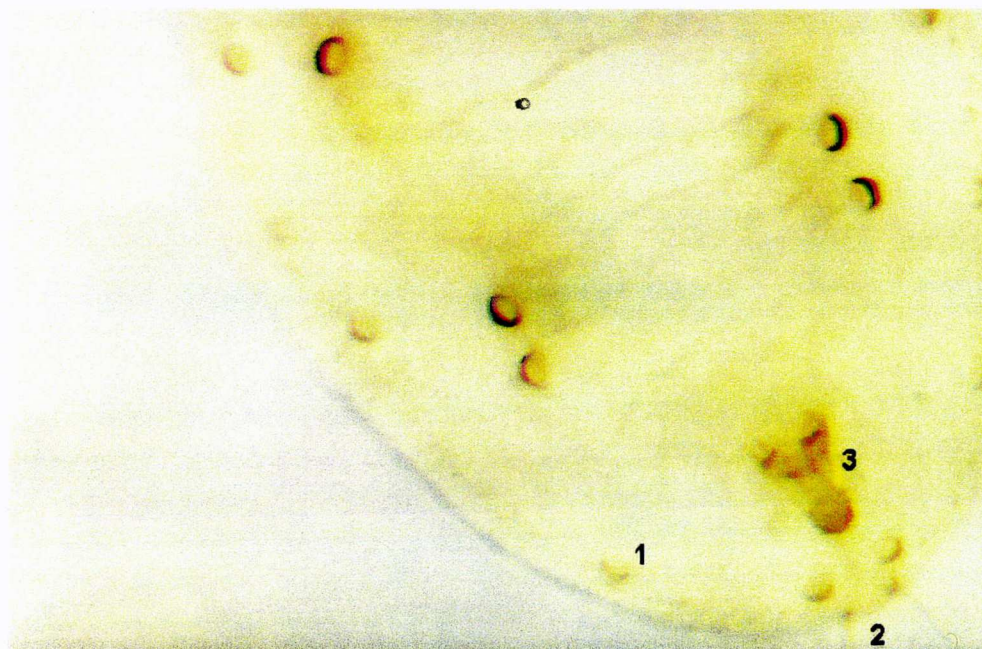


Figura 6. Micrografía a 40X de pupas de *Trialeorodes vaporariorum* mostrando papilas submarginales evidentes (1), seta caudal (2) y orificio basiforme (3).

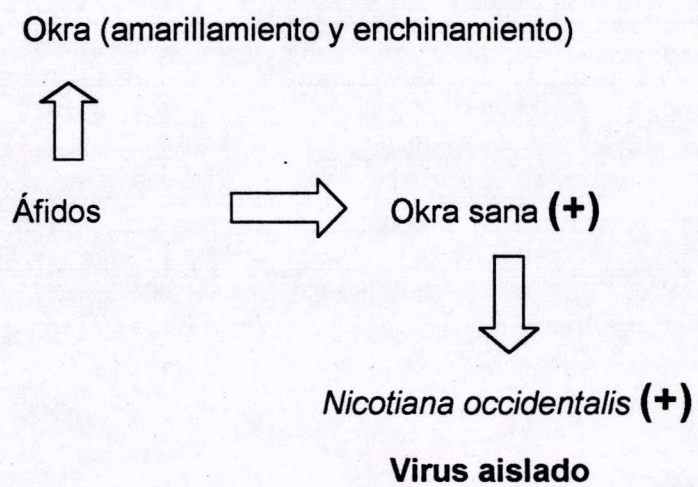


Figura 7. Esquema de transmisión por vectores

4.5.2.1 Aislamiento de un virus transmitido por áfidos

La prueba de transmisión por áfidos resultó en el aislamiento de un virus que ocasionó los siguientes síntomas (cuadro 11)

Cuadro 11. Especies susceptibles por inoculación mecánica a partir del virus transmitido por áfidos aislado en *Nicotiana occidentalis*.

Especie	Inoculación	Síntomas
<i>Nicotiana occidentalis</i>	positivo	Lesiones locales, nervaduras color morado, las hojas basales necrosadas, las nervaduras necrosadas parcialmente.
<i>Datura stramonium</i>	positivo	Enchinamiento de hojas, enrollamiento enanismo, no lesiones locales.
<i>Nicotiana rustica</i>	positivo	Detenimiento del crecimiento, enchinamiento de hojas nuevas.
<i>Capsicum annum</i>	positivo	Hojas flácidas, mosaicos amarillos tenues, hojas deformes con muescas.
<i>Chenopodium album</i>	positivo	lesiones locales hojas apicales chicas.
<i>Capsicum annuum</i>	positivo	Hojas flácidas, mosaicos amarillos tenues, hojas deformes con muescas.
<i>Nicotiana glutinosa</i>	positivo	Hojas basales amarillentas lesiones locales.

4.5 Inclusiones virales

Se encontraron inclusiones virales en células epidérmicas de tipo amorfas muy cercanas al núcleo y agrupadas en par como lo cita Christie *et al* 1977, en lo que ellos denominan estructuras "ropey", es decir con una estructura muy delgada que las separa; esto se puede observar mejor en la figura 7 y 8. Para este caso el mejor colorante fue el azure A.

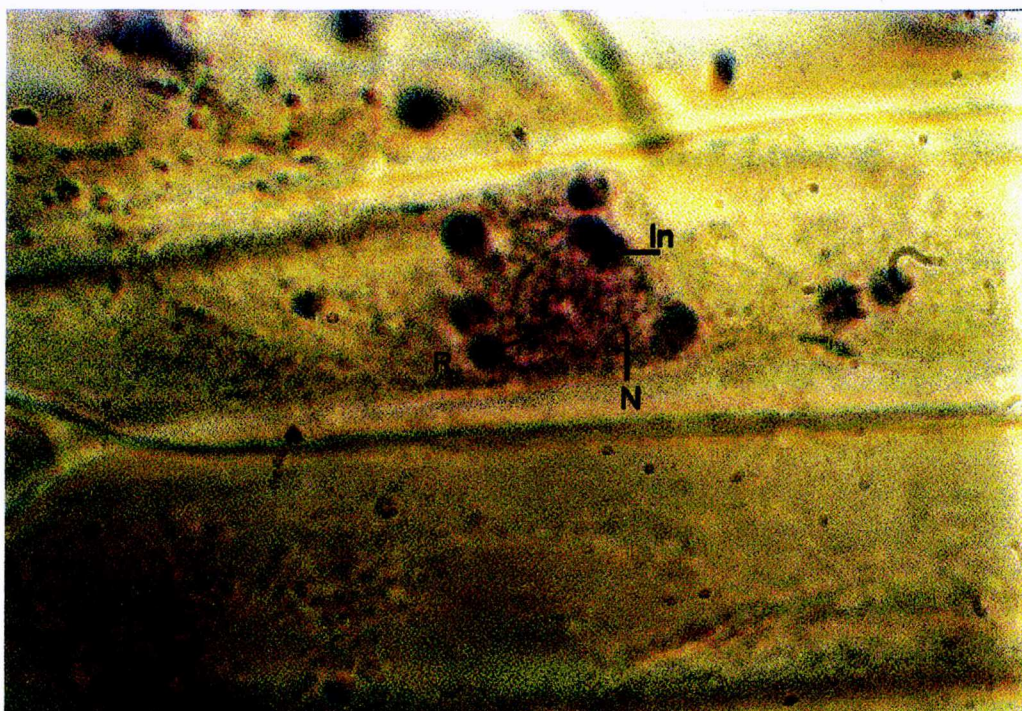


Figura 8. Inclusiones virales amorfas en células epidermicas de okra.
N = Núcleo; In = inclusion; R= estructura "ropey".

