

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

**ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL EN PLANTAS
ORNAMENTALES DEL ESTADO DE MORELOS**



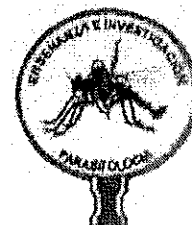
TESIS

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

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN
VEGETAL**

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ



Chapingo, México, febrero del 2005.

**ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL EN PLANTAS ORNAMENTALES DEL
ESTADO DE MORELOS**

Tesis realizada por José Eduardo Bautista Rodríguez bajo la Dirección del comité asesor que se indica, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

ASESOR:


DR. JUAN FERNANDO SOLÍS AGUILAR

ASESOR:


DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

Chapingo, México, febrero del 2005.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado a través del otorgamiento de la beca-crédito.

A la Universidad Autónoma Chapingo, particularmente al Departamento de Parasitología Agrícola por la oportunidad de continuar formándome profesionalmente.

Al Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz, por su persistencia en la realización de este trabajo y las acertadas sugerencias en la dirección de la presente investigación.

A los Drs. Juan Fernando Solís Aguilar y Samuel Ramírez Alarcón por su valiosa colaboración en la asesoría y revisión de la presente investigación.

A mi estimado amigo Sr. Mario Salazar por su desinteresada ayuda y orientación desinteresadas durante la realización del presente trabajo.

A todos los Profesores de la Maestría en Protección Vegetal por sus valiosos conocimientos

Agradezco especialmente al Dr. Sebastián Romero Cova por su exigencia y ética profesional que será un ejemplo en lo que me reste de vida.

DIDICATORIA

A mi esposa Amalia, por su amor, por su paciencia y por su comprensión ante mi obligada ausencia en los momentos difíciles.

A mi hija Mariel Hazel, por su cariño y por su madurez a pesar de su edad.

A mi madre, Sra. Josefina Rodríguez, quién siempre ha tenido una palabra de aliento en los tiempos buenos y malos.

A mi padre⁺, Sr. Eduardo Bautista, el hombre que me dejó de herencia su dedicación al trabajo, su honestidad y su sabiduría.

A mis hermanos, Coco, Came, Hilda, Paty, Chofi, Yola y Rami, por su cariño a pesar de los altibajos.

A mis sobrinos, gracias les doy por su paciencia y su alegría de vivir.

A los sobrinos-nietos por continuar creciendo con sus risas y ocurrencias que alegran los momentos amargos.

A mis compañeros de Maestría por su amistad y por su valioso apoyo, muy en especial a los paisanos Manuel y Héctor.

"A mi Padre"

Ante la tumba en que descansas padre mío
estas rimas sencillas yo te ofrezco,
y cumpliendo la promesa comparezco
con toda decisión, con todo brío.

Han pasado los años presurosos
como vuelo de aves invernales,
mas los gratos momentos fraternales
persisten en mi mente calurosos.

El dolor que causara tu partida
existe aún como punzante espina,
mas sé bien que esa tumba fría
es solo una pausa en tu eterna vía.

A pesar de tu dolida ausencia
de olvidarte no tendré motivo
y tu recuerdo como fuego vivo
arderá en tu eterna esencia.

Que tus sabios consejos a Dios pido
se transformen en luces siderales
e iluminen mi vida a raudales
en los noches de duda y extravío.

Y así, mientras en el cielo frío
brille una estrella rutilante,
sabré que en mi camino errante
estarás conmigo, Padre mío.

Hoy y siempre, tu hijo.
Noviembre, 2004.

BIOGRAFÍA

José Eduardo Bautista Rodríguez nació el 15 de marzo de 1961 en Jiutepec, Municipio de Morelos. Estudió la escuela Primaria durante 1968-73, siendo el mejor alumno de la Zona Escolar N° 20 de Morelos. De 1973 a 1976 realizó sus estudios de secundaria obteniendo un promedio de 8.8. Cursó la escuela preparatoria durante 1976-79. Ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo en 1981 donde cursó la Especialidad de Parasitología Agrícola obteniendo un reconocimiento por ser Miembro de Cuadro de Honor, egresó de la UACH en 1987 y se tituló en 1988 realizando la tesis "Tasas de supervivencia y reproducción de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), bajo la dirección del Dr. Jorge Vera Graciano.

Desde su egreso de la licenciatura se ha desempeñado profesionalmente en diversas áreas de la Parasitología Vegetal como técnico de producción de plantas ornamentales, técnico de ventas de agroquímicos, responsable signatario de empresas expendedoras de agroquímicos, y Principalmente en la docencia en Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos desde 1988 a la Fecha. Fue Director interino de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de 1993 a 1994.

Ingresó a la Maestría en Protección Vegetal en enero del 2001 realizando investigación sobre la detección y caracterización de virus en plantas ornamentales en coordinación con el Dr. Rodolfo De La Torre de la UNAM, Campus Iztacala.

INDICE

	Pag.
LISTA DE CUADROS.	i
LISTA DE FIGURAS.	ii
RESUMEN.	iii
SUMMARY.	iv
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. OBJETIVOS.	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.	4
3.1. Situación de la agricultura en México.	4
3.2. Situación de la agricultura en el estado de Morelos.	5
3.3. Importancia de la floricultura.	7
3.4. Origen de la floricultura en México.	12
3.5. Origen de la floricultura en el Estado de Morelos.	13
3.6. Principales especies de plantas ornamentales producidas en el Estado de Morelos.	15
3.7. Introducción de nuevas especies.	15
3.8. Problemática fitosanitaria.	16
3.8.1 Principales plagas de las plantas ornamentales.	17
3.8.2. Enfermedades y patógenos más importantes.	21
3.8.3. Enfermedades de origen viral.	30
3.8.3.1. Definición y generalidades.	30
3.8.3.2. Importancia de los virus fitopatógenos.	30

	Pag.
3.8.3.3. Sintomatología.	31
3.8.3.4. Virus de importancia en los cultivos ornamentales.	33
3.8.3.5. Aspectos epidemiológicos.	38
3.8.3.6. Control de enfermedades causadas por virus.	40
3.8.3.7. Métodos de detección, identificación y caracterización de virus fitopatógenos.	44
3.8.3.7.1 Transmisión mecánica.	45
3.8.3.7.2. Detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales.	45
3.8.3.7.3. Microscopía de luz.	46
3.8.3.7.4. Microscopía electrónica.	46
3.8.3.7.5. Extracción y análisis electroforético de RNA de doble cadena.	47
3.8.3.7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa de la Transcripción Reversa (RT - PCR).	47
3.8.3.7.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de fitoplasmas.	48
IV: MATERIALES Y METODOS.	49
4.1. Recorridos de campo.	49
4.2. Selección y colecta de las plantas.	49
4.3. Ubicación del experimento.	49

	Pag.
4.4. Detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales.	50
4.5. Detección serológica por medio de ELISA.	55
4.6. Microscopía de luz	55
4.7. Microscopia electrónica.	55
4.8. Extracción y análisis de RNA de doble cadena.	56
4.9. Extracción de DNA y PCR.	56
V. RESULTADOS.	57
5.1. Detección y separación de virus; y pruebas de susceptibilidad en algunos hospedantes indicadores y diferenciales.	59
5.2. Ensayos serológicos por medio de ELISA.	63
5.3. Microscopía de luz.	66
5.4. Microscopía electrónica.	67
5.5. ds-RNA.	67
5.6. rt-PCR para virus.	67
5.7. PCR para virus.	67
5.8. PCR anidado para fitoplasmas.	68
VI. DISCUSIÓN.	69
VII. CONCLUSIONES.	72
VIII. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.	73
IX. ANEXOS.	87

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Exportaciones Mexicanas de plantas ornamentales durante 1998.	10
Cuadro 2. Resumen comparativo de las técnicas de los ensayos utilizados en el experimento.	57
Cuadro 3. Resultados del ensayo serológico por ELISA.	64
Cuadro 4. Resultados de la PCR anidada para fitoplasmas.	68

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Evolución de la floricultura en Morelos.	7
Figura 2. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	51
Figura 3. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	52
Figura 4. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	52
Figura 5. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	53
Figura 6. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	53
Figura 7. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	54
Figura 8. Síntomas observados en algunos ejemplares de estudio.	54
Figura 9. Resultados de los ensayos de algunas plantas bajo estudio. .	66

ENFERMEDADES DE ORIGEN VIRAL EN PLANTAS ORNAMENTALES DEL ESTADO DE MORELOS

RESUMEN

Se detectaron y caracterizaron parcialmente varios virus y otros patógenos similares en 43 especies de plantas ornamentales cultivadas en el Estado de Morelos con síntomas de mosaicos, moteados, deformaciones foliares, enanismos, y torcimientos, entre otros, que provocan daños en la cantidad y calidad de follaje y flores. La caracterización de los patógenos se realizó mediante ensayos de transmisión mecánica a plantas hospedantes diferenciales e indicadoras, microscopía de luz, microscopía electrónica, serología (ELISA), análisis electroforético de ARN de doble cadena y PCR. Los resultados indican que algunos virus como el INSV, el AMV, TSWV y TRSWV; son frecuentemente detectados en estas plantas y provocan síntomas individualmente o mezclados. En algunas especies de plantas se detectaron mediante PCR fitoplasmas que causan síntomas similares a los causados por virus.

Palabras clave: Virus, plantas ornamentales, enfermedades.

VIRAL DISEASES ORIGIN ON ORNAMENTAL PLANTS OF MORELOS STATE

ABSTRACT

Various viruses and other similar pathogens were partially classified and detected in 43 species of ornamental plants grown in Morelos State with symptoms of mosaics, mottles, foliar deformations and twisters among others, which negatively affect leaf and flower quality and quantity. The characterization of pathogens was done through tests using electronic microscopy, serology, RNA electrophoresic analysis in double chain and PCR. The results indicate that some disease-causing viruses, like *Impatiens Necrotic Spot Virus* (INSV), *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV), *Tomato Spot Wilt Virus* (TSWV) and *Tobacco Ring Spot Wilt Virus* (TRSWV), are frequently detected individually or in a mixed form in these plants. Phytoplasmas that cause similar symptoms to those caused by viruses were detected through PCR in some species of the plants.

Keywords: Viruses, ornamental plants, diseases.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de plantas ornamentales tiene su origen hace miles de años. El hombre, desde el inicio de la agricultura, y durante el proceso de domesticación de las plantas que le sirven de alimento, también seleccionó aquellas que en su momento usó para ornamento de su cuerpo y de sus palacios, como sucedió hace 3,500 años entre los egipcios (Leszczyńska-Boris, 1990).

En México, la producción de plantas de ornato tiene gran importancia económica debido a que son cultivos de una alta rentabilidad (García, 1982). Uno de los problemas más importantes en este sector es la obtención de plantas y flores de buena calidad la cual es determinada por características morfológicas como la longitud del tallo; la forma de la planta, tamaño, color, número y forma de los pétalos, así como su sanidad (García, *et al.*, 1999).

Las enfermedades de los cultivos ornamentales pueden ser causadas por diversos organismos. Los patógenos más importantes son hongos, bacterias y virus (Daughtrey *et al.*, 1995).

Las enfermedades virales o de origen similar al viral en la horticultura ornamental se han incrementado fuertemente en los últimos años. Su dispersión en estos cultivos constituye un peligro de carácter especial debido al sistema de manejo de las plantas y los objetivos del mercado, por lo que conforman el mayor volumen de material verde en tránsito en el mundo. El hombre a través de sus actividades productivas y comerciales es el principal factor que ha causado el surgimiento de nuevas enfermedades, su dispersión y establecimiento en nuevas regiones productivas (Daughtrey *et al.*, 1995; Vern, 1999).

El estado de Morelos es actualmente uno de los principales productores de plantas ornamentales de nuestro país, con amplia diversidad de especies. Sin embargo, a pesar de su importancia, la floricultura morelense ha sido limitada en su desarrollo por varios factores, entre los que destacan las enfermedades que provocan la reducción del volumen y calidad de la producción (Mundo, 2002).

Durante el periodo 2000-2003 en varios recorridos realizados por diferentes municipios del estado de Morelos que concentran la mayor superficie de producción de plantas ornamentales se observó que en los diversos centros de producción existen diferentes tecnologías, que van desde las altamente sofisticadas hasta las muy rudimentarias. También los puntos de venta y los medios de transporte son muy contrastantes en lo referente a las condiciones del manejo de las plantas, lo cual incrementa los riesgos de infección y diseminación de las enfermedades.

En estos centros se detectaron diferentes especies de plantas con síntomas cuyo origen al parecer era viral, tales como: mosaicos, moteados, deformaciones foliares, enanismos, torcimientos, entre otros. Ello motivó la búsqueda de información sobre las posibles causas de tales enfermedades. Sin embargo, la casi nula información disponible en México sobre los virus que infectan a las plantas ornamentales cultivadas, hizo necesario plantear la realización de este trabajo para determinar la identidad de los patógenos involucrados a fin de coadyuvar al diseño de estrategias más adecuadas para su prevención y control en el Estado de Morelos.

II. OBJETIVOS

En base a lo anterior descrito se plantea la ejecución del presente trabajo con el siguiente objetivo:

Identificar y caracterizar los virus que infectan a las especies y variedades de plantas ornamentales más comunes en el estado de Morelos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1. Situación de la agricultura en México.

El campo mexicano se encuentra en una situación crítica. Diversos autores coinciden que después de la "Revolución verde" y el "Milagro mexicano", la agricultura de México ha venido de más a menos. Los orígenes de esta crisis se remontan a la década de los sesenta, alcanzando su pináculo a fines de los noventa; desde entonces a la fecha el comportamiento de la producción agrícola del país ha tenido un comportamiento errático (Castaños, 1990; UNICEDES, 1998; Luna, 2002).

Según Baldovinos (2002), las causas que dieron pauta a la desaceleración de la actividad agrícola, incluso a su reducción en muchos casos son variadas, destacándose: Las políticas de control del estado de los procesos productivos, crediticios, de comercialización, de transformación e incluso de la exportación; la reducción del aparato estatal para la atención al campo, lo cual ha impactado en las políticas de precios, en los subsidios, los créditos, seguros, insumos y asistencia técnica, y desmantelamiento de la infraestructura agrícola.

Las modificaciones al Artículo 27 constitucional y su Nueva Ley Agraria concedieron a los núcleos agrarios la posibilidad de cambiar de uso del suelo y la libre asociación; propiciando en muchos casos un mayor fraccionamiento de las tierras ejidales y comunales, beneficiando a los inversionistas nacionales y extranjeros promoviendo asentamientos urbanos en tierras productivas (Rueda, 1998).

Como consecuencia de lo anterior el panorama actual del campo mexicano no luce optimista. Los productores actualmente enfrentan altos costos de producción, baja productividad, eliminación de subsidios o bien si se dan son insuficientes, lo cual limita su capacidad para competir con los socios del norte.

El ingreso de México al GATT y al TLC, además de la influencia del neoliberalismo, exigen que los productos agrícolas tengan una mayor calidad para competir en los mercados internacionales, lo que incide sobre aspectos del manejo de las plagas y patógenos que merman las características de venta al público (Luna, 2002).

3.2. Situación de la agricultura en el Estado de Morelos.

El sector agrícola en el estado de Morelos se caracteriza por una gran diversidad de agroecosistemas: desde los cálidos subhúmedos hasta los semifríos, pasando por los semicálidos y templados subhúmedos. De la superficie dedicada a la agricultura se señala que el 11.32 % se cultiva bajo riego, el resto es de temporal. En el caso de la superficie de riego, poco más de 7 % se encuentra bajo sistemas tecnificados, mientras que el resto opera bajo condiciones de riego tradicional (CIDRSEM, 2003).

Transcurridos 14 años de la suscripción de la carta de intención con el Banco Mundial y con el Fondo Monetario Internacional, los efectos de tales compromisos han sido desastrosos para los productores rurales; el Estado de Morelos no ha escapado de la problemática nacional: La descapitalización, el desempleo, la migración rural, la violencia y otros daños, son muestras de ello (Serranos, 1996).

De acuerdo con Oswald y Mestries (1992), en Morelos no se ha incrementado la superficie agrícola desde los años sesenta principalmente a que esta entidad

ha sufrido durante más de cuarenta años inmigraciones provenientes de los Estados circunvecinos e incluso del Distrito Federal, lo que ha ejercido una gran presión para el cambio de uso del suelo agrícola a uso urbano. Sin embargo, la rápida urbanización y la industrialización acarrearón consigo no sólo dicha presión, sino también causaron la contaminación del agua de riego.

La venta de tierras y el acaparamiento de parcelas ha provocado la reducción del censo ejidal y comunal; los antes propietarios han dejado su tierra y se dedican a otras actividades. Las políticas aplicadas al sector agropecuario, los altos costos de producción y la disminución real de la ganancias generadas por los cultivos básicos provocó su desplazamiento por hortalizas de consumo en fresco, situación que fue potenciada debido a la demanda de estas por el mercado de la Ciudad de México (Baldovinos, 2002).

Dentro de este panorama, la floricultura pasó a ser un factor impulsor de desarrollo en zonas determinadas del Estado de Morelos que reúnen características idóneas por sus factores agroclimáticos (Miranda, 1999; Baldovinos, 2002).