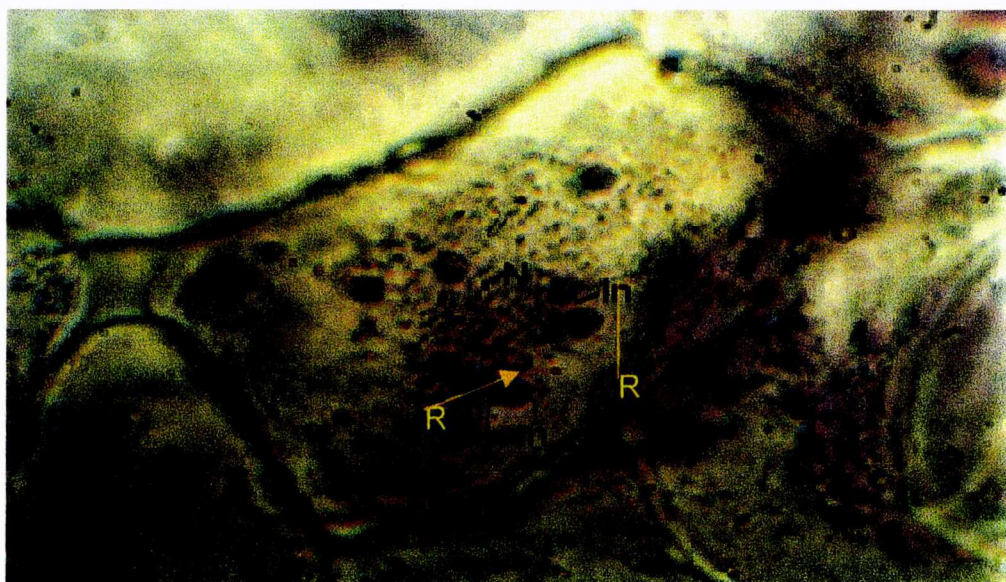


Figura 9. Inclusiones amorfas en células epidermicas de okra **N = Núcleo;**
In = Inclusión, R = estructura "ropey".

4.6. Microscopia electrónica

De tres intentos realizados con microcortes ultradelgados, observados en el microscopio electrónico no fue posible encontrar las partículas virales, inclusiones citoplasmáticas o los efectos de una infección viral.

4.7.2 Tinción negativa.

De los cuatro intentos efectuados en el microscopio electrónico donde se utilizó sabia de hojas infectada con el virus y empleando como contrastantes al acetato de uranilo y al ácido fosfotúngstico, no fue posible observar las partículas virales.

En las observaciones al microscopio electrónico de un supuesto virus clarificado y la preparación teñida con acetato de uranilo no fue posible encontrar partículas semejantes a virus.

En otra observación donde el acetato de uranilo se preparó al 1 % y se adicionó a la preparación EDTA pH 7.0, tampoco fue posible observar partículas.

4.8 Extracción de ADN de okra

4.8.1 Concentración de ADN.

Al aplicar los dos métodos de extracción de ADN se obtuvo una mayor concentración promedio de ADN en el método de Dellaporta con relación al método de PlanDNAzol como se observa en el cuadro 12. Sin embargo ambos métodos funcionan de manera muy eficiente.

Cuadro 12. Concentraciones de ADN obtenidas por el método de PlanDNAzol y de Dellaporta para plantas sanas y enfermas de okra.

Muestra	Concentración de ADN de ($\mu\text{g/ml}$)			
	Plant DNAzol		Dellaporta	
	planta sana	Planta enferma	planta sana	planta enferma
1	0.539	0.669	0.652	1.163
2	0.613	0.988	1.57	0.634
3	0.671	0.884	1.52	0.887
4	0.587	0.655	-	0.348
5	0.599	0.517	-	0.680

4.8.2 Pureza del ADN.

La pureza del ADN está determinada por la relación A_{260}/A_{280} siendo un nivel óptimo que el valor obtenido se encuentre en 1.8 a 2.0. lamentablemente las lecturas del espectrómetro obtenidas para este parámetro resultaron deficientes por efectos de error en la calibración. Sin embargo, al analizar el ADN en el gel de agarosa, se pudo apreciar una banda de alto peso molecular libre de proteínas.

4.8.3 Calidad

De acuerdo con la observación del ADN extraído por los dos métodos, en un gel de agarosa 0.8%, se decidió utilizar el método de Dellaporta por producir un ADN con mejores parámetros, no obstante con el método de PlantDNAzol se obtuvo buena calidad del ADN.

4.9 Extracción definitiva de ADN

Una vez definido el método de Dellaporta como el método de extracción de ADN para la okra, se realizó una extracción de ADN definitiva, y se cuantificó los datos se pueden ver en el cuadro 13.

Cuadro 13. Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280}

Muestra	Concentración de ADN ug/ul	relación A_{260}/A_{280}
Planta sana 1	0.205	1.701 *
Planta sana 2	0.260	1.540 *
Planta enferma 1	1.240	1.311 *
Planta enferma 2	0.319	1.352 *
Planta enferma 3	0.823	1.519 *

Del cuadro anterior se puede observar que las concentraciones y pureza del ADN son aceptables, sin embargo en las lecturas de la relación A_{260}/A_{280} se aprecia ligera contaminación debido posiblemente a la presencia de solventes o fenoles. Sin embargo bajo estas condiciones se utilizó el ADN para la técnica de la PCR.

Con relación a la calidad del ADN, estimada por una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % se obtuvo buena integridad del ADN al observarse una sola banda, sin presencia de bandas con barridos características de un ADN fragmentado.

4.10 Estandarización de la PCR.

Los productos de la PCR con la utilización de los iniciadores degenerados (PALv1978 y PAR1c 496) fueron fragmentos de ADN de un peso molecular de 1.1 Kb (Figura 12), lo cual es un indicativo de que se logró amplificar ADN de un geminivirus que esta presente en tejido foliar enfermo de la okra. Este resultado fue posible observarlo con cada una de las variantes de las condiciones de la estandarización de la reacción de la PCR.

9.10.1 Estandarización de la concentración de ADN

Con base a la figura 12 se tiene que con las concentraciones experimentadas (0, 20, 40, 60, 80, 100 ng de ADN) se amplificó perfectamente un fragmento correspondiente con una parte de secuencia común de geminivirus que se encuentra presente en el tejido de la okra con excepción del blanco o testigo (0 ng de ADN) el cual no contenía ADN.

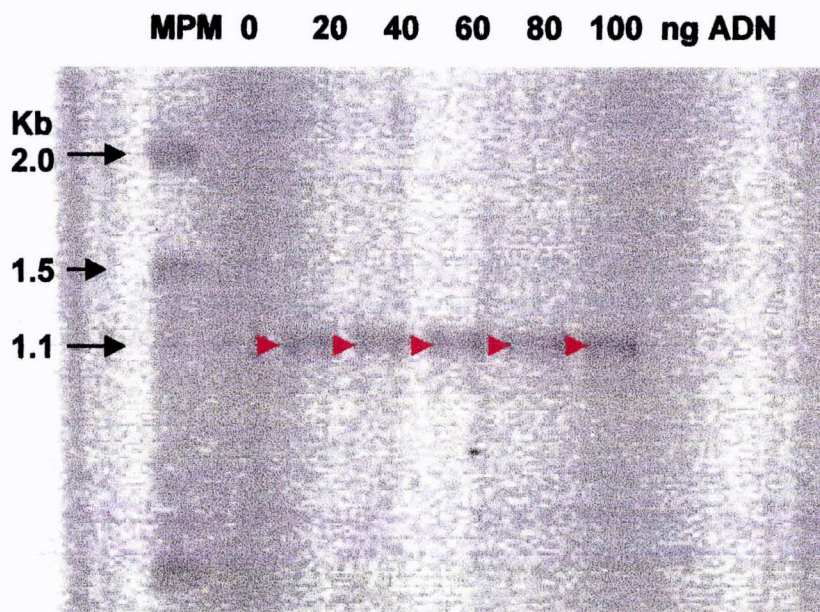


Figura 9 Gel de electroforesis de los fragmentos amplificados por la PCR para estandarizar la concentración de ADN proveniente de una planta de okra enferma.