Debido a su alta rentabilidad por unidad de superficie, en comparación con otros cultivos, la horticultura ornamental es una actividad económicamente atractiva para los productores minifundistas cuyo espacio es limitado, por lo que durante los últimos años esta actividad se ha incrementado sustancialmente (Cortés, 2001).

La figura 1 muestra que a partir de 1980 la floricultura estatal a tenido un incremento constante en cuanto a superficie y valor de la producción, mostrando una tendencia a continuar expandiéndose por los motivos ya señalados (SAGAR, 1998). Sin embargo, se requiere de una mayor atención gubernamental que posibilite su crecimiento. También es necesario la conformación de cuadros técnico-científicos que impacten directamente sobre

la calidad de los productos ofrecidos, tanto para el mercado interno como para el de exportación (Mundo, 2002).

Figura 1: Evolución de la floricultura en Morelos.



Fuente: SAGAR. Centro de Estadística Agropecuaria (C.E.A.), 1998. Distrito de Desarrollo Rural (D.D.R.)

3.3. Importancia de la floricultura.

El hombre desde hace milenios ha ligado su vida espiritual y emotiva a las plantas ornamentales, por ello algunas sociedades han convertido a la horticultura ornamental en una importante rama de la economía agrícola e incluso agroindustrial. La producción de plantas con fines ornamentales en el mundo posee una gran variedad de especies, desarrolladas por el hombre a lo largo de más de 2,000 años de cultivo y selección (Gómez, 1994). Durante los últimos cincuenta años la floricultura y la jardinería se han modificado sustancialmente a partir del desarrollo de diversas áreas relacionadas tales como: Una mayor cooperación regional e internacional para mejorar los sistemas de multiplicación, mejores sistemas de multiplicación y manejo; así como para el intercambio de materiales vegetales y una constante exploración e introducción de nuevas especies. Esto ha venido impulsando fuertemente la producción y comercialización de plantas ornamentales de tal forma que la

disponibilidad de estas supera en mucho a la que se tenía la década pasada (Cortés, 2001).

En el mundo, las plantas ornamentales son importantes debido a que su producción y comercialización genera fuentes de trabajo directas para miles de trabajadores. Así mismo promueve el incremento de empleos de forma indirecta a través de la creación de empresas suministradoras de insumos y materiales diversos como: agroquímicos, macetas, bolsas de polietileno, coberturas plásticas, estructuras metálicas para invernadero, arreglos florales, materiales de empaque, medios de transporte, entre muchos otros (Bancomext, 1994).

a) Importancia internacional. Mundialmente la venta de flores se ha incrementado en forma constante en los últimos años y el mercado potencial es muy grande. Las exportaciones en el mundo durante 1998 fueron de un total de \$ 7, 438, 143.00 dólares, siendo los principales países exportadores Holanda, Colombia y Ecuador; México participó apenas con un 1.29 % del total del mercado (García, *et al.*, 1999; Olascoaga, 2000).

La SAGARPA (2002) comunicó que la floricultura mexicana ocupa el tercer lugar mundial en la producción de flores después de China e India. Así mismo indicó que la generación de empleos directos asciende a 300,000 en forma permanente, y que el valor de las ventas fue de 30 mil millones de dólares en el mercado mundial; de los cuales 14 mil millones corresponden al consumo en los Estados Unidos.

b) Importancia nacional. En México el establecimiento de áreas para producción de plantas ornamentales ha cobrado un especial interés en los últimos treinta años. La amplia frontera que tiene el país con EEUU le representa importantes ventajas para la exportación de ornamentales, y podría convertirse en abastecedor natural de flores y plantas de ornato al mercado del

vecino país del norte, considerado el principal consumidor florícola del mundo (BancoMext, 1994; Castellanos, 1996; Sotomayor, 2000).

La República Mexicana dispone de 18 regiones favorables para la producción de cultivos ornamentales, en estas se producen plantas para flor de corte, de follaje y plantas en maceta; en viveros bajo invernadero o a cielo abierto. En México poco más de 12,000 productores cultivan una superficie de 21,900 ha de flores cuyo valor asciende a mil 870 millones de pesos. Las entidades que producen plantas ornamentales en el país son: Aguascalientes, Baja California, Colima, Coahuila, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, y Veracruz, siendo el Estado de México el de mayor volumen de producción bajo invernadero (Bancomext, 1994; INDAP, 2002).

Sólo el diez por ciento de la producción se destina a la exportación, teniendo en el 2002 un valor de 71 millones de pesos (Cuadro 1), ya que la demanda interna de plantas de ornato consume el 90 % de la producción; de tal manera que el 60 % de la comercialización se da en la Ciudad de México, el 38 % en otros estados y únicamente un 2 % en los supermercados. Las exportaciones mexicanas se realizan a 30 países, sin embargo, el mercado norteamericano es el mayor consumidor de lo que exporta el país representando el 85 % del total (SAGAR, 1998, SAGARPA, 2002).

Los cultivos más relevantes bajo invernadero son rosa (*Rosa sinensis*), gerbera (*Gerbera jamesonii*), liliun (*Lillium spp.*), alstromeria (*Alstroemeria aurantiaca*), aster (*Aster spp*) y clavel (*Dianthus caryophyllus*); en cultivos a cielo abierto, sobresale el crisantemo (*Chrysanthemum cinerarifolium*), clavel (*Dianthus caryophyllus*) y gladiola (*Gladiolus hortulanus*). Otras especies de menor volumen son statice (*Limoniun latifolium*), limonion (*Limoniun bonduellii*), solidago (*Solidago sp*), iris (*Iris sp*), gypsophilia (*Gypsophila paniculada*), tulipán (*Tulipa spp*), alcatraz (*Zantedeschia*), liatris (*Liatris sp*), agapando (*Agapanthus*

sp) y ave del paraíso (*Strelitzia reginae*). Cabe señalar que la producción a cielo abierto se destina principalmente al mercado nacional, mientras que para el exterior se cubre fundamentalmente con flor de invernadero (INEGI, 1998; INDAP, 2002).

Cuadro 1. Exportaciones Mexicanas de plantas ornamentales durante 1998.

PAÍS	%
Estados Unidos	85.0
Canadá	3.5
Japón	4.3
Países Europeos	7.2

Fuente: SAGAR, 1998.

c) Importancia estatal. El estado de Morelos se ha constituido en el principal productor del país de plantas de ornato, tanto de maceta como de bolsa. Esta actividad es importante por el valor de la producción, los empleos que genera, y la derrama económica que genera al consumir gran cantidad de materiales como: mallas, tubos, plásticos, plaguicidas, mangueras, vidrios, etc. (CIDRSEM, 2003).

Se tiene calculado que en la entidad se manejan más de 200 especies a las cuales hay que agregarle que dentro de cada una de ellas hay muchas variedades. El nivel tecnológico no es alto pero están organizados de tal manera que la capacitación es una de sus prioridades con lo cual Morelos podrá mantenerse a la cabeza de esta cadena (Colegio de Postgraduados, 2004; Luna y Sotelo, 2004).

Según Miranda, en 1999 la superficie cultivada en 1998 fue de 1,822 hectáreas, de las cuales el 58 % se cultivaron a cielo abierto, el 20 % en invernadero y el

22 % bajo sombra. El viverismo se desarrolló en 1,072 hectáreas que se distribuyen en 2,000 unidades de producción de diferentes dimensiones y grado de tecnificación: el 25 % es rústico, el 60 % tiene tecnología intermedia y sólo el 15 % son de alta tecnología.

En relación al volumen de producción de este sector en el estado de Morelos, la SAGARPA (2002) reporta que durante el año del 2001 los productores morelenses produjeron 5,420,000 plantas en maceta tanto a cielo abierto como bajo invernadero, así como 4,546 gruesas de rosa a cielo abierto.

De acuerdo con Mundo (2002), la horticultura ornamental en Morelos representa una de las alternativas más relevantes dentro del sector agrícola, debido a su alta rentabilidad por unidad de superficie, y puede aventajar con facilidad la explotación comercial de cualquier cultivo de temporal y de muchos de riego; así mismo es una actividad agrícola que genera una gran cantidad de empleos.

El FIRA, en 1996, estimó que la actividad hortícola ornamental en Morelos benefició en forma directa a 2,000 familias y generó 9,000 jornales fijos diariamente y 2,000 temporales; además de 4,000 empleos indirectos. Estas cifras se incrementan sustancialmente durante los meses de febrero, mayo, junio, noviembre y diciembre, en los que se registra un incremento en precios y volúmenes de producción (Miranda, 1999).

En cuanto a su potencial de expansión, García (1982) y el FIRA (1996), señalan que la producción de ornamentales es la actividad agrícola que representa una de las mejores alternativas dentro del sector agropecuario. Mundo, 2002, menciona que la floricultura de Morelos genera un 20 % del total de las ventas de productos agrícolas lo que representa alrededor de 200 millones de pesos.

3.4. Origen de la floricultura en México.

A pesar de que no se puede precisar en que momento los habitantes de América, y más específicamente en México, iniciaron el uso de las plantas como ornamento, se tienen antecedentes de que ya desde en la época prehispánica, nuestros antepasados tenían una alta estima hacia diversas especies usadas para fines religiosos y estéticos (Hernández, 1986; Estrada, 1987).

Heyden (1985) indica que las flores estaban relacionadas con el hombre prehispánico desde su concepción, su nacimiento y hasta su muerte. Los antiguos mexicanos usaron las plantas para adornar sus palacios, templos, casas y mesas; tanto para congraciarse con sus dioses como para honrar a sus muertos; muchas de esas tradiciones aún se conservan en el país (Leszczyńska-Boris, 1990).

Linares en 1994, tomando como base datos históricos, menciona que los jardines botánicos en México ya se construían desde el siglo XII en las ciudades ocupadas por los pueblos nahuas, e indica que estos probablemente fueron influenciados por los toltecas. El mismo autor describe que a la llegada de los españoles el uso de las plantas de ornato estaba muy arraigado en nuestra cultura y que esto se pone de manifiesto en la segunda carta de relación que Hernán Cortés envió en 1520 al emperador Carlos V. También se menciona que las chinampas de la antigua Tenochtitlan eran como "jardines flotantes" en los que se cultivaban en Xochimilco y Chalco no sólo plantas para alimento sino también para ornato (Hugh, 1994).

Los jardines botánicos en México con seguridad dieron origen al viverismo. Existen evidencias de estos en diferentes áreas geográficas del país, destacándose los que el Rey Netzahualcoyotl mandó construir en el cerro del Tescutzingo en Texcoco y en Oaxtepec, Morelos. En estos espacios se

cultivaban las dalias, la noche buena, las begonias, la zinia, los cactus, el nardo, el cempazúchil, los ahuehuetes, y las orquídeas (FIRA, 1989).

Durante la época colonial, y como consecuencia de la fusión cultural mexicana y europea, se enriqueció la flora ornamental con especies introducidas y el surgimiento de nuevas tradiciones criollas. Desde el periodo independiente y hasta mediados del siglo pasado, cada etapa histórica de nuestro país con sus costumbres y modas incrementó el ingreso de especies exóticas traídas por extranjeros o bien por nativos de los países que visitaban en sus viajes, sentando las bases del surgimiento de la horticultura ornamental contemporánea (Estrada, 1987).

3.5. Origen de la floricultura en el Estado de Morelos.

Por sus características agroclimáticas, el Estado de Morelos tiene una gran tradición como productor de plantas ornamentales cuyo origen probablemente se remonta al periodo de florecimiento de los toltecas quienes construyeron la ciudad de Xochicalco; desde ahí extendieron su influencia hacia Chimalacatlán en el actual estado de Guerrero y Chalcatzingo, Puebla. Así mismo, el pueblo Texcocano al establecer los jardines mencionados de Oaxtepec, influyeron para que los Tlahuicas construyeran un hermoso jardín botánico en Cuahnahuac, hoy Cuernavaca (López, 1994).

Con la llegada de los españoles y el consecuente ingreso de nuevos cultivos, el mosaico agrícola y ornamental de Morelos se modificó radicalmente, pasando del sistema tradicional nativo al tipo de producción europeo, cuyo fundamento era la temporalidad de las plantaciones ubicadas en grandes extensiones de tierra, situación que no tuvo variaciones importantes durante la independencia (Gómez, 1994).

Durante el periodo del Virreynato, Maximiliano de Hasburgo estableció en Cuernavaca su finca de recreo predilecta; en este lugar promovió el desarrollo de la producción de plantas ornamentales al estilo francés, el cual tenía como base el modo de producción diversificada y de traspatio. Fue Alejandro Humboldt quien en el siglo XIX, con sus estudios científicos de la flora del Continente Americano y del Caribe influyó para que impulsara el viverismo tipo americano, cuyos principios fueron la baja inversión y una alta rentabilidad a partir de una explotación más intensiva de la tierra (Mundo, 2002).

Según Cortés (2001), el viverismo moderno surgió en el Estado de Morelos en los años 50 con la fundación del vivero "Jardín Cortés" que se ubicaba en el Fraccionamiento Lomas de Cortés de la Ciudad de Cuernavaca. Casi al mismo tiempo se estableció el vivero "Santa Fe", de gran importancia en esa época. En los sesenta se crea en "El salto de San Antón", Cuernavaca el vivero "El Salto" especializado en la producción de árboles y construcción de jardines.

A través del tiempo, en este lugar se establecieron más viveros, creándose la primera zona del estado que concentró a diferentes productores y expendedores de plantas de ornato, quienes además de producirlas, también las compraban de otras partes del estado para su venta. Desde esa época, la proliferación de unidades de producción se ha incrementado de forma constante. Actualmente, existen mas de 1,000 hectáreas destinadas a su producción en toda la entidad, sin embargo poco más del 80 % se concentra en los municipios de Cuautla, Cuernavaca, Jiutepec, Yautepec y Emiliano Zapata (FIRA, 1996; INEGI, 1997; SAGAR, 1998; Miranda, 1999).

Es necesario destacar que a partir de 1982 se dio un fuerte impulso a la floricultura por parte del gobierno estatal, creándose en 1988 el Instituto de Floricultura, el cual fue desintegrado en 1994; de ese año y hasta 1997 se desactivó la política de apoyo deteniéndose el crecimiento de la actividad. En 1998 se crea el Programa Alianza para el Campo, estableciéndose el

subprograma de horticultura ornamental que amplia la visión de apoyo y da un mayor impulso a los productores (Luna, 2002).

3.6. Principales especies de plantas ornamentales producidas en Morelos.

En 1991 se produjeron 12,844,185 plantas en las unidades de producción de vivero, mismas que correspondieron a 210 especies diferentes. Las especies que más se produjeron en la entidad son: buganvillea (*Bougainvillea glabra*), aralia (*Aralia sp*), croto (*Crototus sp*), rosa (*Rosa sinensis*), ficus (*Ficus benjamina*), juníperus (*Juniperus sp*), cuna de Moisés (*Spatiphyllum sp*), noche buena (*Euphorbia pulcherrima*), crisantemo (*Crhysantemun morifolium*), geranios (*Pelargonium spp*), belenes o impatiens (*Impatiens balsamina*), violeta africana (*Sinangia speciosa*) y diferentes especies y variedades de helechos (INEGI, 1997; SAGAR, 1998). De acuerdo con Cabrera y Orozco (2002), en el Estado de Morelos, se producen más de 800 variedades de plantas ornamentales en las diversas regiones donde se localizan estos cultivos, sin embargo, cabe señalar que no existe un censo fidedigno de estas especies.

3.7. Introducción de nuevas especies.

En relación a la introducción de nuevas especies, se ha observado que en los últimos años la diversificación de cultivos es muy amplia; así se tiene un número considerable de nuevas especies y variedades que se introducen al estado, ya sea de otras entidades del país, o bien por medio de su importación de América, Europa, Medio Oriente o de otras regiones. Algunos cultivos que se han introducido en los últimos años son los anturios (*Anthurium andreanum*) para maceta, las bromelias (*Bromelia spp*), las palmas y helechos de especies y variedades tropicales diversas, entre muchas más cuyo valor unitario es más alto que las tradicionales (POMAC, 2002).

3.8. Problemática fitosanitaria.

La producción y distribución en el mundo de plantas ornamentales que consiste de toda la planta, flor cortada, semilla y propágulos vegetativos se ha convertido en parte integral de los tratados de comercio agrícola. En adición a esto, la movilización de germoplasma para colecciones *ex situ* con fines científicos es considerable. Una consecuencia negativa de este movimiento es la introducción accidental y distribución de patógenos cuarentenados dentro de áreas donde no ocurren o bien no están ampliamente distribuidos. Los propágulos vegetativos infectados por patógenos vasculares que no muestran síntomas (ej. virus latentes) son especialmente riesgosos y requieren de especial atención (Ikin y Parnell, 1999).

En muchos países, los altos estándares impuestos para la importación de plantas y otros materiales vegetativos, involucran la movilización de material libre de patógenos, el cumplimiento de protocolos cuarentenarios post-ingreso, y métodos rápidos de detección de virus, etc. (Spiegel, 1999; Stefani, 2001).

Por lo que se refiere a la situación fitosanitaria de estos cultivos en el estado de Morelos es muy compleja, debido tanto a la diversidad de especies manejadas, como a la proliferación de pequeñas y dispersas unidades de producción que no tienen los elementos técnicos suficientes para mantener sus plantas en condiciones favorables para el control de plagas y patógenos (Cabrera y Orozco, 2002). En este sentido, Mundo (2002), señala que los productores manifiestan que el segundo problema de importancia que percibe el viverista después de la comercialización es el aspecto fitosanitario, indicando que es un problema originado por la falta de asistencia técnica.