4.10.2 Estandarización de la enzima Taq polimerasa.

Para estandarizar cantidad de enzima Taq polimerasa, se probaron 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 unidades de enzima por reacción, los resultado obtenidos indican que el fragmento del geminivirus se amplifica eficientemente con todas las concentraciones de la enzima evaluada, considerando 20 ng del ADN, lo mencionado se puede observar en la figura 13. En función de este resultado, se consideró utilizar 1 U por reacción en los experimentos consecutivos.

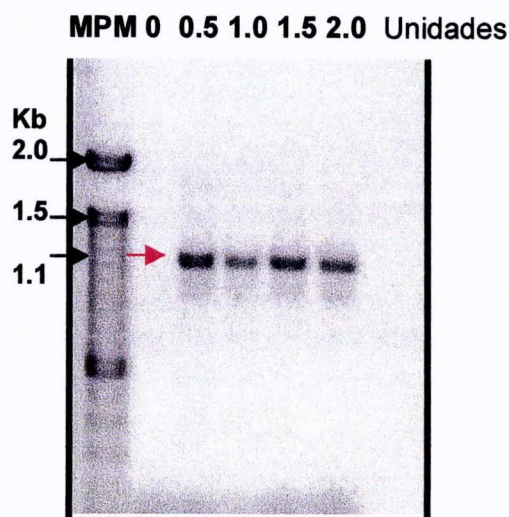


Figura 10. Gel de electroforesis para la estandarización la cantidad óptima de enzima Taq polimerasa.

4.10. 3 Estandarización de la concentración de cloruro de magnesio.

De las concentraciones de cloruro de magnesio que se experimentaron en la reacción de PCR (0.5, 1.0, 2.0 μM) la concentración de 1 μM fue la única que permitió la amplificación de la banda correspondiente al ADN viral, cantidad que fue considerada con la reacción definitiva.

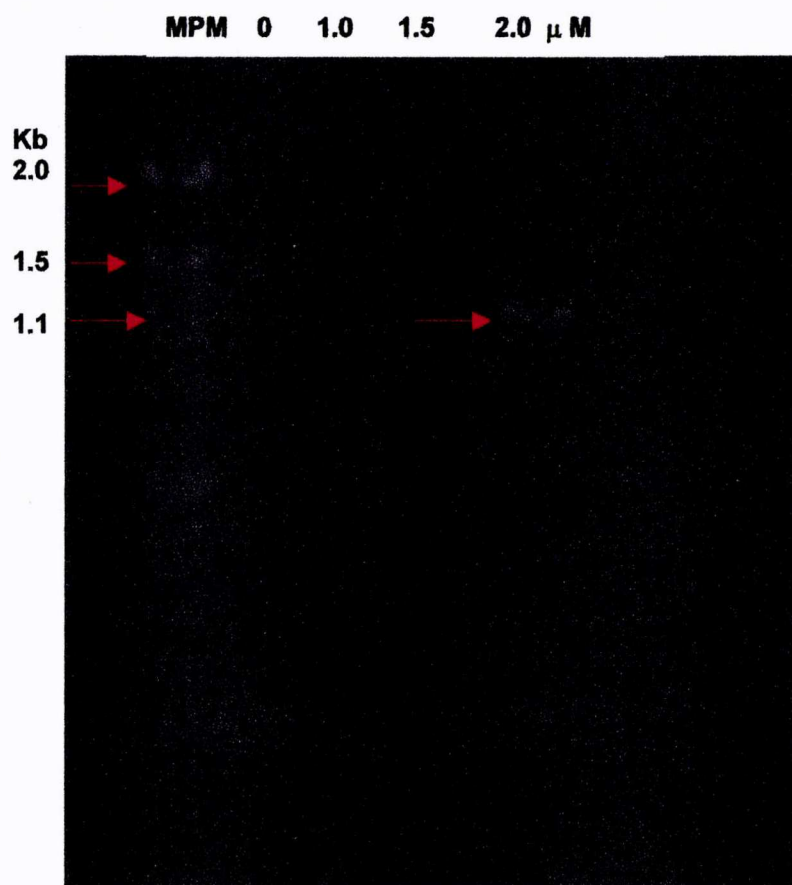


Figura 11. Gel electroforesis para la estandarización de la concentración óptima de cloruro de magnesio.

4.11 Prueba de PCR definitiva.

En la figura 12 se observa el gel de electroforesis donde se aprecian los productos de la PCR que consiste de una banda bastante visible de 1.1 kb en las muestras de planta enferma de okra (carril 1 y 2) y del control positivo (tomate *Lycopersicon esculentum* procedente de Morelos) (carril 3 y 4). En cambio para la muestra de ADN de maíz (testigo negativo) no se amplificó ninguna banda (7 y 8). Para el carril 5 y 6 que consistió de una muestra de okra sana se alcanza a observar una banda muy tenue de un peso molecular de 1.1 kb, lo que nos puede indicar la alta capacidad de la prueba de PCR para detectar cantidades mínimas de ADN viral que pueden estar presentes incluso en plantas que no manifiestan síntomas.

Lo anterior nos corrobora la presencia de un geminivirus atacando a la okra en Iguala Gro. y confirma la presencia de geminivirus en plantas de tomate procedente de Morelos así como una baja concentración del ADN viral que puede estar presente en plantas sanas.

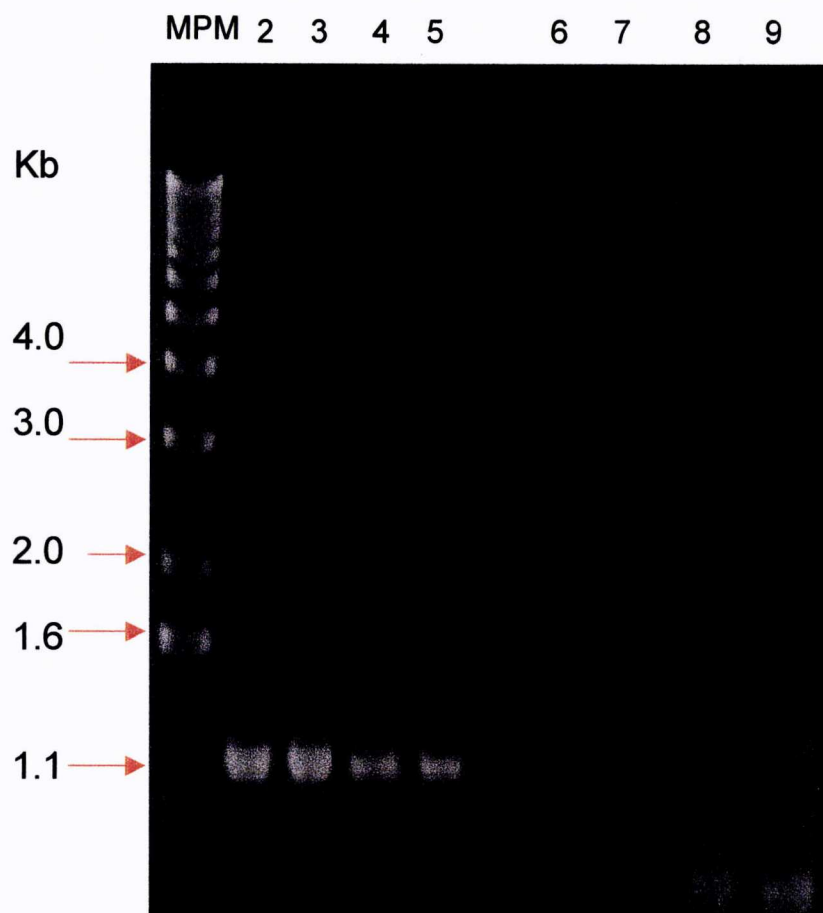


Figura 12. Productos de la PCR, marcador de peso molecular, carril 2 y 3 planta de okra enferma, carril 4 y 5 planta de jitomate (testigo positivo), carril 6 y 7 okra sana, carril 8 y 9 testigo negativo.