De acuerdo con Powell y Linquist, 1992, es muy difícil describir con precisión y amplitud las numerosas plagas y enfermedades que atacan a las plantas ornamentales. Sin embargo, existen algunas de estas que son comunes en casi

todas las unidades de producción de estos cultivos que los dañan tanto en invernaderos como a cielo abierto. Su conocimiento permite la aplicación de técnicas de control dentro de un programa de manejo integrado.

3.8.1. Principales plagas de las plantas ornamentales.

a) Áfidos o pulgones (Homoptera: Afididae). Muchas especies de áfidos son plagas de las plantas cultivadas. Los pulgones son insectos chupadores que se multiplican rápidamente en invernaderos y áreas tropicales, su población se compone de hembras que se reproducen partenogenéticamente. Estos insectos transmiten virus, e inyectan toxinas en sus secreciones salivales al sistema vascular de las plantas; en grandes poblaciones pueden provocar debilitamiento de las plantas reduciendo su valor comercial; sólo en condiciones especiales causan la muerte de su hospedero.

Su manejo se basa en una temprana detección de los brotes poblacionales. A pesar de existir muchos depredadores y parásitos de los pulgones, el control químico es la mejor opción para reducir sus daños (Powell y Linquist, 1992; Koehler, 1994; Davis University, 2002).

b) Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae). Hasta hace dos décadas, las moscas blancas eran consideradas como plagas esporádicas. Sin embargo, probablemente a causa de las modernas prácticas agrícolas, ahora son plagas muy destructivas tanto en cultivos a cielo abierto como bajo invernadero en todo el mundo. Las moscas blancas son insectos muy comunes en los cultivos ornamentales. Existen tres especies importantes, *Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii* y *Trialeurodes vaporariorum*, que causan graves problemas en las unidades de producción. Son insectos chupadores que atacan cerca de 500 especies de plantas de 70 familias diferentes. Sus poblaciones crecen rápidamente debido a su capacidad de producir grandes cantidades de huevos.

Unas cuantas moscas blancas pueden no causar daño, pero si sus poblaciones se incrementan, reducen fuertemente la calidad de las plantas e incluso causan su muerte. Además de dañar de forma directa a su hospedante por su alimentación, los problemas se incrementan debido a su capacidad de transmitir aproximadamente 20 virus que causan más de 40 enfermedades; además de producir mielecilla que favorece el desarrollo de fumagina.

El control de las moscas blancas con insecticidas es muy difícil debido a que desarrollan rápidamente resistencia a estos productos, sin embargo, su uso es aún el principal método para su control; bajo condiciones especiales la utilización de enemigos naturales como parasitoides, depredadores y patógenos es una técnica alternativa de control (Powell y Linqvist, 1992; Koehler, 1994; Davis University, 2002).

c) Escamas blandas (Homoptera). Existen varias especies de escamas blandas que atacan plantas ornamentales. Al igual que los pulgones y moscas blancas, las escamas son insectos chupadores que bajo condiciones ambientales favorables y en grandes poblaciones pueden provocar serios daños a sus hospedantes. A causa de su poca o nula movilidad, estas plagas pueden pasar desapercibidas para los productores en las primeras etapas de incidencia, lo cual tiene como consecuencia que su detección se realice cuando ya han rebasado los límites de tolerancia en el cultivo.

Su control es muy difícil y se basa principalmente en insecticidas, pero debe realizarse teniendo como base un programa de inspección constante. (Powell y Linqvist, 1992; Koehler, 1994; Van Gundi, *et al.*, 1999).

d) Trips (Thysanoptera). Los trips son insectos pequeños que se alimentan de flores, follaje y polen. Su daño lo provocan al raspar la superficie del tejido atacado provocando deformación de flores y hojas. Existen varias especies de

trips pertenecientes a los géneros *Frankliniella* y *Trips*, capaces de transmitir virus que afectan a numerosas especies de cultivos ornamentales.

El control de los trips es muy difícil debido a sus hábitos de alimentación entre los pétalos de las flores. Frecuentemente es necesaria la aplicación de insecticidas para reducir sus poblaciones, sin embargo, desarrollan rápidamente resistencia a estos productos (Powell y Linquist, 1992; Koehler, 1994).

e) Minadores (Diptera: Agromyziidae). Son insectos que pertenecen al género *Liriomyza* cuyas larvas son las causantes del daño en sus hospedantes al alimentarse en galerías que construyen entre el haz y envés de la lámina foliar.

Su control se realiza principalmente con la aplicación de insecticidas específicos; actualmente se ha desarrollado el control biológico utilizando avispas parásitas las cuales pueden usarse en cultivos semiperennes y perennes (Powell y Linquist, 1992; Koehler, 1994).

f) Fungus gnat (Díptera: Agromyziidae). Son moscas pequeñas, frágiles, gris oscuro o negras que se mantienen casi siempre sobre la superficie del sustrato o suelo, especialmente en las zonas húmedas. El daño se debe a que se alimentan de plántulas, raíces de esquejes, y semillas en germinación. En adición al daño físico por las larvas, la presencia de los adultos en las macetas reduce la calidad de venta. Las plantas que se desarrollan en sustratos con alto contenido de materia orgánica y mal drenaje tienen mayores problemas de ataque de fungus gnat.

Los programas de control de esta plaga involucran el uso de plaguicidas aplicados en drench; además, el control biológico es posible hacerlo usando nematodos y ácaros depredadores (Powell y Linquist, 1992; Koehler, 1994; Davis University, 2002).

g) Larvas (Lepidoptera: Noctuidae). Muchas especies de palomillas atacan plantas ornamentales en estado de larva. La mayoría de estas son palomillas nocturnas que ovipositan individualmente o en masas de huevos durante la noche. Las larvas al emerger se alimentan de follaje, tallos y ramas tiernas y flores; algunas especies perforan y barrenan los tallos y ramas.

Casi todos los grupos de plaguicidas han provocado resistencia en las poblaciones de estos insectos, sin embargo, su uso es aún el principal método de combate. El control biológico basado en la aplicación de insecticidas microbiales y liberación de parasitoides es una técnica aceptable de control, especialmente en invernaderos (Powell y Linqvist, 1992; Koehler, 1994).

h) Arañas rojas (Acari): Las arañas rojas son artrópodos muy pequeños de poco más de 0.5 mm de longitud que requieren de microscopio para su observación. Existen dos géneros de ácaros importantes cuyas especies son plagas de cultivos ornamentales, *Tetranychus* y *Oligonychus*, ambos con un amplio rango de hospederos. El daño lo causan por alimentación con sus partes bucales chupadoras con las que succionan la savia de los tejidos infestados. Todos los estadíos del ciclo de vida son causantes de los daños en las plantas, generalmente provocando pequeñas manchas cloróticas de apariencia moteada y deformaciones de la lámina foliar; en altas poblaciones invaden también otros tejidos e incluso toda la planta. Las arañas rojas son favorecidas por altas temperaturas, baja humedad relativa y exceso de polvo en la superficie foliar (Davis University, 2002).

Su importancia como plagas de ornamentales se ha incrementado en los últimos años a causa de su gran capacidad para desarrollar resistencia a plaguicidas; algunos de estos como los piretroides estimulan su reproducción. El uso de acaricidas debe estar bien fundamentado a fin de evitar estos riesgos; por lo que el manejo de la humedad y temperatura, así como el evitar la

acumulación de polvo en follaje y flores son medidas básicas para reducir las infestaciones (Powell y Linquist, 1992; Van Gundi *et al.*, 1999; Koehler, 1994).

3.8.2. Enfermedades y patógenos más importantes.

Las plantas ornamentales se encuentran sometidas a la acción de determinados agentes patógenos que frenan su desarrollo y producción, restándoles belleza y originalidad tanto en el colorido como en las formas, impactando negativamente en el mercado ocasionando pérdidas que representan entre un 25 a un 35 % del valor de las cosechas. Además, la reducción de la calidad de las plantas, repercute en la pérdida de credibilidad de las empresas dedicadas a esta actividad poniendo en riesgo su participación en el mercado (Strider, 1985; Daughthrey y Chase, 1993).

a) Enfermedades bacterianas.

Las bacterias comprenden un grupo diverso de microorganismos unicelulares que causan muchas enfermedades en plantas. Las especies más comunes en ornamentales pertenecen a los géneros *Xanthomonas* que causa manchas foliares y marchitamientos, *Erwinia* cuyas especies provocan pudriciones de esquejes, cormos y bulbos, *Pseudomonas* las cuales desarrollan manchas foliares, y *Agrobacterium*, principalmente *A. tumefaciens* cuyo ataque causa agallas de la corona (Van Gundi *et al.*, 1999).

Pudrición de esquejes. Por la forma de manejo, los esquejes tienen una gran herida en su base lo cual los hace muy susceptibles al ataque de bacterias, especialmente *Erwinia*. Este patógeno se desarrolla bien a temperaturas altas y mucha humedad. Los esquejes atacados muestran la base reblandecida y ligeramente de olor desagradable.

Tizón bacteriano. Esta enfermedad es causada por las especies del género *Xanthomonas*. Las plantas atacadas se marchitan sin mostrar pudrición de raíces ni cánceres en tallos o ramas. Al inicio de la enfermedad, una o dos hojas se tornan blandas y caen; posteriormente todas las hojas se reblandecen y se necrosan de forma similar al "quemado" causado por exceso de sales. Otro síntoma que puede presentarse es la aparición de manchas foliares irregulares, lo cual no siempre ocurre.

Manchas foliares. Las manchas foliares causadas por bacterias son muy similares a las de los hongos; sin embargo, las bacterianas al observarlas a contraluz presentan un aspecto translúcido y acuoso. En algunos casos las manchas están rodeadas de un halo clorótico. Los géneros que causan manchas foliares son *Pseudomonas* y *Xanthomonas*; se diferencian en que en el caso de *Pseudomonas* las hojas no se marchitan.

El control de las bacterias fitopatógenas es principalmente preventivo, basado en medidas culturales; siempre iniciando con el uso de materiales de propagación sanos, la no exposición de esquejes, bulbos y cormos a alta humedad y bajas temperaturas durante su preparación para el trasplante y siembra, así como la realización de podas y cortes rápidos y con navajas desinfectadas. En caso del desarrollo de brotes de enfermedad, se debe evitar el exceso de humedad en las hojas durante el riego, espaciar las plantas para mejorar la aireación y secado del follaje y sustrato, además de reducir la dosificación de nitrógeno durante la fertilización.

El control químico es limitado, pudiendo aplicar soluciones a base de cobre, sin embargo, en muchos casos se puede tener toxicidad en variedades susceptibles a este elemento (Powell y Linquist, 1992; Daughtrey *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 1995).

b) Enfermedades fungosas.

Existe una gran cantidad de especies de hongos que dañan los cultivos ornamentales, a pesar de ello es posible agruparlos con base a los tipos de síntomas que causan en sus hospedantes (Powell y Linquist, 1992; Romero, 1996).

Pudrición de esquejes y ahogamiento (damping off). De todas las enfermedades, el damping-off es la mas difícil de identificar en el campo, debido a que la pudrición de esquejes es causada por varios hongos pertenecientes a los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Botrytis*. El ahogamiento en semilleros y plántulas, comúnmente lo provocan *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. Además atacan a un amplio rango de hospedantes. Su incidencia es frecuentemente asociada con sustratos con alto contenido de materia orgánica, al exceso de humedad en el sustrato y temperaturas altas.

El control es fundamentalmente igual al usado para otros microorganismos del suelo: Uso de sustrato esterilizado, un buen drenaje, riego apropiado y plantación o siembra a profundidad adecuada, son medidas de manejo eficientes. Adicionalmente se deben mantener los semilleros y enraizadores a temperaturas de entre 25 y 30 °C. El manejo del material propagativo debe ser extremadamente cuidadoso evitando su manipulación excesiva. El tratamiento de semillas y esquejes con fungicidas como el Carbendazim y Benomilo reduce la incidencia de estos hongos. Sin embargo es necesario tomar en cuenta que los fungicidas en semilleros y enraizadores deben utilizarse sólo si es absolutamente necesario (Strider, 1985; Powell y Linquist, 1992; Romero, 1996; Casey, 2000).

Pudrición de raíz y corona: *Pythium* y *Phytophthora* son patógenos que presentan en su ciclo de vida esporas conocidas como zoosporas que nadan en el agua. Atacan una amplia variedad de cultivos, causando pudrición en raíces,

tallos y esquejes. Estos hongos generalmente no matan la planta rápidamente pero destruyen tejidos en los órganos atacados lo cual resulta en un crecimiento deficiente, amarillamiento, enanismo y marchitamiento de la parte superior. Estos organismos probablemente se encuentran en todo tipo de suelos, son diseminados fácilmente por el agua de riego y sustrato contaminado e invaden fácilmente los sustratos aún después de su esterilización.

Las medidas de control se fundamentan en un buen saneamiento del cultivo, desinfección de áreas de acceso a las unidades productivas, esterilización del agua de riego, uso de sustratos bien drenados y aplicación de fungicidas en drench (Powell y Linqvist, 1992; Romero, 1996; Horst & Nelson, 1997; Jarvis, 1997).

Otros hongos causantes de pudriciones: Similar a *Pythium* y *Phytophthora*, muchos otros hongos causan pudriciones de raíces y tallos. Estos patógenos viven en el suelo y tienen un amplio rango de hospedantes. Especies de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* y *Thielaviopsis* tienen un comportamiento similar, todos ellos persisten en el suelo durante muchos meses por medio de estructuras especializadas.

Su control involucra medidas de saneamiento tales como: desinfección del sustrato, evitar la plantación profunda, evitar encharcamientos por el uso de sustratos con buen drenaje, así como la aplicación de fungicidas que generalmente son diferentes a los usados para el control de *Pythium* y *Phytophthora* (Romero, 1996; Horst & Nelson, 1997; Jarvis, 1997).

Marchitez: *Fusarium oxysporum* y *Verticillium spp* son dos especies que atacan muchos cultivos florícolas invadiendo las raíces y taponando el sistema vascular que se torna oscuro, lo que provoca amarillamiento, achaparramiento y marchitez. La enfermedad afecta generalmente una parte o lado de la planta que es la que se marchita y ocasionalmente muere, esto provoca un síntoma

típico en plantas herbáceas perennes y semiperennes conocido como “cola de gallo”. Estos patógenos son favorecidos por condiciones de humedad y temperatura altas en el sustrato.

Su manejo requiere un buen saneamiento del sustrato y del material propagativo, así como evitar el estrés de la planta por exceso de agua. Para *Fusarium oxysporum* el mejor método de control en especies perennes y semiperennes es el cultivo de variedades resistentes, pero casi todas estas son de poco interés para los productores. El manejo del pH encalando el sustrato y fertilización con nitratos ha sido efectivo en crisantemo, áster, y gladiola. Generalmente la aplicación de fungicidas en cultivos infectados no tiene un buen control por lo que se requiere de variedades resistentes a su ataque (Powell y Linquist, 1992; Romero, 1996; Van Gundí *et al.*, 1999; Casey, 2000).

Cenicillas: Las cenicillas son hongos muy comunes en las plantas ornamentales y tienen una amplia distribución. Las especies principales pertenecen a los géneros *Erysiphe* y *Sphaerotheca*. Sus hospedantes incluyen a cultivos importantes como rosa, noche buena, clavel, crisantemo, begonia, impatiens y gerbera entre otros. El síntoma típico de ataque se presenta como un polvo blanquecino polvoriento sobre la superficie de hojas, tallos y flores, formado por los conidios. Generalmente no causan la muerte del hospedante pero las lesiones provocadas reducen la calidad de la planta o de las flores de corte, además de la deformación de los tejidos afectados.

Las cenicillas son particularmente severas en regiones semiáridas y son menos problemáticas en regiones con precipitación alta. Estos hongos son favorecidos por temperaturas altas y luminosidad baja; en condiciones de invernadero su daño es mayor.

A pesar de que el mejor método de control es el cultivo de variedades resistentes, existe poca información de estas en la floricultura. La aplicación de

productos químicos controla eficientemente estos patógenos, sin embargo el daño causado puede permanecer aún después de la muerte del hongo. La reducción de la humedad relativa dentro de los invernaderos y la ventilación durante la noche es un método cultural efectivo para el control de las cenicillas (Powell y Linqvist, 1992; Romero, 1996; Chase, 1997; Jarvis, 1997).

Royas: Los hongos causantes de royas en plantas ornamentales son altamente específicos y pertenecen a los géneros *Puccinia*, *Uromyces* y *Phragmidium*. Atacan cultivos importantes como geranio, crisantemo, clavel y rosa. La infección se caracteriza por la aparición de manchas amarillentas en el envés de las hojas, aunque pueden presentarse también en el haz. En condiciones favorables y hospedantes altamente susceptibles la infección abarca ramas y tallos. Los síntomas evidentes se presentan como pústulas formadas por masas polvorientas de esporas de color café rojizo a oscuro en las hojas y a veces sobre tallos.

Son hongos que se desarrollan bien en condiciones frescas con alta humedad relativa, la germinación de sus esporas es favorecida por el agua libre en la superficie foliar durante 6 a 8 horas.

Su control involucra el manejo de la temperatura manteniéndola arriba de los 25° C, riego por las mañanas, espaciamiento entre plantas que favorece la aireación y secado del follaje; y la aplicación de fungicidas específicos (Powell y Linqvist, 1992; Romero, 1996; Chase, 1997; Casey, 2000).

Mildiú o moho gris: El mildiú es causado por *Botrytis cinerea* que es un hongo saprofito ampliamente diseminado. También es uno de los patógenos más destructivos con un amplio rango de hospedantes. Los pétalos florales, tallos y hojas suculentas y tiernas son atacados por este hongo; las plántulas son especialmente susceptibles a su ataque. En la mayoría de los casos el moho se desarrolla en la superficie del tejido atacado cuando la humedad relativa es

elevada, las temperaturas frescas y una baja luminosidad son condiciones que también favorecen la esporulación del patógeno formando masas de esporas característicamente grisáceas.

Las medidas de control incluyen la eliminación de tejidos viejos, especialmente flores, para evitar su infección; incremento del aporte de calcio; aireación y ventilación del cultivo para evitar agua libre sobre los tejidos; regar en lo posible lo más temprano del día. A pesar de que muchos fungicidas son efectivos para el control de *Botrytis cinerea*, no todos pueden ser utilizados en los diferentes cultivos debido a que pueden ser fitotóxicos en muchas variedades comerciales. La aplicación de fungicidas debe realizarse de forma preventiva y en etapas tempranas del desarrollo del cultivo (Romero, 1996; Chase, 1997; Jarvis, 1997; Van Gundi *et al.*, 1999; Casey, 2000).

Manchas foliares y florales: Similarmente a las royas y cenicillas, los hongos causantes de manchas foliares y florales, se dispersan a grandes distancias por acción del viento. Los géneros más notables de este grupo son *Botritis*, *Septoria*, *Alternaria* y *Ascochyta*, los cuales son comúnmente encontrados causando daños a muchos cultivos de flores y follaje. Las infecciones se caracterizan por la aparición de manchas foliares bien delimitadas que en un inicio son cloróticas y que posteriormente toman un color café claro u oscuro. En las ramas y tallos jóvenes las manchas generalmente son más claras y pueden abarcar todo el órgano atacado y secarlo.

Los hongos que causan manchas requieren de humedad en la superficie foliar para poder infectar.

La mejor vía para su control es la aspersión de fungicidas a base de cobre o zinc con acción protectora para evitar su establecimiento e infección (Powell y Linqvist, 1992; Romero, 1996; Casey, 2000).

c) Enfermedades causadas por nemátodos.

Varias especies de nemátodos causan problemas en cultivos ornamentales. Estos organismos pueden causar lesiones o bien agallas en las raíces como sucede con las especies de los géneros *Pratylenchus*, *Paratylenchus* y *Meloidogyne*; consecuentemente su ataque se manifiesta en la parte superior de la planta como enanismo, pobre crecimiento y debilitamiento general. Los nemátodos sistémicos del género *Aphelenchoides* causan amarillamiento, deformaciones, torcimientos y cambios de color en las hojas y tallos, e incluso provocan su muerte.

El control de los nemátodos requiere de medidas de saneamiento del material propagativo, esterilización del suelo con fumigantes o pasteurización. Para nemátodos de raíces se debe aplicar Oxamyl granulado mezclado con el sustrato o en forma líquida en drench después de la plantación. Los nemátodos foliares son controlados eficientemente con la aspersión de Demeton (Powell y Linqvist, 1992; Jarvis, 1997; Casey, 2000).

d) Fitoplasmas.

Los fitoplasmas son microorganismos de alrededor de 1.2 a 500 nm de tamaño. Carecen de pared celular por lo que son parásitos obligados, pleomórficos. Son difíciles de cultivar en medios artificiales. Se diferencian de los virus en que poseen ARN, ADN y una membrana celular. Se especializan en infectar el floema causando problemas de taponamiento en el sistema vascular de las plantas. Son responsables de enfermedades en más de 200 especies de plantas. Los vectores de estos patógenos son las chicharritas (Homoptera: Cicadellidae) y Psilidos (Homoptera: Psillidae); además se pueden transmitir por injerto y no se transmiten mecánicamente (Powell y Linqvist, 1992; Jarvis, 1997; Van Gundí *et al.* 1999).

Los síntomas que producen son parecidos a los causados por algunos virus y viroides predominando los amarillamientos o bronceados, enanismo, acortamiento de entrenudos, flores estériles, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas, proliferación de bulbos y tubérculos aéreos y desarrollo de apariencia de escoba de bruja. (Powell y Linquist, 1992; Van Gundí *et al.* 1999) Su detección puede ser mediante los síntomas, por microscopía electrónica, microscopía de luz y actualmente por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Chase, 1997; Wick, 2000).

La prevención y control de fitoplasmas se puede hacer eliminando a las chicharritas y las plantas infectadas. Se deben aislar las plantas enfermas; es importante que las plantas estén separadas ya que puede haber transmisión por contacto de raíces. Se puede usar tetraciclina u oxitetraciclina para curar la enfermedad. Las dosis dependerán de las plantas a tratar.

Es importante que el material propagativo esté libre de fitoplasmas, siendo mejor utilizar plantas generadas por cultivo de tejido. El control de la maleza es importante para eliminar los reservorios de los insectos vectores y de los patógenos (Powell y Linquist, 1992; Van Gundí *et al.*, 1999; Casey, 2000)

e) Viroides.

Al igual que los virus, los viroides son extremadamente pequeños, su material genético está compuesto de RNA. Sin embargo, a diferencia de los virus, no contienen una cápsula de proteínas. Estos patógenos son causantes de algunas enfermedades en cultivos importantes como papa, tomate y frutales. Uno de los síntomas más característicos observados en las plantas infectadas es el achaparamiento o enanismo, acompañado de algunos amarillamientos y deformaciones de los puntos de crecimiento de las plantas. Su identificación se

basa en técnicas serológicas y de ingeniería genética (Chase, 1997; Davis *et al.*, 1999; Wick, 2000).

3.8.3. Enfermedades de origen viral.

Los virus son elementos genéticos que actúan como parásitos celulares especializados. Casi todos los grupos de organismos vivientes, multicelulares o unicelulares son susceptibles de ser infectados por virus. Son agentes patógenos que viven y se multiplican solo dentro de las células vivas de sus hospedantes, siendo entonces parásitos obligados (Mathews, 1991; Vega y Rivera, 2001).

Las enfermedades causadas por virus en las plantas pueden ser muy distintivas, o en otros casos ser extremadamente difíciles de reconocer. En algunos hospedantes producen síntomas típicos, pero en otros la sintomatología es muy diferente, aún tratándose del mismo virus por lo que se complica su identificación en campo (Wick, 2000).

3.8.3.1. Definición y generalidades.

Los virus son entidades compuestas de ácidos nucleicos y proteínas; el ácido nucleico en el 90 % de los virus de plantas es el RNA, sólo el 10 % están compuestos de DNA; algunos poseen una envoltura de lípidos. Su tamaño puede variar entre los 20 y 300 nm. La mayoría de ellos producen cuerpos de inclusión que en muchos casos pueden servir para su diagnóstico. Pueden presentar dos formas básicamente: Helicoidal e isométricos o icosaédricos (Powell y Linqvist, 1992; Van Gundí *et al.*, 1999; Vega y Rivera, 2001).

3.8.3.2. Importancia de los virus fitopatógenos.

La importancia de las enfermedades causadas por los virus fitopatógenos en cultivos ornamentales se ha incrementado en los años recientes. La presencia de virus en ellos, además de suponer una amenaza para la producción florícola en sí, constituye un riesgo para la horticultura en general, al actuar las especies ornamentales como fuentes de inóculo, reservorios y medios de diseminación de virus dañinos a las hortalizas (Dal Bo *et al.*, 1999; Vern, 1999).

Al igual que otros fitopatógenos, los virus pueden dispersarse de una región a otra en semillas u otros materiales de propagación aparentemente sanos sin ser detectados, lo cual incrementa el problema a los productores. (Powell y Linquist, 1992; Baulcombe *et al.*, 1993; Van Gundí *et al.*, 1999).

Los virus pueden causar diversos síntomas en la planta infectada pocos días después de la infección, sin embargo en muchas ocasiones el patógeno puede mantenerse latente durante mucho tiempo dependiendo de las condiciones ambientales y manifestarse de forma súbita en toda una plantación provocando pérdidas enormes al productor al reducir la calidad de venta final de las plantas afectadas (Gaebe, 2002).

Otra consideración con respecto a la importancia económica de los virus que atacan plantas cultivadas es el incremento de los costos de producción por el establecimiento de medidas de prevención a fin de evitar las infecciones virales. Tales medidas incluyen la aplicación de plaguicidas para controlar sus vectores; la producción de semilla libre de virus y el diseño de esquemas de certificación que permitan la provisión de plántulas y material propagativo sano (Garnsey, 1998).

3.8.3.3. Sintomatología.

Las enfermedades virales afectan a las plantas produciéndoles diversos síntomas, tales como: Mosaicos, rayados, clorosis de la hoja, aclaramiento de nervaduras, bandeo de nervaduras, anillos, puntos necróticos, puntas de tallos o nervaduras distorsionadas, hojas deformes, meristemos hinchados, enanismo, coloración anormal de las flores, afectan la reproducción, tamaño del fruto, reducen la cantidad de semillas, provocan esterilidad del polen, reducen viabilidad de las semillas, marchitez y muerte de las plantas (Bos, 1978; Cann, 1997, Gaebe, 2002).

Lo más frecuente es que dichas alteraciones sean perjudiciales a la planta, bien cuantitativamente por ocasionar una disminución de la producción o del rendimiento, bien cualitativamente porque deprecian su valor en el mercado. Sin embargo, en la horticultura ornamental existen algunos ejemplos en los que los síntomas de origen vírico tienen cierto valor estético y han sido o aún son explotados con fines comerciales (Powell & Linquist, 1992; Dreckmann, 2001; Gaebe, 2002).

La sintomatología ha sido el origen de la descripción de las enfermedades víricas y, como consecuencia, de la denominación de los virus que pudieran ser su causa. Sin embargo, su valor como criterio para su identificación es bastante relativo y en la mayoría de los casos es insuficiente basarse sólo en la observación de los síntomas para determinar con certeza cual es el virus responsable por lo que el diagnóstico por sintomatología debe considerarse solamente orientativo (Powell y Linquist, 1992; Van Gundi *et al.*, 1999)

La aparición y gravedad de los síntomas está condicionada por diversos factores, tales como el material vegetal, estado nutricional y etapa fenológica de las plantas en el momento de la infección, el tipo de virus y las condiciones ambientales, principalmente la temperatura. Además, no son raros los casos de

infecciones complejas de varios virus mezclados provocando que los síntomas mostrados por la planta puedan resultar confusos. También es importante considerar que puede haber infecciones latentes que sólo se manifiestan bajo condiciones especiales, limitando aún más la utilidad de la sintomatología como medio de identificación de una enfermedad viral. Por otro lado, las plantas atacadas por virus empiezan a mostrar síntomas aproximadamente 15 días después de la infección, actuando durante este tiempo como fuente de inóculo (Roselló y Nuez, 1999). A pesar de lo anterior, los síntomas, debido a que son el resultado concreto de la interacción virus-planta huésped, son los que determinan realmente el perjuicio causado a la economía de los productores (Albouy y Devergne, 2000).

3.8.3.4. Virus de importancia en los cultivos ornamentales.

No menos de 260 virus diferentes son capaces de infectar plantas ornamentales, cuyo grado de complejidad tiene relación con sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. Tales características permiten a los investigadores ubicarlos en los diversos grupos para su estudio (Elliot, 1996; Albouy y Devergne, 2000).

A pesar de la existencia de muchos virus que atacan plantas ornamentales (anexo1), hay algunos cuya importancia radica en su amplio rango de hospedantes y por ser reportados con frecuencia por los investigadores de diferentes países como los que causan mayores problemas en este tipo de cultivos (Van Gundí *et al.* 1999), entre estos destacan los siguientes:

- a) **ALFAMOVIRUS** (BROMOVIRIDAE): Virus Mosaico de la Alfalfa –AMV- (Alfalfa Mosaic Virus).

Morfología: Partículas baciliformes de diferentes tamaños (B, M, Tb, Ta) hasta 60 nm.

Genoma: Multipartita con tres RNA de cadena simple de polaridad positiva de kilobase (Kb), 3.6 (RNA-1), 2.5 (RNA-2), 2 (RNA-3).

Cápside: Una proteína de peso molecular en dalton (PM) $20-26 \times 10^3$.

Serología: ++ DD, ELISA o IEM.

Transmisión: Por pulgones en forma no persistente; ocasionalmente por semilla o por transmisión mecánica.

Síntomas: Provoca mosaicos y manchas anilladas o blanquecinas en las hojas, en ocasiones con deformaciones foliares. Puede permanecer latente en las plantas infectadas.

Hospedantes: En condiciones naturales infecta a más de 150 especies herbáceas o leñosas, destacándose las leguminosas. Dentro del grupo de ornamentales ataca hortensia, kalanchoe, petunia, crisantemo, coleo, clavel, impatiens, limonium, pelargonium o geranio, gloxinia, vinca o teresita, zinnia, entre otros.

b) CUCUMOVIRUS (BROMOVIRIDAE): Virus Mosaico del Pepino -CMV- (Cucumis Mosaic Virus).

Morfología: Tres tipos de partículas isométricas (B, M, T) de 29 nm.

Genoma: Multipartita con tres RNA de cadena simple de polaridad positiva de Kb 3.4 (RNA-1), 3 (RNA-2), 2.2 (RNA-3).

Cápside: Una proteína de peso molecular PM 26×10^3 .

Serología: +++ DD, ELISA o IEM.

Transmisión: Por pulgones de forma no persistente, también se transmite por semilla en algunos hospedantes; en otros se transmite mecánicamente.

Síntomas: Varían y dependen del cultivo que ataquen. En general produce enanismo, mosaico foliar, variegados, manchas anulares, distorsión de hojas, caída y distorsión de flores, necrosis foliar, enrollamiento de la hoja, moteados de las hojas y aclaración de nervaduras.

Hospedantes: Es un virus polífago con el mayor rango de hospedantes de los fitovirus. Se han reportado a más de 1000 especies de plantas pertenecientes a muchas familias botánicas, tanto mono como dicotiledóneas. En forma natural, el virus se presenta en muchas cepas que se distinguen entre sí por sus propiedades serológicas. Entre sus hospedantes ornamentales destacan, alcatraz, begonia, bugamvilea, crisantemo, clematis, coleo, ciclamen, clavel, cuna de moisés, dalia, delfinio, difenbachia, gladiolo, gerbera, geranio, hortencia, impatiens, iris, lily, noche buena, peperomia, salvia, violeta, vinca, zinia.

c) NEPOVIRUS (COMOVIRIDAE): Virus mancha anillada del tabaco -TRSV- (Tobacco Ring Spot Nepovirus)

Morfología: Tres tipos de partículas isométricas (B, M, T) de 28 nm.

Genoma: Bipartita con dos RNA de cadena simple de polaridad positiva Kb 7.2-8.4 (RNA-1), 3.9-7.2 (RNA-2)

Cápside: Una proteína de PM 55-60 $\times 10^3$.

Serología: ++DD, ELISA o IEM.

Transmisión: Es transmitido por el nemátodo *Xiphinema* sp. por semilla y mecánicamente.

Síntomas: Producen enanismo, mosaicos, manchas anulares y moteado de la hoja.

Hospedantes: Es un virus que se ha reportado atacando plantas de cormos y bulbos como la dalia, el gladiolo, la gloxinia, el iris y el lily; también ataca begonia, geranio, gladiolo, hortensia, impatiens, y rosa.

d) POTYVIRUS (POTYVIRIDAE): Existen más de 200 virus que pertenecen a este grupo cuyas propiedades son muy similares cuyo miembro tipo es el Virus Y de la papa (PVY), destacándose por su importancia en plantas ornamentales el virus mosaico amarillo del frijol (BYMV).

Morfología: Partículas filamentosas de 680-900 x 11-13 nm.

Genoma: Monopartita con un RNA de cadena simple de polaridad positiva de 8.5-10 Kb.

Cápside: Una proteína de PM 30-47 x 10³.

Serología: +++ ELISA o IEM.

Transmisión: Por pulgones en forma no persistente, y mecánicamente en gladiolo.

Síntomas: Causan principalmente mosaicos en sus hospedantes.

Hospedantes: Gladiolo, iris, lisianthus, pasiflora, violeta.

e) TOBAMOVIRUS: Virus Mosaico del Tabaco -TMV- (Tobacco Mosaic Virus)

Morfología: Partículas en bastoncillos rígidos de 300 x 18 nm.

Genoma: Monopartita con un RNA de cadena simple de polaridad positiva de 6.4 KB.

Cápside: Una proteína de PM 17-18 x 10³.

Serología: +++ DD, ELISA o IEM.

Transmisión. No se conocen vectores de este virus. Es fácilmente transmisible por contacto (mecánicamente). Las semillas pueden estar contaminadas externamente.

Síntomas: Este virus produce en las plantas ornamentales enanismo, mosaico, manchas necróticas y deformación de hojas en algunos casos y en otras de flores.