4.11 Observaciones de campo.

Simultáneamente a la realización de la fase de laboratorio en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Colegio Superior de Agricultura de Guerrero se realizaban experimentos de campo donde aplicaban diversos tratamientos con la finalidad de controlar la incidencia de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra, dichos tratamientos consistieron de aplicaciones de agroquímicos para controlar posibles vectores, aplicaciones de aceites con las misma finalidad, y la utilización de microtules de agribon (figura 13), los resultados ya fueron presentados en la revisión de literatura.



Figura 13. Experimento de campo para la evaluación de la incidencia de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra en Iguala, Gro. 1998. Cortesía del Dr. Sergio Ayvar Serna. Colegio Superior de Agricultura de Guerrero.

V. DISCUSION

En este apartado se analizará algunos aspectos sobresalientes en cuanto a los resultados obtenidos.

5.1 Síntomas

Con relación a la sintomatología de la enfermedad, estos corresponden a los síntomas típicos de las enfermedades ocasionadas por virus del grupo de los geminivirus, como se sabe estos virus se alojan en el floema donde son capaces de alterar las funciones del mismo como: obtención y movimiento de nutrientes de una parte de la planta a otra, inducen fragmentación de cloroplastos y formación de vesículas grandes, las alteraciones de los cloroplastos pueden derivar en síntomas de clorosis, así como retraso del crecimiento, como lo ha reportado Xiong (1999a), lo que explica la expresión de los mosaicos amarillos característicos de esta enfermedad.

Para el caso del okra mosaic tymovirus Fami (1976), señala la observación de síntomas de diferentes tipos de mosaicos amarillo brillante en la mayoría de las variedades de okra y un moteado clorótico en el fruto. Estos síntomas al parecer, se parecen a los síntomas encontrados en campo, pero el virus en estudio, no se transmite mecánicamente como lo hace el okra mosaic tymovirus.

5.2 Evaluación de la incidencia de la enfermedad en campo.

En realidad esta información correspondiente con la incidencia puede ser muy variable, ya que está en función de las condiciones climáticas prevalecientes, la época de siembra, la incidencia de los vectores y del manejo del cultivo. No obstante, con base a los recorridos de campo fue posible apreciar la gravedad del problema para la zona del Valle de Iguala, ya que en ocasiones la incidencia en las parcelas alcanzaba hasta un 100%. El daño principalmente en las parcelas fue mayor donde la fecha de

desarrollo vegetativo coincidía con los meses de marzo, abril, mayo ó junio en donde periodos de altas temperaturas, sequía y baja humedad relativas (anexo 2) son condiciones ideales para el desarrollo acelerado de los vectores en Iguala; como lo han mencionado, Mohanty y Basu (1990), Mazumber et al 1996; y Sing (1990). Por lo tanto merece atención la trascendencia que presenta conocer con precisión la incidencia de la enfermedad y poder correlacionarla con otras variables como el clima, la época de siembra, las variedades, el manejo y la presencia de los vectores sin dejar de considerar el criterio económico, determinante para este cultivo. Bajo este contexto es importante, entender como se comporta la incidencia a lo largo del tiempo. Situación que fue considerada por Murthy y Reddy (1992), cuando señalan que las aplicaciones de insecticidas tempranos son importantes para prevenir la infección viral durante los primeros 20 días después de la siembra. Asimismo Nath et al (1995), señala que existe una correlación negativa ($r = - 0.84$) entre la incidencia de la enfermedad y el rendimiento del fruto, este reporte corrobora lo observado en campo con relación a la incidencia y al rendimiento de fruto en el sitio 3.

En la zona productora se considera que la incidencia de la enfermedad ocurre a partir del primer corte de la okra, es decir, después de que entran los cortadores a cosechar. Con respecto a lo anterior, se llegó a manejar que la enfermedad era transmitida mecánicamente, sin embargo, se demostró que no es así; pero es posible suponer la incidencia puede deberse posiblemente a la suspensión de las aplicaciones de agroquímicos justo alguno días antes, de la cosecha y con el efecto del movimiento de las plantas por los cortadores, se favorece el desarrollo de los vectores y su dispersión.

5.3 Incidencia de las malezas en el campo.

Se observaron en campo al lo menos dos especies diferentes de maleza, que expresaban síntomas semejantes a los del problema de estudio; *Sida spp* y *Eufhorbia heterophylla* L. Estas especies fueron incluidas en la prueba de ELISA sin resultados significativos para un antisuero de geminivirus (solo una muestra resultó positiva). En cuanto a una maleza del género *Sida spp*,

se tiene que esta pertenece a la familia malvaceae y presenta síntomas muy parecidos al mosaico amarillo de la okra.

5.4 Pruebas de Elisa

La técnica de ELISA es muy eficiente para el diagnóstico de virus que ya han sido debidamente caracterizados. Sin embargo las pruebas que se realizaron indicaron resultados negativos, lo cual, pudo haberse a la inespecificidad del antisuero para este virus en estudio. Posiblemente se requieran de otras estrategias de detección, como la denominada "TAS-ELISA" que consiste de un triple sandwich de anticuerpos, tal y como lo realizaron Harrison *et al.* (1997) para el virus del acortamiento de las hojas del algodón.

5.5 Pruebas de transmisión

5.5.1 Transmisión mecánica:

La consideración de que el virus no se pudo transmitir mecánicamente, nos indica que este virus se encuentra confinado al floema y se requiere de algún procedimiento para su introducción hasta este tejido. Con respecto a esto, Gill y Rataul (1990), encontraron que solo algunos insectos vectores de virus como *Myzus persicae* y *Bemisia tabaci* alcanzan el floema con el estilete durante el período de alimentación.

Como se mencionó en la parte 2.2.1 de la revisión de literatura, una característica importante de los geminivirus es su carencia de transmisión mecánica, características que coinciden con lo encontrado para el virus en estudio, no obstante Honda *et al* (1983), reportan haber logrado transmitir mecánicamente algunos virus del grupo de los geminivirus, sin embargo en los ensayos que se realizaron no fue posible coincidir con este autor.

Con relación a característica de la transmisión mecánica, se coincide con la señalado por Brunt *et al* (1996), para el virus mosaico de las venas amarillas de la okra (BYNMY) y para el virus okra leaf-curl bigeminivirus. Y no se concuerda con lo reportado por Givor *et al* (1972) con relación al virus okra mosaic tymovirus.

5.5.2 Transmisión por semilla

En las diferentes pruebas para la transmisión por semilla, no se lograron reproducir los síntomas de la enfermedad, esta característica concuerda con lo reportado para el virus mosaico de las venas amarillas de la okra, okra leaf-curl bigeminivirus y para el okra mosaic tymovirus que tienen la característica de no transmitirse por esta vía.

De acuerdo a lo señalado por Fami (1976), en relación que las semillas provenientes de plantas enfermas son generalmente no viables con respecto a semillas de plantas sanas; se realizaron algunas pruebas de germinación con semillas de este tipo, y se encontró que son perfectamente viables en un 100%, por lo tanto no se concuerda con lo indicado por este autor. Sin embargo no es recomendable la utilización proveniente de plantas infectadas por algún virus.

5.5.3 Transmisión por injerto

Normalmente los virus y algunos otros organismos se transmiten por injerto. En los resultados que se obtuvieron en invernadero, fue posible reproducir los síntomas de la enfermedad del virus del amarillamiento de la hoja de la okra por medio del injerto de yemas provenientes de plantas infectadas sobre plantas sanas de okra; Lo cual concuerda con lo reportado por Brunt *et al* (1996). Para otros virus que afectan a la okra, como es el caso el virus mosaico de las venas amarillas y para el okra leaf-cul bigeminivirus y por Givord *et al* (1973) para el okra mosaic tymovirus.