Hospedantes: Sobrevive bien en el suelo, en residuos de plantas y tuberías. Tiene una amplia distribución mundial y afecta a un amplio rango de hospedantes ornamentales entre los que destacan: Aralia, cyclamen, dalia, geranio, gladiolo, impatiens, iris, lily, lisianthus, petunia y tabaco ornamental.

f) TOSPOVIRUS (BUNYAVIRIDAE): Virus de la Marchitez Manchada del Tomate -TSWV- (Tomato Spotted Wild Virus) y Virus de la Mancha Necrótica del Impatiens -INSV- (Impatiens Necrotic Spot Virus)

Morfología: Ploemórfico (1), partículas esféricas con envoltura de 80-110 nm.

Genoma: Multipartita, tres RNA de cadena simple de 2.7×10^6 (L), 1.5×10^6 (M), y 0.6×10^6 (S)

Cápside: Varias proteínas de PM ($\times 10^3$) 78 (G1), 58 (G2), 28.8 (N) y 200 (L)

Serología: +++ ELISA o IEM.

Transmisión: Por trips de los géneros *Trips* y *Frankliniella* en forma persistente, por semilla y mecánicamente.

Síntomas: Ambos virus producen síntomas que varían dependiendo del cultivo que atacan. En general producen manchas cloróticas y necróticas, mosaico, enanismo, hojas bronceadas con anillos, flores con anillos y necrosis en las venas. Los tallos muestran estrias o rayas necróticas, muerte del ápice de crecimiento y necrosis severa.

Hospedantes: Tanto TSWV como INSV están ampliamente distribuidos y atacan gran variedad de cultivos, entre los ornamentales se distinguen: Agapando, alcatraz, alelí, amarilis, aralia, aster, begonia, bromelias, caléndula, crisantemo, cineraria, clavel, cyclamen, cymbidium, dalia, difenbachia, geranio, gerbera, gladiolo, gloxinia, gipsofila, hortensia, impatiens, iris, kalanchoe, lily, limonium, petunia, salvia, vinca, violeta, zinia entre muchos otros.

3.8.3.5. Aspectos epidemiológicos.

A pesar de que en 1998 se cumplieron cien años del estudio de los virus, sólo recientemente, gracias al estudio de sus funciones genéticas y de su interacción con la célula huésped, se han empezado a entender los procesos de las patogénesis virales (Vega y Rivera, 2001).

A partir de 1983, la investigación sobre los virus fitopatógenos ha jugado un papel importante en la formulación de modelos para el entendimiento de los mecanismos de la recombinación del genoma viral, la función de los plasmodesmos, la adquisición de resistencia sistémica por parte de las plantas infectadas, y el desarrollo de métodos para la detección de estos patógenos. Todo ello con la finalidad de lograr un manejo mas eficiente de las enfermedades que causan en los cultivos (Zaitlin y Palukaitis, 2000).

El proceso de las enfermedades virales inicia cuando los virus penetran en los tejidos de la planta a través de la infección de un grupo de células. La infección puede ser resultado de un daño físico causado por un objeto o por un insecto al alimentarse. Una vez que los virus están dentro de las células del hospedante, se apropian de su sistema metabólico e inducen a este a producir sus diferentes componentes comenzando su replicación y multiplicación; en cuestión de horas son capaces de infectar otras células vecinas y finalmente invaden el tejido vascular y el citoesqueleto moviéndose a través de estos a toda la planta; como patógenos sistémicos pueden ser transferidos a nuevas plantas por los insectos, especialmente trips, pulgones y moscas blancas (Costa, 1976; Nault y Ammar, 1989), en las manos de los trabajadores o en herramientas de poda y corte, o bien en semillas y esquejes provenientes de plantas madre infectadas e incluso por contacto de planta a planta (Powell y Linquist, 1992; Van Gundi *et al.*, 1999; Dreckmann, 2001; Gaebe, 2002).

La diseminación de una virosis depende de muchos aspectos, cuyo conocimiento es indispensable para establecer los métodos de lucha adecuados, eficaces y racionales. Los diferentes factores epidemiológicos de la diseminación de las virosis, afectan a las plantas hospedantes del virus y al vector. También se indica que en un sistema "virus-vector-planta" dado, la importancia de la diseminación es función del origen del virus, de la actividad de los vectores y de la sensibilidad de la planta al virus, además de las condiciones

ambientales (Pirone y Harris, 1977; Matthews, 1991; Baulcombe *et al.*, 1993; Munford *et al.*, 1996).

En el caso de las especies ornamentales, las fuentes de inóculo primario están representadas por las plantas enfermas introducidas durante la plantación del material vegetal. Estos focos primarios de infección, que se sitúan en el interior mismo del cultivo, son los más peligrosos. Las demás fuentes posibles de virus están representadas por los cultivos próximos o por rebrotes infectados. En este sentido, las plantaciones al aire libre son más difícilmente protegibles que las efectuadas bajo cubierta, y los riesgos son tanto mayores cuanto más amplia es la gama de hospedantes del virus (Sidek *et al.*, 1993).

En el caso de los virus polífagos, sus reservorios son abundantes porque todas las plantas hospederas son potencialmente reservas de estos. Asimismo, las malas hierbas juegan un papel de plantas de reserva y permiten con frecuencia la sobrevivencia de los virus fuera de los períodos de cultivo y de una a otra estación además son en muchos casos, importantes reservorios de sus vectores, lo cual da mayor prioridad al establecimiento de medios más efectivos de control de estos patógenos a través del conocimiento de sus relaciones ecológicas con las malezas (Mink, 1993; Sidek, 1999).

3.8.3.6. Control de enfermedades causadas por virus.

La adecuada identificación de patógenos virales es el paso previo para la elaboración de estrategias de control (Alcalde *et al.*, 1999). Las características epidemiológicas de los virus fitopatógenos hacen que su control resulte complejo. En muchos casos, tanto el virus como su vector disponen de forma prácticamente ininterrumpida, espacial y temporalmente, de gran cantidad de hospedantes que les permiten perpetuarse en el campo. Sin embargo debido a que estas enfermedades ocasionan grandes pérdidas en los cultivos se está

buscando la manera de combatirlas (Cann, 1997). En la investigación agrícola, se han podido obtener variedades con resistencia a uno o mas virus; se han diseñado estrategias para controlar los vectores y para obtener plantas libres de virus (Vega y Rivera, 2001).

No existen productos viriscidas, los virus deben controlarse con métodos preventivos ya que una vez que infectan a la planta prácticamente es imposible evitar el daño y en muchos casos la muerte de estas. De acuerdo con Jarvis, 1997, las medidas fitosanitarias contra estos patógenos están orientadas a reducir el número de reservorios del virus que actúan como focos de infección o dificultar e incluso impedir la transmisión del virus por el vector, entre tales medidas destacan las siguientes:

a) Reducción de la fuente de inóculo.

Comúnmente los virus tienden a persistir y acumularse en la mayoría de los órganos vegetativos de propagación de las plantas. Sin embargo, la mayoría de los virus son excluidos de las semillas y de las yemas de plantas infectadas.

a.1. Material certificado. El uso de semilla sana y la micropropagación pueden eliminar los riesgos de diseminación de estos patógenos. Las plantas madre procedentes de centros de producción no certificados pueden representar un foco primario de infección, por lo que debe evitarse su utilización.

El uso de material certificado es muy importante; se incluye el material proveniente de cultivo de tejidos. Una vez obtenido este material es necesario conservarlo en condiciones adecuadas evitando su contaminación ya que estas plantas serán las que proporcionarán los esquejes para la plantación del cultivo comercial, y esta técnica no protege a las plantas de infecciones posteriores (Fernández, 1999).

a.2. Culturales. Eliminación de maleza dentro de la unidad productiva y en franjas de 5 a 10 metros en los bordes del terreno o invernadero y uso de sustrato esterilizado. Para algunos virus como el TSWV es recomendable la eliminación de los residuos de la cosecha anterior que funcionan como fuente de inóculo primario (Prins and Goldbach, 1998; Roselló y Nuez, 1999). Cabe destacar que la eliminación de maleza próxima al cultivo es contraproducente cuando las hierbas ya están muy grandes y tienen flores, ya que provoca la migración de los vectores, especialmente de los trips, al cultivo aunado a la eliminación de los enemigos naturales presentes.

b) Control de la transmisión.

Evitar la transmisión de los virus es una actividad determinante en la aparición y desarrollo de las enfermedades y su nivel de repercusión sobre la calidad de las plantas ornamentales. Ello implica la aplicación de técnicas que reducen los riesgos de contagio durante las diversas actividades de manejo de los cultivos ornamentales (Prins and Goldbach, 1998).

b.1. Culturales. Desinfección de las herramientas, vestimentas, maquinaria; uso de trampas para capturar a los vectores, uso de termoterapia; destrucción de plantas enfermas; mantener las plantas madre aisladas de las plantas en producción.

b.2. Control del vector. El control del vector presenta mayores dificultades en cultivos al aire libre que bajo invernadero debido a la movilidad de los vectores, especialmente trips y mosca blanca; además de que en los invernaderos el acceso de los insectos puede ser más restringido (Ullman *et al.*, 1997).

b.2.1. Químicos. Debe estar basado en el monitoreo constante de flores y brotes, así como el trampeo de vectores. El control químico debe dirigirse a los insectos vectores, especialmente áfidos y trips; sin embargo debe considerarse

que el uso de insecticidas es poco eficiente en el control de enfermedades virales ya que es muy probable que los insectos vectores transmitan el virus antes de que el insecticida surta efecto (Pappu *et al.*, 1995) e incluso se sabe que con la aplicación de ciertos insecticidas se incrementa la incidencia de algunos virus como el TSWV (Munford *et al.*, 1996). También es importante considerar el nivel de resistencia que adquieren los vectores a los plaguicidas.

b.2.2. Control físico. La utilización de mallas anti-insectos en los invernaderos puede ser una buena solución en este tipo de cultivos al evitar las infestaciones y disminuir la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, es necesario restringir el acceso a las áreas de producción para evitar la introducción de los vectores al invernadero. En apoyo a esto se recomienda la utilización de trampas pegajosas para la detección de los insectos a fin de tomar medidas oportunas para su control.

b.2.3. Control biológico. Generalmente este método tiene poco efecto sobre el control de los virus porque aún unos pocos vectores que sobrevivan y permanezcan infectivos son capaces de transmitirlos y causar graves daños al cultivo. Por ello es necesario combinar la lucha biológica con la aplicación de productos específicos compatibles con los enemigos naturales de los vectores, sin embargo esta medida no garantiza el éxito por lo que su uso es muy limitado.

c) Control Genético. El método más eficaz para el manejo de los virus es el uso de variedades tolerantes o resistentes, sin embargo, la resistencia natural de las plantas a los virus es limitada. Dos han sido las principales estrategias de trabajo para la obtención de resistencia genética: la búsqueda de fuentes de resistencia en especies relacionadas y desarrollo de plantas transgénicas con resistencia procedente del propio patógeno. El desarrollo de estas variedades se basa en la utilización de genes virales o de información en la selección para

la resistencia con apoyo de la biotecnología (Powell y Linquist, 1992; Van Hundi *et al.*, 1999).

d) Biotecnología: La utilización de cultivos desarrollados por la ingeniería genética usando la técnica de protección cruzada es una técnica efectiva para el manejo de los virus en varios cultivos. Esta técnica consiste de la transformación de plantas a las cuales se les han introducido porciones del genoma viral que promueven la resistencia a infecciones posteriores de virus homólogos, y en algunos casos a virus no homólogos. El resultado final es la interferencia del proceso de multiplicación del virus en la planta a través de la interrupción de la producción de ARN mensajero viral (Pappu *et al.*, 1995; Vaira *et al.*, 1995).

Las posibilidades en este campo son muy amplias y pueden reducir en el futuro los efectos adversos de los virus fitopatógenos. Actualmente se está investigando sobre la expresión de las glicoproteínas en cultivos de plantas transgénicas que bloquean la adquisición de partículas virales por los vectores; sobre la expresión del bloqueo del movimiento de las proteínas virales a través de las membranas celulares (Ares *et al.* 1998; Carrillo *et al.*, 1998) y sobre la expresión de anticuerpos específicos como la producción de secuencias de DNA de interferencia que hibridan con los ácidos nucleicos virales y detienen su síntesis. (Goldbach and Peters, 1996; Daub *et al.*, 1997; Roselló y Nuez, 1999; Rubio *et al.*, 1999).

3.8.3.7. Métodos de detección, identificación y caracterización de virus fitopatógenos.

En los sistemas de manejo fitosanitario, la detección e identificación oportuna del inóculo viral adquiere gran importancia para evitar su dispersión e introducción a zonas libres, así como para implementar las medidas de

prevención y control de estos patógenos (Alegría *et al.*, 2001). Según Vega y Rivera, 2001, durante los últimos veinte años, se han desarrollado sistemas y protocolos confiables y rápidos para la detección oportuna de los virus que infectan plantas (Anexo 2).

Los virus son muy pequeños, por lo que para poder ser observados, se requiere del uso del microscopio electrónico. Por lo que su detección, identificación y caracterización se efectúa por medio de la observación de los síntomas que se presentan en las plantas enfermas, pruebas de transmisión, sintomatología en plantas hospederas e indicadoras, tipo de partícula, inclusiones virales, serología y detección del ácido nucleico viral. Debido a la gran variabilidad de los virus, su identificación y caracterización adecuada requiere del uso de más de un método a fin de precisar el o los virus bajo estudio (Streets, 1984; Wick, 2000; Alegría *et al.*, 2001).

3.8.3.7.1 Transmisión mecánica.

La capacidad de ser transmitidos de planta a planta en forma mecánica es una característica importante de un gran número de virus, pero debe tomarse en cuenta la influencia de la temperatura y otros factores ambientales, además del tipo y concentración de los aditivos usados para realizarla experimentalmente (Bock, 1982). Para aprovechar esta característica de los virus en los procesos de identificación, se requiere del cultivo de plantas indicadoras sanas y en condiciones de ambiente controlado. De ello depende la manifestación de los síntomas típicos, así como su periodo de aparición, que va de 3 a 6 días en el caso de los locales en las hojas inoculadas, y hasta de 12 a 20 días para los sistémicos, y aún más si se trata de la infección por injerto en plantas leñosas (Albouy y Devergne, 2000).

3.8.3.7.2. Detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales.

El uso de plantas indicadoras es posiblemente el método más antiguo utilizado para la identificación de los virus fitopatógenos. Su uso es uno de los primeros pasos en el proceso de confirmación de la naturaleza de una enfermedad causada por virus; debido a que con esta técnica se precisan sus propiedades infecciosas, permitiendo frecuentemente su identificación. Las técnicas de transmisión varían dependiendo del virus, así como del tipo y especie de planta infectada (Albouy y Devergne, 2000).

El rango de hospedantes de un virus está determinado por la expresión de los síntomas causados en las plantas indicadoras, por las condiciones ambientales en las que se mantengan estas, además de la variante del virus (Hamilton *et al.*, 1981).

3.8.3.7.3. Microscopía de luz.

De acuerdo con Cárdenas (1999), la utilización de las inclusiones virales inducidas en las células de los hospedantes infectados, es una técnica cuya utilidad se manifiesta al evidenciar la presencia de virus a partir de la inducción de partículas específicas de los diferentes grupos de virus, y son auxiliares tanto en el diagnóstico de una enfermedad de origen viral, como en la clasificación de los virus en género, familias y variantes.

Tanto su distribución en la planta, como su forma, tamaño, localización dentro de la célula y composición varían dependiendo de la interacción virus-planta hospedante (Anexo 3).

3.8.3.7.4. Microscopía electrónica.

La observación de las partículas virales a partir de extractos de tejido vegetal infectado usando el microscopio electrónico, es una técnica ampliamente considerada para la detección de virus y hace posible su identificación con base a criterios morfológicos (Milne y Luisoni, 1977).

Su fundamento es la unión de anticuerpos específicos a un virus sobre una rejilla de membrana de formvar que se contrasta con acetato de uranilo para la detección de los virus atrapados por los anticuerpos (Milne y Luisoni, 1975). Tiene como ventaja el que se realiza relativamente rápido y es factible realizarla directamente de extractos de savia; sin embargo, tiene la desventaja de que es muy limitada en su aplicación a un gran número de muestras, debido a que los diferentes grupos de virus pueden tener mucha variabilidad en su longitud a pesar de tener la misma forma, reduciéndose su valor como criterio identificativo, requiriendo además de tener acceso a un microscopio electrónico (Albouy y Devergne, 2000).

3.8.3.7.5. Extracción y análisis electroforético de RNA de doble cadena.

El método de purificación y análisis de RNA de doble cadena (RNA_{dc}), fue desarrollado por Morris y Dodds (1979), quienes la usaron para aislar y analizar el material genético de virus y hongos fitopatógenos. Está basado en el proceso de replicación de los virus dentro de las células vegetales que tiene como producto intermedio cadenas dobles de RNA llamadas formas replicativas, las cuales se encuentran de forma consistente en las plantas infectadas por virus de RNA de cadena sencilla, y normalmente no se presentan en plantas sanas.

Aproximadamente el 90 % de los virus fitopatógenos están constituidos por cadenas simples de RNA. Esta técnica tiene la ventaja de ser sencilla y

relativamente rápida ya que se requieren de 8 a 12 horas para la extracción del RNAdc. Es un método de análisis no específico que permite detectar la mezcla de virus fitopatógenos diferentes, además de virus satélites que normalmente no son detectados por otras técnicas (Valverde *et al.*, 1990).

3.8.3.7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa de la Transcripción Reversa (RT - PCR).

Las técnicas de PCR y RT – PCR son altamente específicas y sensibles en el diagnóstico de virus fitopatógenos (Sayki *et al.*, 1988). Su principio es relativamente simple, se basa en la capacidad de síntesis de una cadena de DNA por una enzima de replicación, la DNA polimerasa, utilizando oligonucleótidos de secuencias cortas de alrededor de 20 pares de bases que son complementarios del DNA que se amplifica mediante cambios de temperatura (Innis *et al.*, 1990; Albouy y Devergne, 2000).

3.8.3.7.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de fitoplasmas.

Los fitoplasmas en las plantas usualmente se encuentran en concentraciones muy bajas, además de que están localizados en tejidos muy específicos, por lo que es difícil detectarlos. Una metodología alterna para resolver este problema es la de PCR anidada (Nested), la cual ha permitido la detección de fitoplasmas con una alta sensibilidad y especificidad. Este ensayo se realizó con base al protocolo propuesto por Leyva y Martínez en el 2000.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Recorridos de campo.

Se realizaron recorridos durante el 2000 y 2003 en instalaciones de productores del estado de Morelos, tanto en sistemas de producción a cielo abierto, como bajo malla sombra y en invernadero. Estos recorridos se efectuaron en las zonas representativas de la floricultura del estado abarcando los Municipios de Cuernavaca, Jiutepec y Yautepec de la Región I o Noroeste; Cuautla de la Región II o Noreste, y Xochitepec de la Región IV o Suroeste que concentran la mayoría de productores de plantas ornamentales del estado (Cabrera y Orozco, 2002).

4.2. Selección y colecta de las plantas.

Se seleccionaron y colectaron ejemplares que presentaron síntomas cuyo origen se sospechó eran causados por virus (Anexo 4). Algunas se colectaron en sus macetas y de otras se colectaron follaje y ramas. Después se trasladaron a los invernaderos de virus del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH para los ensayos correspondientes. Las especies analizadas aparecen en el Anexo 5.

4.3. Ubicación del experimento.

El presente trabajo se realizó tomando como base los protocolos propuestos por Dijkstra y Jasper (1998), se llevó a cabo en el invernadero y en el Laboratorio

de Virología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, así como en el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO de la FES-Iztacala de la UNAM realizándose los ensayos siguientes: Transmisión mecánica, detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras y diferenciales, serología por ELISA, caracterización de las partículas virales por microscopia de luz, microscopia electrónica, extracción de DNA, y análisis Southern y PCR (Anexo 2).

4.4. Detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales.

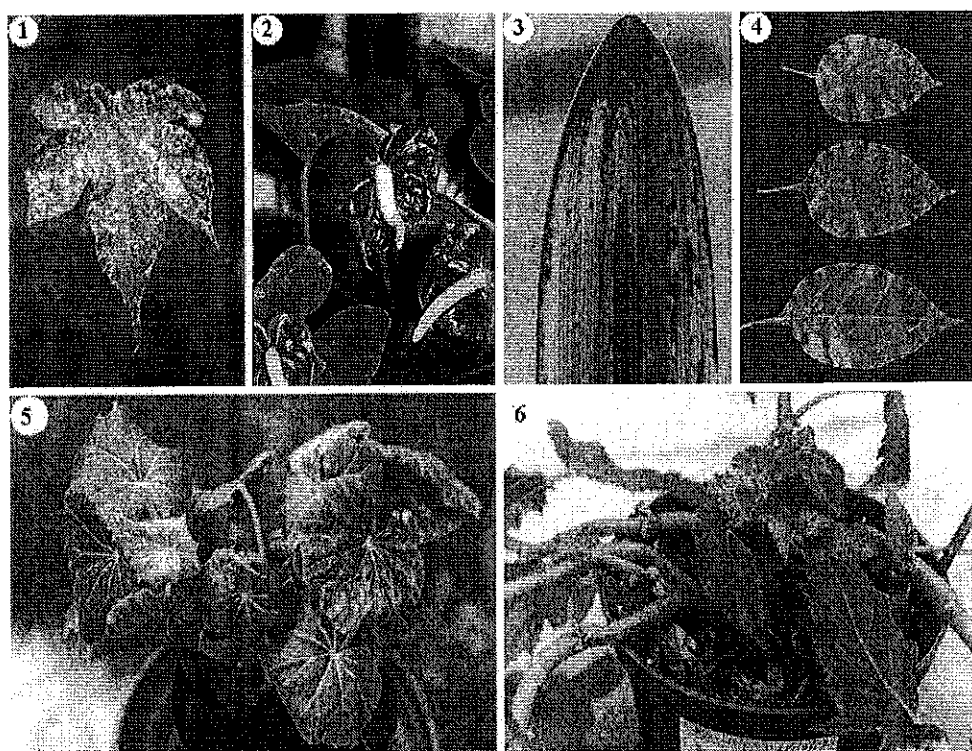
Esta técnica fue usada como contraprueba de los ensayos inmunoenzimáticos y para el mantenimiento de los aislamientos. Se buscaron los hospedantes mas adecuados para determinar el género viral con el menor número de especies en las condiciones del ensayo.

Con las plantas colectadas que presentaban síntomas típicos (Figuras 2 a 8 y Anexo 5) se realizaron pruebas de transmisión mecánica con savia cruda obtenida de macerados de tejidos infectados e inoculando plantas indicadoras y diferenciales, utilizándose el siguiente rango de hospedantes: Quelite (*Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*), Gonfrena (*Gonhrena globosa*), Toloache (*Datura stramonium*), Chile (*Capsicum annum*), Jitomate (*Lycopersicum esculentum*), Tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* , *N. Glutinosa*, *N. Rustica*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*).

Se maceraron hojas de plantas con síntomas en solución amortiguadora 0.02 M de fosfato de sodio, pH 7.2; los extractos fueron frotados con isótopos de algodón humedecidos en ellos en hojas de plántulas sanas con 2 a 4 hojas verdaderas, previamente espolvoreadas con carborundum. Las hojas inoculadas fueron lavadas someramente con agua corriente para eliminar los

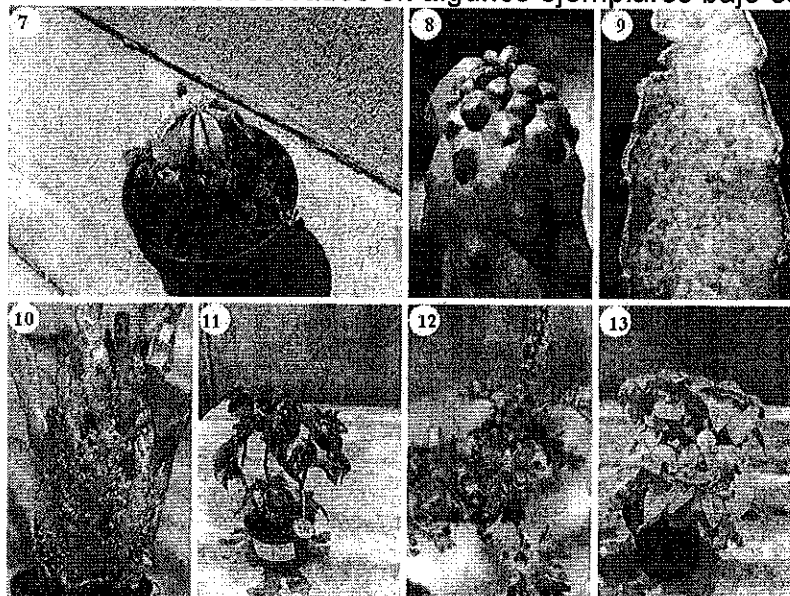
residuos del macerado y el carborundum de acuerdo con (May, 1985). Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero a temperatura de 25-35 °C un tiempo variable bajo observación hasta la aparición de síntomas o por un mes. Durante este periodo se tomaron datos sobre los síntomas que presentaron y se seleccionaron las que mostraron una sintomatología típica.

Figura 2: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio.



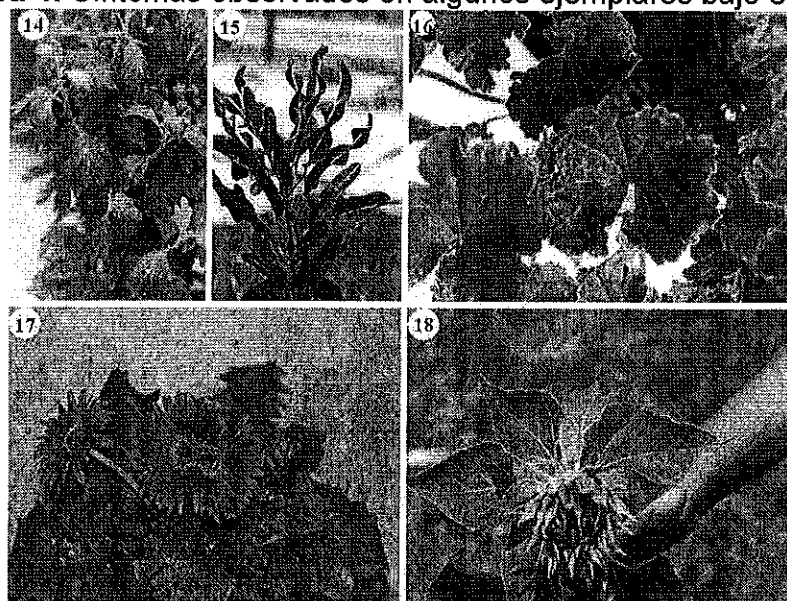
- 1.- Abutilón (*Abutilon x hybridum* Hort.), Mosaico y moteado; 2.- Anturio (*Anthurium andreanum* Lind.), deformación de espádice y bráctea, amarillamiento; 3.- Azucena (*Hippeastrum hybrid* Lectin.), mosaico; 4.- Bouganvillea (*Bougainvillea glabra* Choisy), mosaico; 5.- Begonia cerosa (*Begonia x hiemalis* L.), mosaico y amarillamiento de nervaduras; 6.- Begonia Real (*Begonia rex* L.), reducción y deformación de hojas.

Figura 3: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio.



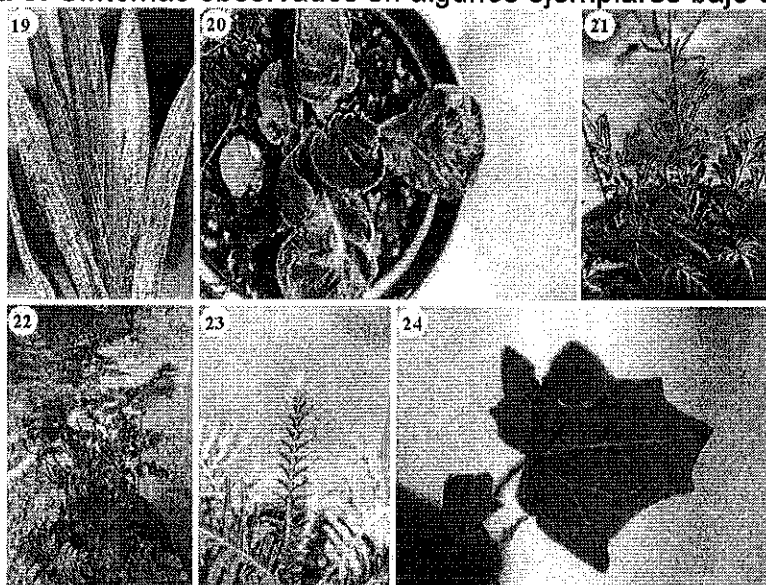
7.- Biznaga (*Mamillaria* sp L.), mosaico amarillo; 8.- Cactus (*Scontria chotiya* L.), deformación; 9.- Pitaya (*Hylocereus* sp L.), moteado; 10.- Nopal (*Opuntia linguiformis* D. Griffiths), moteado y amarillamiento; 11.- Coleo vareigado (*Coleus blumei* L.), deformación de hojas; 12.- Coleo Rizado (*C. blumei* L.), proliferación foliar; 13.- Coleo amarillo (*C. blumei* L.), reducción de lámina foliar.

Figura 4: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio.



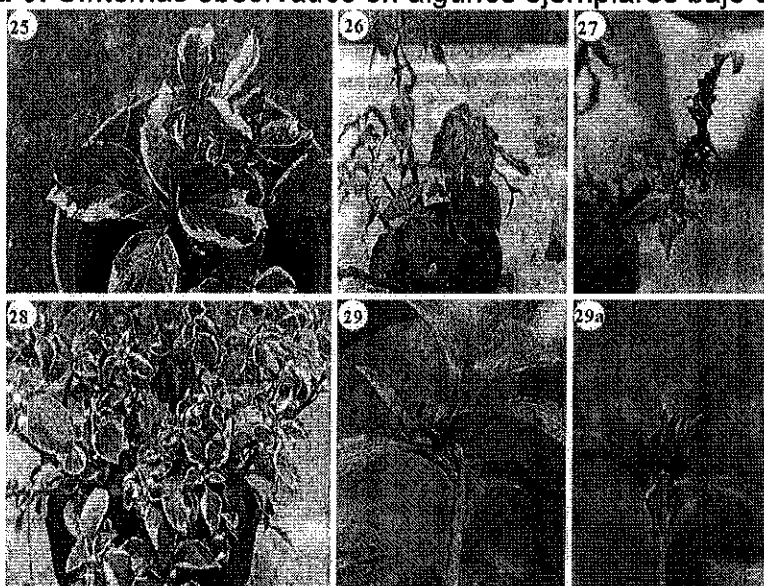
14.- Crisantemo (*Chrysantemum x morifolium* Ramat.), moteado amarillo; 15.- Croto (*Codiaeum variegatum* L.), deformación foliar; 16.- Geranio (*Pelargonium hortorum* Bailey), amarillamiento de nervaduras; 17.- Gerbera (*Gerbera jamesonii* Boulus y Hook), flor doble; 18.- Girasol (*Helianthus annum* L.), moteado, amarillamiento de nervaduras, deformación de hoja, deformación de inflorescencia.

Figura 5: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio.



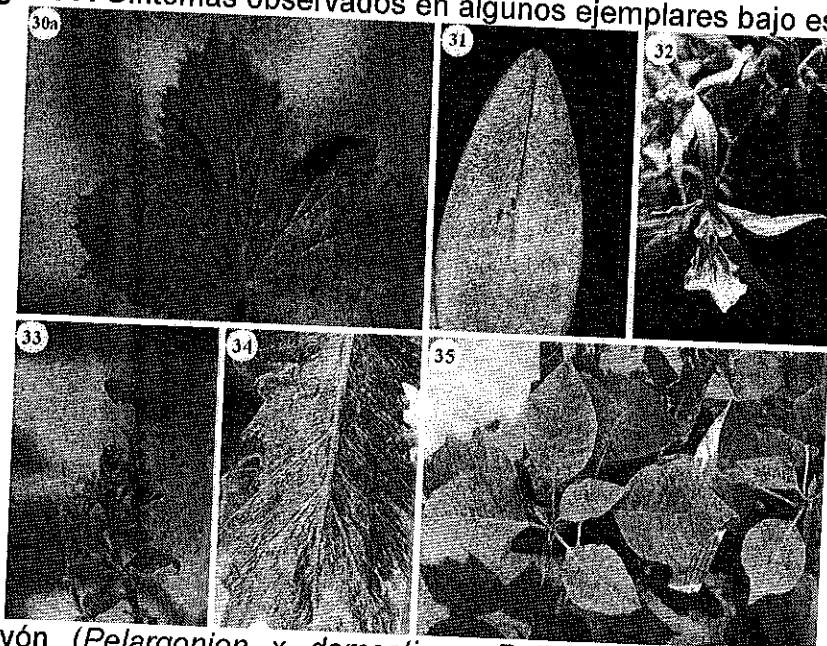
19.- Gladiola (*Gladiolus hortulanus* Bailey), mosaico; 20.- Gloxinia (*Sinningea speciosa* Hiern), amarillamiento nervaduras; 21.- Helecho Daisy (*Pteridium* sp L.), reducción foliar, deformación de fronda; 22.- Helecho leather (*Rumohra adiantiformis* G. Forst.), amarillamiento, deformación de fronda; 23.- Helecho Boston (*Blechnum* sp L.), reducción foliar; 24.- Hiedra gold (*Hedera helix* L.), amarillamiento de nervaduras.

Figura 6: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio.



25.- Hortensia (*Hydrangea macrophylla variegata* Ser.), deformación foliar, amarillamiento; 26, 27.- Impatiens (*Impatiens waleriana* Hook), marchitez, manchas necróticas, mosaico, reducción foliar; 28.- Impatiens variegado (*Impatiens balsamina variegata* L.), amarillamiento y proliferación foliar; 29 y 29 a.- Lily (*Lilium maculatum* Thumb.), mosaico amarillo, bulbos aéreos.

Figura 7: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio



- 30a.- Malvón (*Pelargonion x domesticum* Bailey), moteado amarillo; 31.- Orquídea (*Cymbidium* sp L.), mosaico amarillo; 32. Orquídea (*Odontoglossum* sp L.), mosaico, reducción de lámina foliar; 33.- Petunia (*Petunia hybrida* Hort. y Vilm.), proliferación foliar 34.- Filodendro (*Philodendron selloum* Koch), mosaico; 35.- Noche buena (*Euphorbia pulcherrima* Wild y Klotzsch), mosaico.