5.5.4 Aislamiento de un virus críptico.

En campo es común la ocurrencia de infecciones de varios virus simultáneamente Agrios (1991), en las pruebas realizadas de transmisión mecánica, fue posible aislar un virus latente a partir de plantas provenientes del campo, que expresaban síntomas de amarillamiento; lamentablemente por lo limitado del tiempo para realizar una maestría, no fue posible caracterizar completamente a este virus. En este sentido es pertinente señalar, que esta prueba es perfectamente repetible.

5.6 Identificación de vectores.

5.6.1 Identificación de mosquita blanca.

Con base a las pruebas de transmisión realizadas en el invernadero es posible asociar a la especie *Trialeorodes vaporariorum* (Westwood) como probable vector de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra, lo cual coincide con lo reportado por Velázquez y Rodríguez (1990) para la enfermedad del chino del tomate, ocasionada por un geminivirus y que se transmite también por la misma especie.

5.6.2 Identificación de áfidos.

De las observaciones realizadas, se obtuvieron a dos especies de áfidos presentes en el área de Iguala Guerrero, *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*, la primera constituye una amenaza potencial hacia el cultivo de la okra por su alta eficiencia en la transmisión de virus fitopatógenos. Aunado a lo anterior en la región de Iguala, se ha logrado identificar a machos del género *Myzus* (comunicación personal Peña¹ 1998); esta situación permite suponer que los áfidos pueden realizar todo su ciclo completo y generar descendencia procedente de reproducciones sexuales con una mayor capacidad de supervivencia.

Con respecto a la especie *Aphis gossypii* no se cuenta con reportes de que esté relacionado con la transmisión de virus en la okra, solo se ha señalado por Givord (1973), que ésta especie no es transmisora del okra mosaic tymovirus. Por otra parte Gill y Rataul (1990) reportaron, que *Aphis gossypii* al momento de alimentarse introduce su estilete hasta la epidermis de la hoja, con lo cual la transmisión del virus se ve limitada solo a aquellos que también se pueden transmitir mecánicamente, por lo tanto se descarta a esta especie como probable vector de la enfermedad del amarillamiento de la okra. No obstante, en la literatura se reporta la transmisión del virus enanismo amarillo del maíz, virus mosaico amarillo zucchini y el sunflower yellow blotch, Alvizo (1997).

¹ Peña M. R. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

5.7 Pruebas de transmisión por vectores

5.7.1 Mosquitas blancas

La probabilidad de que el vector de la enfermedad del amarillamiento de la hoja de la okra es alta, ya que solo se realizó una prueba debido principalmente a las características inherentes a la especie, las condiciones del transporte de los especímenes colectados en campo, la lejanía de la zona de estudio, así como la diferencia climática entre la zona donde se colectaron las mosquitas y la zona donde se realizaron las pruebas de transmisión, ya que esto influyó en el malogro del segundo intento de transmisión, puesto que las mosquitas blancas se murieron durante el transporte.

Con base a la revisión de literatura sobre mosquita blanca, se sabe que las especies *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*, están muy asociadas a la transmisión de virus del tipo geminivirus (incluso *Bemisia tabaci* también se ha reportado como transmisora de virus del grupo de los closterovirus). Para la okra se reporta a *Bemisia tabaci* como transmisora del virus mosaico de las venas amarillas, okra leaf-curl geminivirus y posiblemente también el okra mosaic tymovirus Brunt (1996), y Givori (1973).

En cambio *Trialeurodes vaporariorum* se ha identificado como vector del virus chino del tomate y beet pseudo yellows. Velázquez (1990), Alvizo (1997).

El hecho de que las mosquitas blancas pudieran ser el vector de la enfermedad presenta un significado intrínseco, puesto que implica que se debe implementar medidas de control integrales para hacer un manejo de la plaga, bajo el esquema de la protección al ambiente.

Por otra parte, al considerar los datos de la revisión bibliográfica, con relación a las características de transmisión del vector *Bemisia tabaci* para el virus mosaico de las venas amarillas, se sugiere para sucesivas investigaciones, considerar pruebas de transmisión con mayor detalle, donde se incluyan ensayos como el periodo de inoculación, periodo mínimo de alimentación para adquisición, periodo de retención, periodo de alimentación mínimo para inoculación

5.7.2 Pruebas de transmisión por áfidos:

La presencia de áfidos de la especie *Myzus persicae* en las parcelas de okra en Iguala Guerrero, constituye un riesgo constante debido a su alta eficiencia para transmitir virus fitopatógenos; bajo las condiciones de invernadero se logró aislar un virus que se transmitió por esta especie y posteriormente por inoculación mecánica a las especies indicadas en el cuadro 5. Lamentablemente por las limitaciones de tiempo no fue posible demostrar la repetitividad de las pruebas y de esta forma realizar otras pruebas adicionales con este virus y su vector.

5.8 Inclusiones vírales.

De las inclusiones vírales encontradas en las células epidérmicas de hojas de okra con síntomas de amarillamiento y procedentes de campo, se puede suponer que estas corresponden a otro virus diferente al que ocasiona los síntomas de amarillamiento en la okra, ya que de acuerdo a Chrstie (1977), se parecen más a las inclusiones inducidas por los potyvirus. A diferencia de las encontradas en tejido del floema las cuales coinciden con lo reportado Christie *et al* (1986).

Cuadro 15. Características generales de los virus que afectan a la okra con relación al virus en estudio.

Características	Virus			
	BYVMV *	OKLCV *	OkMV *	Amarillamiento de la hoja 1
Grupo	Geminivirus	Geminivirus	Tymivirus	Geminivirus
Genoma	ADN	ADN	ARN cs	ADN
Síntomas	Aclaramiento de nervaduras, engrosamiento, los frutos y hojas reducen su crecimiento	Engrosamiento de nervaduras, acortamiento de hojas, moteados cloróticos en los frutos	Mosaicos amarillo brillante, clorosis de nervaduras, nervaduras y bandeado, frutos con moteados cloróticos.	Mosaicos amarillos en hojas y frutos, acortamiento de hojas,
Transmisión				
Vector	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	Coleopteros <i>Podagrica spp</i> , <i>Chrysolagria cuprina</i> <i>Nisotra dileta</i> , <i>Ootheca mutabilis</i> <i>Medythia quaterna</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
Semilla	No	no	no	no
Injerto	Si	si	si	si
Mecánica	No	no	si	no
Distribución	India	Nigeria y Sudan	Nigeria	México (Gro y Mor.)

* Descripción de Brunt et al (1996).

BYVMV = Virus mosaico amarillo de las venas de la okra.

OKLCV = Okra leaf-curl geminivirus.

OkMV = Okra mosaic tymovirus.

1 Virus problema.

5.9 Gama de hospedantes con un virus transmitido por los áfidos.

En realidad es muy complejo estudiar a dos o tres virus diferentes asociados a una planta no obstante, es posible analizar algunos supuestos a partir de la información que se logró obtener por medio de los ensayos realizados en el invernadero.

En primera instancia a través de áfidos se logró aislar un virus que induce síntomas de reducción y deformación de lamina foliar en la okra y a su vez fue transmitido mecánicamente a *Nicotiana occidentalis*, para después recuperar los síntomas en okra.

Los síntomas expresados en *Nicotiana occidentalis* cuadro 11, son muy semejantes a los síntomas ocasionados por un virus del grupo de los potyvirus, así mismo como las inclusiones vírales en células epidérmicas

encontradas en la okra según Christie (1997). Por otra parte independientemente del grupo al cual puede pertenecer el virus aislado, algo que no se puede dejar de lado, es que en el área de Iguala se pueden encontrar más de un virus diferente asociado al cultivo de la okra.