Figura 8: Síntomas observados en algunos ejemplares bajo estudio



- 36a y 36b.- Rosa (*Rosa hybrida* L.), mosaico, moteado, anillos amarillos, variegado; 37a y 37b.- Cuna de Moisés (*Spathiphyllum* sp L.), mosaico.

4.5. Detección serológica por medio de ELISA.

Se desarrollaron protocolos de ELISA y DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) para detectar infecciones virales directamente en muestras de campo y hospedantes indicadores (Matteoni & Allen, 1989; Sherwood, 1989; Dal Bó *et al.*, 1995).

Se utilizaron antisueros policlonales comerciales (Adglia, Co.) para la detección de Geminivirus, Potyvirus, Tobamovirus, Potexvirus, virus mosaico del pepino (CMV), virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus jaspeado del tabaco (TEV), virus marchitez manchada del tomate (TSWV), virus mancha necrótica del impatiens (INSV), virus mancha anular del tabaco (TRSV), virus mosaico del tabaco (TMV), virus enanismo arbustivo del tomate (TBSV), virus estriado de tabaco (TSV), virus mosaico amarillo del frijol (BYMV), entre otros, a una dilución de 1/1000 y se siguieron las instrucciones del fabricante.

4.6. Microscopía de luz.

Esta técnica se realizó siguiendo la metodología propuesta por Cárdenas (1999), para la tinción y observación al microscopio de las inclusiones virales inducidas en las células de algunos hospedantes.

4.7. Microscopía electrónica.

Se obtuvieron extractos de algunas especies de plantas infectadas con virus; colocando una gota en rejillas de cobre previamente preparadas con fonvar y recubiertas con carbono, después de cinco minutos se retiraron las rejillas y se lavaron con agua destilada; secándose con papel filtro.

Posteriormente se transfirieron las rejillas a portaobjetos colocándolas dentro de una gota de acetato de uranilo al 2% (pH 6.8) durante cinco minutos, se lavaron y secaron. Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Mod. Jeol 100 CX.

4.8. Extracción y análisis de RNA de doble cadena.

Se obtuvo RNA de doble cadena (RNA-dc) a partir de 3.5 g de tejido enfermo con virus, utilizando columnas de cromatografía preparadas con celulosa CF-11. El RNA-dc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, a 100 volts por 3.5 hrs. Se incluyeron como marcadores de peso molecular, los RNA-dc de tobacco mosaic virus (TMV = 4.3 y 0.4×10^6 Daltons) y cucumber mosaic virus (CMV = 2.0 , 1.9 , 1.3 y 0.5×10^6 Daltons), además de los tratamientos enzimáticos con RNAasa y DNAasa de los extractos de RNA-dc obtenidos de las plantas enfermas.

4.9. Extracción de DNA y PCR.

Para virus se hizo la extracción de ácidos nucleicos totales de hojas de plantas infectadas. Las muestras se analizaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon en buffer TBE (50 mM Tris-borate, pH 8.0, 1.25 mM EDTA). Se utilizaron sondas marcadas con Dogoxigenina. Los ensayos PCR y rt-PCR se realizaron utilizando primers específicos a los virus encontrados y se analizaron también en ensayos Southern y Northern. Para fitoplasmas se realizó el ensayo de PCR anidado (Nested) propuesto por Leyva y Martínez, 2000).

V. RESULTADOS

Por las características del trabajo no fue posible efectuar todas las pruebas a todas especies de plantas; debido principalmente a la disponibilidad de equipo, materiales y reactivos específicos para todos los posibles virus, viroides y fitoplasmas sospechosos de ser los causantes de la sintomatología observada. En dalia, petunia, rudbequia, sinangea y vinca, no se efectuó ningún ensayo ya que estas plantas murieron rápidamente en el invernadero. En plantas de Azucena, Cactus, y Gladiolo se efectuaron todas las pruebas para la identificación y caracterización de los virus. El resumen de los resultados de los ensayos se observa en el Cuadro 2. Donde: + = Prueba positiva (en tres niveles + bajo a +++ alto); - = Prueba negativa; * = Prueba no efectuada. Este cuadro muestra los resultados del ensayo ELISA donde se observan los virus más frecuentemente encontrados en las plantas ornamentales estudiadas, así como las mezclas de virus presentes en ellas. La figura 9 muestra algunos resultados de las pruebas realizadas a diferentes plantas ornamentales.

Cuadro 2. Resumen comparativo de las técnicas de los ensayos del experimento.

Cultivo	T. Mec.	ELISA	Mic. luz	Mic. Elect.	ds-RNA	rt-PCR virus RNA	PCR VIRUS DNA
Abutilón	-	Geminivirus	*	*	*	*	Geminivirus
Alcatraz	-	*	*	*	*	*	*
Alelí	+++	*	*	*	*	*	*
Anturio	-	-	*	*	*	*	*
Azucena	+++	CMV	CMV	CMV	CMV	CMV	*
Begonia cerosa	-	-	*	*	*	*	*
Begonia real	++	INSV TSWV	*	*	*	*	*
Bugamvilea	++	Potyvirus	*	*	*	*	*

Cuadro 2 (Continuación): Resumen comparativo de las técnicas de los ensayos del experimento.

Cultivo	T. mec	ELISA	Mic. luz	Mic. elect.	ds-RNA	rt-PCR RNA	PCR DNA
Cactus (<i>Mamillaria</i>)	+	*	*	*		*	*
Cactus (O. <i>linguiformis</i>)	++	Tobamovirus	*	Tobamovirus	Tobamovirus	Tobamovirus	*
Cactus (Pitahaya)	+	Potexvirus	*	*	*	Potexvirus	*
Cactus (<i>Scontria</i>)	+	*	*	*	*	Tobamovirus	*
Coleo amarillo	++	AMV, TRSV	*	AMV	*	AMV	*
Coleo rizado	++	AMV, TRSV INSV	*	*		*	*
Coleo variegado	++	AMV, TRSV INSV	*	*	*	*	*
Crisantemo	+	AMV	*	*	*	*	*
Croton	-	*	*	*	*	*	*
Cymbidium	++	TMV	*	*	*	TMV	*
Filodendro	++	CMV	*	*	*	CMV	*
Gerbera	-	-	*	*	*	*	*
Girasol	-	-	*	*	*	Potyvirus	*
Gladiola	+++	AMV, CMV BMV	+	AMV	AMV, CMV	AMV	*
Gloxinia	-	-	*	*	*	*	*
Helecho Blechum	-	*	*	*	*	*	*
Helecho Cuero	-	-	*	*	*	*	*
Helecho Pteris	-	-	*	*	*	*	*
Hiedra gold	++	Potyvirus	*	*	*	*	*
Hortensia	-	*	*	*	*	*	*
Impatiens	+++	INSV, TSWV TRSV	INSV	INSV	INSV	INSV	*
Impatiens variegado	+++	INSV, TSWV TRSV	INSV	INSV	INSV	INSV	*
Lirio azul	+++	AMV Potyvirus	*	*	AMV	Potyvirus	*
Lily	++	TMV	*	+	*	TMV, AMV CMV	*
Malvón	-	-	*	*	*	*	*
Mandevila	-	-	*	*	*	*	*
Noche buena	++	PoMV	*	*	*	PoMV	*
Odontoglossum	-	TMV	*	*	*	*	*
Petunia	*	*	*	*	*	*	*
Rosa	-	PoMV, ApMV	*	*	*	PoMV, ApMV	*
Rudbequia	*	*	*	*	*	*	*
Salvia	+++	-	*	*	*	*	*
Spatiphyllum	-	-	*	*	*	*	*
Terciopelo	-	*	*	*	*	*	*
Vinca o teresita	*	*	*	*	*	*	*

5.1. Detección y separación de virus; y pruebas de susceptibilidad en algunos hospedantes indicadores y diferenciales.

A continuación se describen los principales síntomas que mostraron las plantas indicadoras como respuesta evidente de la inoculación mecánica con savia de las plantas ornamentales bajo estudio (se omite mencionar las plantas que no mostraron síntomas):

Alelí. En *Chenopodium amaranthicolor* se desarrolló un moteado y lesiones locales y un mosaico sistémico inconspicuo; en *Chenopodium quinoa* se presentó un moteado y después lesiones locales, además se presentó un mosaico sistémico y leves deformaciones en hojas apicales; en *Datura stramonium* un moteado incipiente y lesiones locales incipientes; *Gomphrena globosa* mostró un moteado y lesiones locales irregulares, así como un moteado sistémico incipiente; para *Lycopersicum esculentum* se observaron lesiones locales en hojas nuevas, en las inoculadas no se observaron síntomas; *Nicotiana benthamiana* mostró lesiones locales y posterior muerte de las hojas inoculadas; sistémicamente se presentó marchitamiento y deformación de hojas con un mosaico difuso, en *Nicotiana clevelandii* un amarillamiento y muerte de hojas inoculadas; *Nicotiana glutinosa* lesiones locales incipientes; *Nicotiana occidentalis* se desarrolló un mosaico sistémico; *Nicotiana rustica* lesiones locales y muerte de hojas inoculadas; y finalmente en *N. tabacum* var. *Xanthi* se observaron lesiones locales y muerte de hojas inoculadas; sistémicamente se desarrolló un mosaico incipiente.

Azucena. Sólo se observaron síntomas en *Nicotiana occidentalis* desarrollándose un moteado en las hojas inoculadas.

Begonia real. En *Gomphrena globosa* los síntomas fueron moteado, y lesiones locales, los síntomas sistémicos fueron moteados y lesiones locales, además de un amarillamiento de la planta; en *Lycopersicum esculentum* se observó un moteado y posteriormente un amarillamiento general de toda la planta, además de achaparramiento e hiponastia inconspicua; *Nicotiana benthamiani* presentó moteado y manchas anilladas; en *Nicotiana glutinosa* se desarrolló un moteado en las hojas inoculadas y amarillamiento sistémico; en *Nicotiana occidentalis* se mostraron en las hojas inoculadas manchas amarillas sin borde definido y posteriormente un mosaico difuso, así como un amarillamiento general de la planta y puntos necrosados. En *Nicotiana clevelandii* la planta fue atacada por una pudrición radicular.

Bugamvilea. En *Chenopodium quinoa* se presentó un amarillamiento lento en toda la planta; *Gomphrena globosa* mostró un moteado y lesiones locales, así como manchas amarillas difusas en forma sistémica; *Lycopersicum esculentum* desarrolló un amarillamiento de hojas inoculadas y un crecimiento lento de la planta; *Nicotiana benthamiana* mostró un moteado y lesiones locales, sistémicamente se observó marchitez y muerte prematura de las hojas; en *Nicotiana glutinosa* moteado y lesiones locales incipientes; *Nicotiana occidentalis* se desarrolló un moteado y lesiones locales necróticas; *Nicotiana rustica* moteado y lesiones locales severas; y finalmente en *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* se observaron lesiones locales severas y muerte de hojas inoculadas.

Coleo amarillo. En *Chenopodium amaranthicolor* se desarrolló un moteado y amarillamiento sistémico incipiente; en *Chenopodium quinoa* se presentó un moteado y después lesiones locales, además se presentó un mosaico sistémico; en *Datura stramonium* un moteado incipiente y lesiones locales amarillentas; *Gomphrena globosa* mostró un moteado y lesiones locales

pequeñas, así como un moteado sistémico que derivó a lesiones locales; en *Lycopersicum esculentum* se observaron las venas de las hojas de color rojizo y ligera deformación de la lámina foliar, sistémicamente se presentó un achaparramiento; *Nicotiana benthamiana* mostró un moteado y lesiones locales en las hojas inoculadas; sistémicamente se presentó un moteado incipiente; en *Nicotiana occidentalis* se presentó un moteado y necrosis en las nervaduras; *Nicotiana rustica* mostró un moteado; y en forma sistémica mosaico inconspicuo y leve deformación de hojas; finalmente en *N. tabacum* var. *Xanthi* se observaron lesiones locales pequeñas.

Coleo rizado. En *Datura stramonium* se desarrolló un amarillamiento prematuro de la planta; *Gomphrena globosa* mostró lesiones locales irregulares, así como un moteado sistémico incipiente; en *Nicotiana benthamiana* se presentaron lesiones locales anilladas y marchitamiento de las hojas inoculadas; sistémicamente se presentó marchitamiento de la planta; en *Nicotiana clevelandii* un mosaico local; *Nicotiana occidentalis* mostró moteado y lesiones locales inconspicuas; y *N. tabacum* var. *Xanthi* moteado.

Coleo variegado. En *Nicotiana benthamiana* se desarrollaron lesiones locales anilladas y sistémicamente se presentó marchitamiento; *Nicotiana occidentalis* moteado y lesiones locales y un ligero moteado sistémico; *Nicotiana rustica* amarillamiento general incipiente; en *N. tabacum* var. *Xanthi* moteado incipiente y ápice de la planta ligeramente deformado.

Crisantemo. En ninguna planta indicadora se presentaron síntomas pudiendo deberse a un error durante la inoculación o bien que el posible patógeno no se transmita mecánicamente.

Hiedra gold. En *Gomphrena globosa* mostró un moteado y lesiones locales necróticas, además de moteado sistémico; en *Lycopersicum esculentum* amarillamiento, hiponastia de hojas inoculadas y nervaduras rojizas; en *Nicotiana benthamiana* moteado inconspicuo; en *Nicotiana clevelandii* la planta fue destruída por una pudrición radical; *Nicotiana glutinosa* mostró moteado y lesiones necróticas severas.

Impatiens. En *Datura stramonium* un amarillamiento; *Gomphrena globosa* mostró un moteado y lesiones locales, así como un moteado sistémico que después derivó a lesiones locales incipientes; en *Lycopersicum esculentum* se observó hiponastia, nervaduras rojizas, y de forma sistémica amarillamiento; en *Nicotiana clevelandii* moteado severo y marchitamiento; *Nicotiana occidentalis* mostró lesiones locales y muerte de las hojas inoculadas, en las hojas jóvenes se presentaron los mismos síntomas; *Nicotiana rustica* lesiones locales y muerte de hojas inoculadas.

Impatiens (variegado). En *Chenopodium amaranthicolor* se desarrollaron manchas amarillas sin borde definido; en *Chenopodium quinoa* se presentó un moteado y después lesiones locales; en *Gomphrena globosa* se mostró un moteado y sistémicamente algunas hojas mostraron deformación de la nervadura central; en *Lycopersicum esculentum* se observó amarillamiento de hojas jóvenes e hiponastia, en las inoculadas no se observaron síntomas; *Nicotiana benthamiana* mostró lesiones locales anilladas y necróticas; en forma sistémica, se presentó un mosaico y marchitamiento que derivó en la muerte de la planta; *Nicotiana clevelandii* moteado y lesiones locales necróticas inconspicuas, sistémicamente moteado, y achaparramiento, posteriormente la planta se tornó amarillo limón; *Nicotiana glutinosa* moteado y lesiones locales inconspicuas, las hojas jóvenes presentaron aclaramiento de nervaduras;

Nicotiana occidentalis se desarrolló un mosaico sistémico; *Nicotiana rustica* lesiones locales irregulares, mosaico sistémico.

Chile ornamental. En *Chenopodium amaranthicolor* se produjo muerte de la planta por patógenos; *Datura stramonium* presentó un mosaico sistémico y aclaración de nervaduras en todas las hojas nuevas; en *Lycopersicum esculentum* las hojas inoculadas se tornaron rojizas y mostraron un mosaico y murieron prematuramente, sistémicamente se observó que se desarrolló un moteado morado-rojizo, hiponastia, nervaduras muy moradas y la planta amarillenta; *Nicotiana benthamiana* no hubo planta diferencial; *Nicotiana clelandii* planta muerta por plaga; *Nicotiana rustica* moteado severo y lesiones locales; sistémicamente desarrolló moteado, lesiones locales y deformación de hojas.

Salvia. En *Gomphrena globosa* se mostró un moteado y lesiones locales redondeadas; *Nicotiana benthamiana* moteado y lesiones locales, mosaico en brotes y hojas jóvenes; para *Nicotiana clelandii* no hubo diferencial; *Nicotiana glutinosa* moteado y lesiones locales incipientes; *Nicotiana occidentalis* desarrolló un moteado y lesiones locales pequeñas, y mosaico sistémico en todas las hojas nuevas; *Nicotiana rustica* moteado de manchas grandes de color amarillo limón y lesiones locales; y finalmente en *N. tabacum* var. *Xanthi* se observaron lesiones locales irregulares.

5.2. Ensayos serológicos por medio de ELISA.

Los análisis serológicos (cuadro 3) indican que los síntomas causados en las plantas ornamentales utilizadas como fuente de inóculo, y en las diferenciales, son causadas por infecciones de virus individuales o mezclados como el virus

mosaico de la alfalfa (AMV), el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), el virus de la mancha necrótica del impatiens (INSV) y el virus de la mancha anular del tabaco (TRSV). Sólo se indican los especímenes a los que se les realizó el ensayo.

Cuadro 3: Resultados del ensayo serológico por ELISA.