5.10. Microscopia electrónica

5.10.1 Técnica de cortes ultradelgado

En la revisión de literatura sólo se cuenta con un reporte de Fami (1976), que indica la utilización de la técnica de cortes ultra delgados de tejidos, para plántulas sanas y enfermas de okra que fueron examinadas bajo el microscopio electrónico, no se encontraron partículas semejantes a virus, situación que se repitió para esta investigación.

5.10.2 Tinción negativa

Desgraciadamente no fue posible observar alguna partícula semejante a virus a través del microscopio electrónico, posiblemente debido a que la concentración del virus sea muy baja en el momento que se colectaron las muestras para realizar las preparaciones, o posiblemente porque el virus no se transmite por medio de la savia como lo indicó Fami (1976).

Con relación a la preparación que contenía al virus clarificado, tal vez no se logró ver alguna partícula porque solo se realizó un intento de clarificación y se tomó muy poco tejido vegetal infectado (5 gramos).

Otra consideración importante, la savia de la okra presenta la cualidad de ser muy viscosa y es probable que esto haya incidido en la tinción de las partículas virales.

4.11 Extracción de ADN de la okra

El método de Dellaporta (1983), permitió extraer ADN de la okra de buenas características para que después pueda ser utilizado en pruebas de PCR.

4.12 Estandarización de la PCR.

Fue posible coincidir con lo reportado por Rojas (1993), con relación a la utilidad de los iniciadores degenerados para el diagnóstico de geminivirus ya

que funcionaron eficientemente para la síntesis de secuencias de ADN viral. La consideración más importante de la prueba de PCR es que resultó positiva para geminivirus en el ADN extraído de hojas de okra con síntomas de amarillamiento.

4.13 Prueba definitiva de PCR

Como se reportó en la revisión de literatura, en este trabajo se coincide con los autores Epaminondas *et al* (1994), Rojas *et al* (1993) y Veilleux (1999), en cuanto a la alta especificidad y eficiencia de la prueba de PCR. Esto pudo ser demostrado con los resultados obtenidos e incluso se logró demostrar la alta capacidad de detección de la prueba, ya que fue capaz de detectar cantidades mínimas de ADN viral presentes incluso en tejido que se había considerado sano.

VI. CONCLUSIONES

En este primer acercamiento al tema de la virosis de la okra y en función de las condiciones bajo las cuales se realizó la presente investigación fue posible obtener las siguientes conclusiones:

1. El agente causal de la enfermedad amarillamiento de la okra en Guerrero, corresponde a un virus fitopatógeno y en particular por sus características se aproxima a ser del grupo de los geminivirus. Con la consideración de que no fue posible establecer el nombre del virus a nivel de especie, y más bien no corresponde con los virus reportados anteriormente.
2. Las características que se lograron demostrar son las siguientes: virus no transmitido por inoculación mecánica, se transmite por injerto, por mosquitas blancas de la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y no se transmite por semilla.
3. Se logró aislar un potyvirus asociado al geminivirus del amarillamiento de la okra, el cual induce inclusiones amorfas en células epidérmicas, se transmite mecánicamente y por áfidos.
4. En la zona de Iguala, Guerrero es posible encontrar por lo menos dos virus fitopatógenos en conjunto con el geminivirus del amarillamiento de la okra, uno de ellos es el críptico y otro es el potyvirus.
5. Los fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa fueron de un peso molecular de 1.1 Kb, lo que indica que corresponde a parte de la secuencia de un geminivirus.
6. La reacción en cadena de la polimerasa para la identificación del fragmento de 1.1 Kb del geminivirus de la okra se realiza mejor con una concentración de ADN desde 20 hasta 100 ng, con 1 unidades de enzima taq polimerasa y con 2 μ M de cloruro de magnesio.

RECOMENDACIONES

- Una de las consideraciones muy importantes, es el momento óptimo para la colecta del material vegetativo, de acuerdo a las pruebas realizadas, el mejor momento para colectar las plantas con síntomas de enfermedad es cuando el mosaico amarillo inicia su expresión en las hojas, aproximadamente a los 40-50 días después de la siembra durante el periodo de siembra realizado en los meses de febrero-marzo.
- Es imperativo la realización en campo de investigaciones en materia de epidemiología de la enfermedad, y con especial énfasis a la incidencia de la enfermedad y los vectores. Ya que estos resultados permitirán establecer los momentos más adecuados para aplicar una protección al cultivo y saber el momento óptimo para suspenderla.
- Dada la rigurosidad que se requiere para hacer una caracterización de un virus fitopatógeno, es indispensable que a esta investigación se le dé seguimiento, ya que han quedado algunas interrogantes que por las circunstancias en que se desarrollo esta tesis, así como lo extenso del proyecto y lo limitado del tiempo, no fue posible responder.
- Un componente importante y que no fue posible incluir en esta investigación, es el papel que juegan la malezas que rodean el cultivo, por lo cual, consideramos pertinente que en lo sucesivo se realicen investigaciones, con la finalidad de determinar el grado de influencia que tiene el agroecosistema en la enfermedad del amarillamiento.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Agrios N.G. 1991. Fitopatología. Ed Limusa. México D.F. 530 p.
- Alvizo, V.,H., F. 1998. Compendio de apuntes del curso de Virus Fitopatógenos. Capítulo de Vectores. Maestría Protección Vegetal. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. Mex. S/P
- Ayvar, S.S., A. C. Michel A. 1998. Efecto de la aplicación de insecticidas y cubierta flotante (Agribon), sobre la incidencia del amarillamiento de la okra. (*Abelmoschus esculentus* M.) Foro de Información y Análisis Superior Agropecuario del estado de Guerrero. Mimeografo. s/p.
- Ausubel, F.M., R Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann and K Struhl. 1990. In Current Protocols in Molecular Biology, vol 3, p A 3, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
- Bhagat A.P. B.L. Yadav, Y. Prasad. 1997. Management of bhindi yellow vein mosaic virus disease by insecticides. Journal of Mycology and Plant Pathology. 27: 2, 215-216.
- Bhagat A.P. B.P. Yadav .1997. Biochemical changes in BYVMV infected leaves of bhindi. Journal of Mycology and Plant Pathology. 27: 1, 94-95.
- Borad V.K., S.N. Puri, J.K. Brown, G.D. Jr Butler. 1993. Relationship of *Bemisia tabaci* population density and yellow vein mosaic disease incidence in okra. Pest Management and Economic Zoology. 1: 1, 14-19.
- Borah R.K., P.D. Nath. 1995. Evaluation of an insecticide schedule on the incidence of white fly, *Bemisia tabaci* (Genn.) and yellow vein mosaic in okra. Regional Agricultural Research Station, Assam Agricultural University, Diphu 782 460, India. Indian Journal of Virology. 11: 2, 65-67.
- Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs, L Watson,. and E.J Zurcher,. (eds.) 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Christie, R. G., & J. R. Edwardson. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Institute of Food and Agricultural Agricultura Sciences. Universidad of Florida, Gainesville.
- Christie, R. G., N.J. Ko, B. W Falk. E. Hiebert, R. Lastra, J. Bird,. and K.S. Kim.

1986. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusions bodies. *Phytopathology* 76:124-126.

Córdova I. 1999. Estrategias usadas en el diagnóstico de fitoplasmas. Memorias del Curso Detección E identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnica moleculares. Centro Nacional de Referencia. SAGAR. México D.F. s/p.

Dehal G., R.B. Thapa, D.R. Dangol.1993.Epidemics of geminivirus diseases, monitoring and partial characterization of their suspected whitefly vector *Bemisia tabaci* in Nepal. Institute of Agriculture and Animal Science. 14: 55-68.

Dellaporta S.L., J. Wood, J.B. Hicks.1983. A plant DNA minipreparation: Versión II. *Plant Molecular Reporter*: 1, 4 19-21.

Dhankhar B.S.1996. Varsha Uphar: a virus-resistant okra. College of Agriculture. CCS Haryana Agricultural University, Hisar 125004, India.TVIS-Newsletter. 1: 2, 17.

Fami L. A. 1976. Mosaic Virus and Leaf Curl in Nigeria. *PANS* 22 (4) 474-478.

García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. México D.F. 252 p.

Givord L. By. 1973. Identificación, purificación and some properties of a mosaic virus of okra (*Hibiscus esculentus*). *Annals Applied Biology* 74 259-370.

Gómez A. G. O. 1999. Transcritasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP), Memorias del Curso Detección E identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnica moleculares. Centro Nacional de Referencia. SAGAR. México D.F. s/p.

Jaramillo V. J. 1993. El cultivo de las okra. Programa Hortalizas y Frutales CNIA. Palmira, Colombia. 15 p.

Harrison B.D., Y.L. Liu, S. Khalid, S. Hameed, G.W. Otim-Nape, D.J. Robinson. 1997. Detection and relationships of cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology*. 130: 1, 61-75.

Harper, K., and R, Creamer. 1995. Hybridization detection of insect-transmitted

- plant viruses with digoxigenin-labeled probes. *Plant Disease* 79:563-667.
- Martin H. J. 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (*Homoptera, Aleyrodidae*). *Tropical Pest Management* 33 (4) 298-322. p 23 o 299-322.
- Mazumder N, U. Borthakur, D. Choudhury. 1996. Incidence of yellow vein mosaic virus of bhindi (*Abelmoschus esculentus* L., Moench) in relation to cultivar and vector population under different sowing dates. *Indian Journal of Virology*. 12: 2, 137-141.
- Mohapatra A. K, P.S Nath, A.K. Chowdhury. 1995. Incidence of yellow vein mosaic virus of okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) under field conditions. *Journal of Mycopathological Research*. 33: 2, 99-103.
- Nagar S, T. J. Pedersen, K. M. Carrick, L. Hanley-Bowdoin and D. A. Robertson. 1995. Geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7 (6). 705-719.
- Nath P., A. K Saikia. 1995. Influence of sowing time on yellow vein mosaic virus of okra.
- Nazeer-Ahmed, M.R. Thakur, K.L. Bajaj, S.S. Cheema, N. Ahmed. 1994. Biochemical basis of resistance to yellow vein mosaic virus in okra. *Plant Disease Research*. 9: 1, 20-25.
- Navot, N., M. Zeidan, E. Pichersky, D. Zamir, and H. Czosnek. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction to Amplify Tomato Yellow Leaf Curl Virus DNA from Infected Plants and Viruliferous Whiteflies. *Phytopathology* 82:1199-1202.
- Paplomatas E. J. V. P., Y.M. Huo., A. O. Noueiry and R.L. Gilbertson. 1994. Molecular Characterization of a New Sap-Transmissible Bipartite Genoma Geminivirus Infecting Tomatoes in Mexico. *Phytopathology* 84: 1215-1224.
- Pereyda H. U.A. Ayvar, S.S. Noriega C. D. H. 1998. Diagnóstico y experimentación de estrategias contra el amarillamiento de la okra *Abelmoschus esculentus* M. Tercer Foro Estatal de Estudios sobre Guerrero. Chilpancingo, Gro. s/p.
- Peña M. R., M. R. Bujanos .1992. Especies de áfidos (Homoptera:Aphidide) que dañan hortalizas. In Manejo Fitosanitario de Hortalizas en México. Anaya R. S. Bautista M. N. Dominguez R. B. Eds. 1992. Centro de

Entomología y Acarología. Chapingo Mex.

- Rojas, M. R., R. J. Gilbertson, 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.
- Romero C. S. 1994. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Mex. 343 p.
- SAGAR 1997. Anuario Estadístico de la producción Agropecuaria de los Estados Unidos Mexicanos. Centro de Estadística Agropecuaria. Tomo I 721 p.
- Sánchez B., J., N. 1985. El cultivo de la okra (*Hibiscus esculentus* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. 95 p.
- Sangar-RBS. 1997. Field reaction of bhindi varieties to yellow vein mosaic virus. *Indian Journal of Virology*. 13: 2, 131-134; 12 ref.
- Sannigrahi A.K., K. Choudhury. 1998. Evaluation of okra cultivars for yield and resistance to yellow vein mosaic virus in Assam. *Environment and Ecology*, 16: 1, 238-239.
- Sarma U.C., K. Bhagabati, C.R. Sarkar. 1995. Effect of yellow vein mosaic virus infection on some chemical constituents of bhendi (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Indian Journal of Virology*. 11: 1, 81-83.
- Silva R. L., Gomez A, O. Martinez S. J. 1998. La reacción en cadena de la polimerasa como herramienta de diagnóstico en virología vegetal. *Fitopatologia* 34:1 14-21.
- Singh, -S.J. 1990. Etiology and epidemiology of whitefly-transmitted virus diseases of okra in India. Indian Institute of Horticultural Research, Bangalore 560 089, India. *Plant Disease Research*. 5: 1, 64-70.
- Singh D.K., L. Gulshan, R.P. Tewari, G. Lal. 1994. Effect of sowing time on virus incidence and seed yield of okra. *Annals of Agricultural Research*. 15: 3, 374-375f.
- Tian, T., V. A. Klaassen, J. Soong, G. Wisler, J. E. Duffus, B. W. Falk, 1996. Generation of cDNAs Specific to Lettuce Infections Yellows Closterovirus and Other Whitefly-Transmitted Viruses by RT-PCR and Degerate Oligonucleotide Primers Corresponding to the Closterovirus

- Gene Encoding the Heat Shock Protein 70 homolog. *Phytopathology* 86:1167-1173.
- Ureña F. C. 1986. Manual de Técnicas Básicas para Microscopía Electrónica. Universidad de Costa Rica. Unidad de Microscopia Electrónica. 55 p.
- Valverde R.A., S. T. Nameth, R. L. Jordan. 1990. Analysis of Double- Stranded RNA for plant virus Diagnosis. *Plant Disease*. 74 255-258.
- Veilleux C. 1999. PCR Tecnology. www.accessexcellence.org/LC.s/p.
- Urias M. C., M. R. Rodriguez, A. T. Alexandre. 1992. Áfidos como vectores de virus de importancia agrícolas. Volumen II. Identificación de áfidos de importancia agrícola. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados.p 104
- Valadéz M. E. 1999. Aspectos generales de técnicas moleculares en el diagnóstico de fitopatógenos. Memorias del Curso Detección E identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnica moleculares. Centro Nacional de Referencia. SAGAR. México D.F. s/p.
- Velázquez M. J. J. Rodríguez M.R. 1990. Transmisión y Relaciones entre el "chino" del jitomate y su vector *Trialeurodes vaporariorum*. *Agrociencia* 1:3 p. 69-85
- Wilsler, G.C. H.Y Duffus, R.H. Li. 1998. Ecology and epidemiology of Whitefly-transmitted Closteroviruses. *Plant Disease*: 82:3 270-280.
- Xiong Z. 1999b. Symptoms of Viral Diseases. Department of Plant Pathology. University of Arizona. Tucson, Arizona. Consulta en internet.
- Xiong, Z. 1999a. Single-stranded DNA Viruses: Geminiviruses. Department of Plant Pathology. University of Arizona. Tucson, Arizona. Consulta en internet.
- Zhou-XuePing, Y. Liu, D.J. Robinson, B.D. Harrison, X.P Zhou, Y. L. Liu. 1998. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*. 79: 4, 915-923; 19 ref.

A N E X O S

Anexo 1. Superficie sembrada y cosechada, producción, rendimiento, precio medio rural y valor de la producción del cultivo de la okra (Angu o Gombo), por estados y total nacional para el año 1997.

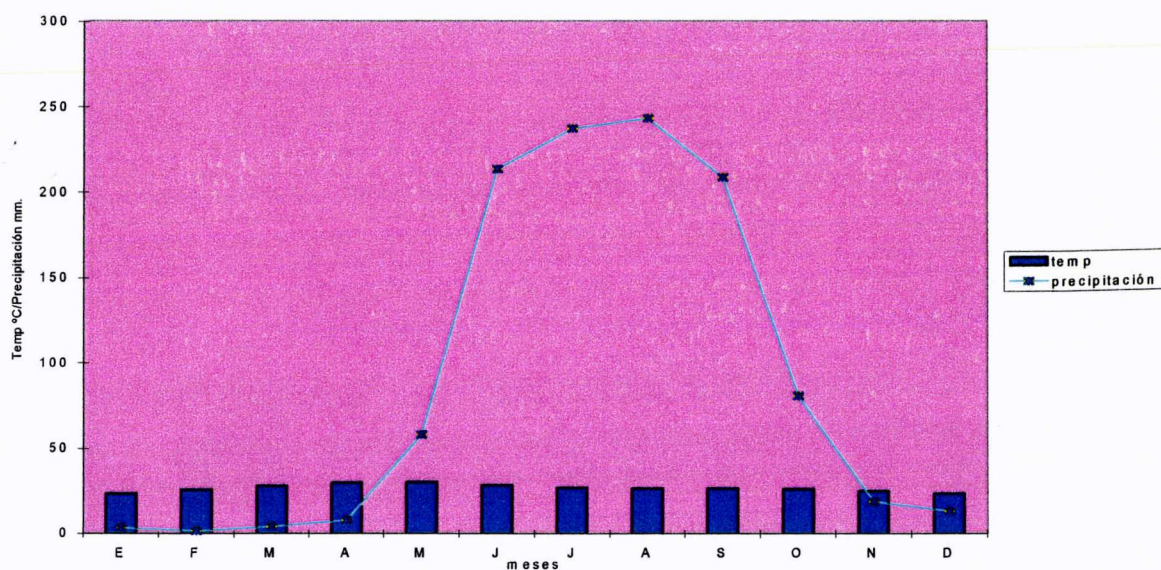
Estado	Superficie sembrada (ha)			Superficie cosechada (ha)			Producción (ton)			Rendimiento ton/ha		
	R	T	Total	R	T	Total	R	T	Total	R	T	Total
Guerrero	247	14	261	247	14	1,580	1,482	98	1,580	6.0	7.0	6.05
Michoacán	28	7	35	28	7	325	220	105	325	7.857	15	9.2
Morelos	252	-	252	246	-	3,063	3,063	-	3,063	12.45	-	12.45
Tamaulipas	216	3,754	3,970	111	3,754	23,878	390	23,488	23,878	3.514	6.25	6.17
Yucatán	40	-	40	40	-	480	480	-	480	12	-	12
Total nacional	785	3,775	4,560	673	3,775	29,329	5,638	23,691	29,329	8.377	6.27	6.59

Fuente: Anuario Estadístico de la producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1977.

Continuación....

Estado	Precio medio rural (\$)			Valor de la producción (\$)		
	R	T	Total	R	T	Total
Guerrero	3,182	1,600	3,083.88	47'157,724	56,800	4'872,524
Michoacán	3,000	3,000	3,000	660,000	315,000	975,000
Morelos	1,501	-	1,501	4'600,507	-	4'600,507
Tamaulipas	2,317.3	3,380.3	2,379.3	903,774	55'909,896	56'813,670
Yucatán	6,500	-	6,500	3'120,000	-	3'120,670
Total nacional	2,489.15	2,379.88	2,400.88	14'033,805	56'381,696	70'415,501

Anexo 2, Figura 1. Distribución de la temperatura y precipitación en Iguala



Gro.

Anexo 2. Datos climáticos del municipio de Iguala Gro.

Coordenadas 18° 22' y 99° 33'

Altitud 635 msnm.

Aw₀ (w) (i')g

Meses	Temperatura	Precipitación
Enero	3,1	23,8
Febrero	1,2	25,7
Marzo	3,7	27,9
Abril	7,6	29,8
Mayo	57,7	30,2
Junio	213,1	28,3
Julio	236,9	26,9
Agosto	243	26,6
Septiembre	208,5	26,4
Octubre	80,4	26,2
Noviembre	18,2	25,1
Diciembre	12,9	23,5

Fuente: García (1981).

Anexo 3. Lecturas de las muestras obtenidas en la prueba de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.00	0.01	0.02	0.01	1.05	1.05	0.02	0.01	0.37	0.39	0.00	0.01
B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Anexo 4a. Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280} obtenidos por el método de PlanDNAzol

Muestra	Concentración de ADN de (ug/ml)		Relación A_{260}/A_{280}	
	Planta Sana	Planta enferma	Planta Sana	Planta enferma
1	0.539	0.669	0.520	0.537
2	0.613	0.988	0.502	0.674
3	0.671	0.884	0.590	0.646
4	0.587	0.655	0.513	0.537
5	0.599	0.517	0.501	0.443

Anexo 4b, Concentración de ADN y relación A_{260}/A_{280} obtenidos por el método de Dellaporta (minipreparación).

Muestra	Concentración de ADN de (ug/ml)		Relación A_{260}/A_{280}	
	Planta Sana	Planta enferma	Planta Sana	Planta enferma
1	0.652	1.163	0.550	0.764
2	1.57	0.634	0.886	0.498
3	1.52	0.887	0.492	0.722
4	-	0.348	-	0.334
5	-	0.680	-	0.344

dc= doble cadena

Anexo 4c. Concentración de ADN y Relación A_{260}/A_{280} obtenido por el método Dellaporta.

Muestra	ug/ul	Relación A_{260}/A_{280}
1	0.205	
2	0.260	
3	1.229	
4	1.590	
5	1.240	
6	0.319	
7	0.268	
8	0.360	
9	0.82	
10	1.562	
11	0.159	
12	1.396	

* muestras seleccionadas por su concentración de ADN y pureza.

Anexo 1. Superficie sembrada y cosechada, producción, rendimiento, precio medio rural y valor de la producción del cultivo de la okra (Angu o Gombo), por estados y total nacional para el año 1997.

Estado	Superficie sembrada (ha)			Superficie cosechada (ha)			Producción (ton)			Rendimiento ton/ha		
	R	T	Total	R	T	Total	R	T	Total	R	T	Total
Guerrero	247	14	261	247	14	1,580	1,482	98	1,580	6.0	7.0	6.05
Michoacán	28	7	35	28	7	325	220	105	325	7.857	15	9.2
Morelos	252	-	252	246	-	3,063	3,063	-	3,063	12.45	-	12.45
Tamaulipas	216	3,754	3,970	111	3,754	23,878	390	23,488	23,878	3.514	6.25	6.17
Yucatán	40	-	40	40	-	480	480	-	480	12	-	12
Total nacional	785	3,775	4,560	673	3,775	29,329	5,638	23,691	29,329	8.377	6.27	6.59

Fuente: Anuario Estadístico de la producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1977.

Continuación....

Estado	Precio medio rural (\$)			Valor de la producción (\$)		
	R	T	Total	R	T	Total
Guerrero	3,182	1,600	3,083.88	47'157,724	56,800	4'872,524
Michoacán	3,000	3,000	3,000	660,000	315,000	975,000
Morelos	1,501		1,501	4'600,507	-	4'600,507
Tamaulipas	2,317.3	3,380.3	2,379.3	903,774	55'909,896	56'813,670
Yucatán	6,500	-	6,500	3'120,000	-	3'120,670
Total nacional	2,489.15	2,379.88	2,400.88	14'033,805	56'381,696	70'415,501