CULTIVO	AMV	CMV	TEV	TSWV	INSV	TRSV	TMV	TBSV
Abutilón	-	-	-	-	-	-	-	-
Anturio	-	-	-	-	-	-	-	-
Azucena	-	+	-	-	-	-	-	-
Begonia cerosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Begonia real	-	-	-	+	+	-	-	-
Bougamvillea	-	-	-	-	-	-	-	-
Cactus (<i>O. liguiformis</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
Cactus (Pitahaya)	-	-	-	-	-	-	-	-
Coleo amarillo	+	-	-	-	-	+	-	-
Coleo rizado	+	-	-	-	+	+	-	-
Coleo variegado	+	-	-	-	+	+	-	-
Crisantemo*	+	-	-	-	-	-	-	-
Cymbidium	-	-	-	-	-	-	+	-
Filodendro	-	+	-	-	-	-	-	-
Gerbera	-	-	-	-	-	-	-	-
Girasol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gladiola	+	+	-	-	-	-	-	-
Gloxinia	-	-	-	-	-	-	-	-
Helecho cuero	-	-	-	-	-	-	-	-
Helecho Peteris	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiedra gold	-	-	-	-	-	-	-	-
Impatiens	-	-	-	+	+	+	-	-
Impatiens variegado	-	-	-	+	+	+	-	-
Lirio azul	+	-	-	-	-	-	-	-
Lily	+	+	-	-	-	-	+	-
Malvón	-	-	-	-	-	-	-	-
Mandevila	-	-	-	-	-	-	-	-
Noche buena	-	-	-	-	-	-	-	-
Odontoglossum	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Salvia	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 3 (Continuación): Resultados del ensayo serológico por ELISA.

CULTIVO	PoMV	BMVYV	TSV	ApMV	GV	PV	TB	PTX
Abutilón	-	-	-	-	+	-	-	-
Anturio	-	-	-	-	-	-	-	-
Azucena	-	-	-	-	-	-	-	-
Begonia cerosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Begonia real	-	-	-	-	-	-	-	-
Bougainvillea	-	-	-	-	-	+	-	-
Cactus (<i>O. liguiformis</i>)	-	-	-	-	-	-	+	-
Cactus (Pitahaya)	-	-	-	-	-	-	-	+
Coleo amarillo	-	-	-	-	-	-	-	-
Coleo rizado	-	-	-	-	-	-	-	-
Coleo variegado	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisantemo*	-	-	-	-	-	-	-	-
Cymbidium	-	-	-	-	-	-	-	-
Filodendro	-	-	-	-	-	-	-	-
Gerbera	-	-	-	-	-	-	-	-
Girasol	-	-	-	-	-	+	-	-
Gladiola	-	+	-	-	-	-	-	-
Gloxinia	-	-	-	-	-	-	-	-
Helecho cuero	-	-	-	-	-	-	-	-
Helecho Peteris	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiedra gold	-	-	-	-	-	-	-	-
Impatiens	-	-	-	-	-	-	-	-
Impatiens variegado	-	-	-	-	-	-	-	-
Lirio azul	-	-	-	-	-	+	-	-
Lily	-	-	-	-	-	-	-	-
Malvón	-	-	-	-	-	-	-	-
Mandevila	-	-	-	-	-	-	-	-
Noche buena	+	-	-	-	-	-	-	-
Odontoglossum	-	-	-	-	-	-	+	-
Rosa	+	-	-	+	-	-	-	-
Salvia	-	-	-	-	-	-	-	-

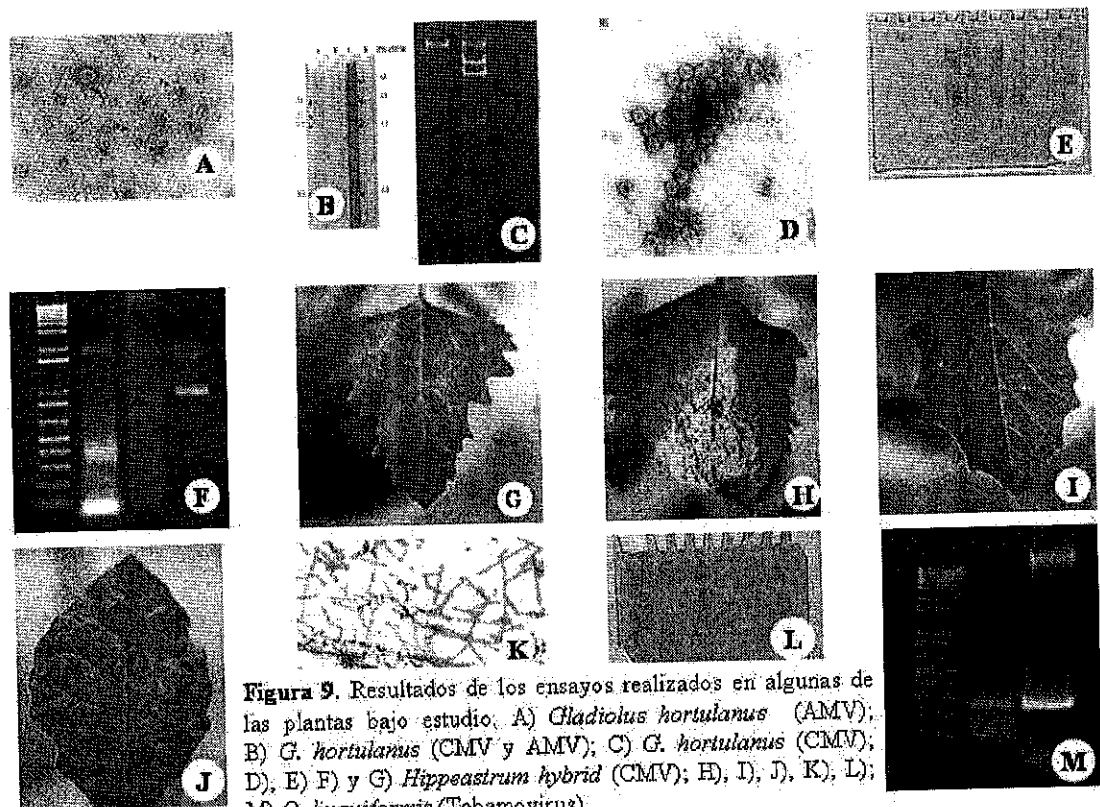
*En el caso del crisantemo no se aisló con mayor precisión el virus indicado probablemente debido a que es difícil su detección por la técnica de ELISA en esta especie (Matteoni & Allen, 1989).

Al analizar el cuadro 3 se observa que la técnica de ELISA es sensible para varios de los virus detectados que se transmitieron mecánicamente, incluso de

los que son de difícil transmisión; sin embargo otros virus que sí se transmiten de esta forma requirieron del uso de otras técnicas para su identificación, ya que la serología no los detectó.

5.3. Microscopía de luz.

La tinción de cristales para su observación bajo microscopio óptico se efectuó para algunas especies ornamentales como gladiolo, azucena. Las inclusiones observadas mostraron la morfología típica de los cristales formados por los virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV) (fig. 9).



5.4. Microscopía Electrónica.

Esta técnica se realizó en los ejemplares de gladiolo, azucena, cactus y coleo amarillo, mostrando la morfología característica de los virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV) y Tobamovirus respectivamente (fig. 9).

5.5. ds-RNA.

La extracción y análisis electroforético de RNA de doble cadena se realizó en azucena, cactus (*O. linguiformis*), coleo amarillo y gladiola, obteniéndose reacciones típicas de los virus mostrando las características de los virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV) y Tobamovirus, respectivamente (fig. 9).

5.6. rt-PCR para virus.

Esta prueba se efectuó en azucena, cactus (*Mamillaria*, *O. linguiformis*), coleo amarillo, *Cymbidium*, filodendro, girasol, gladiola, *Impatiens*, lily, *Odontoglossum* y rosa. Los resultados obtenidos mostraron las características típicas de CMV, Tobamovirus, AMV, TMV, Potyvirus, INSV, PoMV y ApMV, respectivamente.

5.7. PCR para virus.

Esta prueba se efectuó en abutilón y girasol. Los resultados mostraron las características típicas de geminivirus.

5.8. PCR anidada para fitoplasmas.

El ensayo de PCR anidada para la detección de fitoplasmas se realizó con las plantas de las cuales no hubo transmisión mecánica y también en algunos ejemplares con síntomas que indicaban la posible presencia de estos patógenos (ver cuadro 4).

Las plantas ornamentales a las que se aplicó esta técnica y se obtuvieron resultados positivos fueron las siguientes: Cactus (*Scontria* y *Mamillaria*), coleo amarillo, croton, gerbera y lily.

Así mismo se usó está técnica en las plantas de filodendro, gloxinia y helecho leather, con resultados negativos.

Cuadro 4: Resultados de la PCR anidada para fitoplasmas.

Cultivo	PCR nested
Cactus (<i>Scontria</i>)	+
Cactus (<i>Mamillaria</i>)	+
Coleo amarillo	+
Croton	+
Filodendro	-
Gerbera	+
Groxinia	-
Helecho cuero	-
Lyli	+

VI. DISCUSIÓN

Durante los recorridos efectuados en los diferentes centros de producción y venta de plantas ornamentales del estado de Morelos, se observó que existen diferentes tecnologías productivas, mismas que van desde las altamente sofisticadas hasta las muy rudimentarias. Así mismo, los puntos de comercialización y los medios de transporte son muy contrastantes en lo referente a las condiciones del manejo de las plantas, lo cual incrementa los riesgos de infección y diseminación de las enfermedades, especialmente las causadas por virus.

Es necesario señalar que en algunas especies de plantas sólo se detectó la presencia de virus mediante transmisión mecánica y serología, sin lograr caracterizarlos. Por lo que se debe continuar con el ajuste de las técnicas de transmisión, mantenimiento de los virus, PCR y secuenciación de ácidos nucleicos a fin de completar los estudios de caracterización molecular de todos los virus aislados. Los resultados de la inoculación mecánica efectuadas sobre las plantas indicadoras señaladas en el anexo 5, muestran que para casi todas las especies de plantas ornamentales estudiadas el uso de plantas indicadoras es un método relativamente sencillo, aunque no preciso para la detección de virus que se transmiten mecánicamente; ya que se observaron síntomas claros a partir de los 10 días posteriores a la inoculación.

Algunos ejemplares colectados con síntomas sospechosos de virus murieron rápidamente en el invernadero siendo esta la causa de que no se realizara ninguna prueba con ellos. Esto indica la posible presencia de algún patógeno altamente agresivo cuya identificación requiere de estudios más precisos. Sin embargo, es importante señalar que algunas de las plantas indicadoras libres

de virus que fueron inoculadas con macerados de hojas de las especies ornamentales enfermas no presentaron síntomas visibles, pero sí se detectaron e identificaron virus de las ornamentales mediante el uso de otras técnicas como la de PCR.

Al efectuar la prueba de transmisión mecánica, en algunos casos se presentaron síntomas sólo en las hojas inoculadas y en otros se manifestaron de forma sistémica; siendo estos últimos de utilidad para el mantenimiento de los aislamientos y para poder someterlos a estudios posteriores. Los síntomas en los hospedantes indicadores que sí mostraron respuestas visibles fueron variados, incluyendo lesiones locales cloróticas que en algunos casos se necrosaron, mosaicos, anillos necróticos, moteados y otros. Dichas manifestaciones sintomáticas se asocian en su mayoría a las causadas por los virus fitopatógenos.

Los resultados de las pruebas de transmisión mecánica y de ELISA dan la posibilidad de plantear que la detección oportuna de virus mediante estos ensayos sería de gran ayuda para desarrollar estrategias para el manejo de estos patógenos en los centros de producción. Sin embargo cabe mencionar que al detectarse diferentes especies de virus mezclados mediante la técnica de ELISA, como fue el caso de las mezclas de AMV+INSV+TSW y INSV+TSWV en algunos hospederos, puede causarse confusión en el diagnóstico y posible control.

Para los virus INS, TSWV y TRSV, detectados e identificados en algunas de las plantas ornamentales estudiadas, existen reportes donde se indica su importancia cuarentenaria en Estados Unidos y Europa; además de la emergencia y resurgimiento de nuevas cepas más agresivas que indican su capacidad de mutar. Esto implica que el problema de su presencia incrementaría las posibles pérdidas para los productores interesados en exportar, por lo cual se hace aún más necesario detectarlos de forma oportuna

en los centros de producción y comercialización (Damsteegt, 1999; Roselló y Nuez, 1999; Tsuda, 1999; Stefani, 2001; DFSS, 2003; EPPO, 2004).

Es de especial relevancia enfatizar sobre la importancia del grupo de los *Tospovirus* (*Bunyaviridae*) en los cultivos ornamentales y hortícolas puesto que en los últimos años se han incrementado los reportes sobre brotes de variantes más agresivas y nuevas especies de plantas afectadas por estos virus (Damsteegt, 1999; Van der Vlugt, Stijer, Verhoeven, Lesemann, 2000; Momol, Dankers y Adkins, 2003; Salomone, Masenga, Minuto, Parodi y Roggero, 2003).

Ante la constante y masiva movilización mundial de gran variedad de plantas ornamentales, e incluso de nuevas especies de estas, provenientes de diversas regiones del mundo, es necesario señalar que el riesgo de la introducción de nuevos virus es muy grande. Por lo cual se requiere del establecimiento de medidas tendientes a evitar la importación y movilización al interior del país de materiales contaminados, como lo señalan varios investigadores en otros países (Roselló y Nuez, 1999; Fletcher, 2000; Muñoz y Gutiérrez, 2001; Ramírez y Bustamante 2001).

Debido a la importancia de esta agroindustria y su potencial de crecimiento en México en general y en el Estado de Morelos en particular, se requiere de la ejecución de más trabajos de investigación sobre estos fitopatógenos a fin de reducir los riesgos que su presencia implica, en especial de aquellos de importancia cuarentenaria para los países a los que se exporta o podría exportarse.

Así mismo es preciso analizar y discutir sobre la importancia de la capacitación de los técnicos y productores de plantas ornamentales sobre las diversas directrices fitosanitarias establecidas por los países importadores de estos productos con la finalidad de evitar rechazos de embarques o el cierre de fronteras a causa de la detección de virus.

VII. CONCLUSIONES

Se determinó que los patógenos que produjeron la sintomatología en las especies de plantas ornamentales estudiadas son virus en la mayoría de los casos; y en algunos otros, son organismos de diferente origen como los fitoplasmas o probablemente viroides.

La manifestación de síntomas y síndromes, en las especies ornamentales y en las especies indicadoras, muestran que pudo haber diferentes patógenos interactuando para causar las enfermedades.

La transmisión mecánica permitió establecer con cierto rango de seguridad la presencia de virus, así mismo posibilitó la diferenciación de las enfermedades causadas por virus de las provocadas por otros patógenos, especialmente fitoplasmas.

La naturaleza de los patógenos fue confirmada en algunas especies por serología, microscopía de luz, microscopía electrónica y el análisis de RNA de doble cadena, confirmándose los agentes causales por PCR.

Los virus más frecuentemente detectados fueron: El AMV (Virus mosaico de la alfalfa), el INSV (Virus mancha necrótica del impatiens), el TSWV (Virus marchitez manchada del tomate) y el TRSW (Virus mancha anular del tabaco).

Con los resultados obtenidos se cuenta con un primer inventario parcial de los virus que atacan las plantas ornamentales de México y Morelos.

VIII. LITERATURA CONSULTADA.

- Albouy, J. y J-C. Devergne. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. INRA. Mundi Prensa. 496 pag.
- Alcalde, M. A., S. Lenardon., A. Marinelli, A. Rago. 1999. Caracterización de virosis asociadas al girasol y sus efectos sobre parámetros fisiológicos. *Tesis profesional*. Universidad de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Argentina. 94 pag.
- Alegria, A., G. Serrano, I. Valencia, I. Lozano y N. Toro. 2001. Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para virosis vegetales. XI Curso Internacional teórico práctico sobre detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas. Universidad del Valle, Madrid, España. 76 pags.
- Ares, X., G. Calamante, S. Cabral, J. Lodge, P. Hemenway, R. Beach & A. Mentaberry. 1998. Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. *Journal of virology*, 72 (1): 731-738.
- Baldovinos De la P., G. 2002. Desarrollo rural y transformaciones del campo. FCA. UNICEDES. UAEM. 373 pag.
- Bancomext. 1994. Serie de análisis de competitividad de flores. SECOFI, México.

- Barrera T., G. y M. E. Osorio. 2000. Diagnóstico del viverismo y comercialización de las plantas de ornato en la Región de Cuernavaca, Morelos. *Tesis Profesional*. UACH. México. 100 pag.
- Baulcombe, D. C., J. Lloyd, Y. N. Mnaoussopoulos, Y. M. Roberts & B. D. Harrison. 1993. Signal for potyvirus depend aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer of potato virus X. *Journal of General Virology*, 74: 1245 – 1253.
- Bock, K. R. 1982. The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics. *Tropical Pests Management*, 28: 399 – 411.
- Bos, L. 1978. Symptoms of Virus Diseases in Plants. Research Institute for Plant Protection, Wageningen, The Netherlands. pp: 40-151.
- Cabrera, R. J. y R. Orozco M. 2002. Diagnóstico del viverismo en Morelos. 5º Simposium Internacional de viverismo. Oaxtepec, Morelos, México.
- Cann, A. J. 1997. Principles of molecular virology. 2º edición, Ed. Academic Press, London. Pp. 163-166.
- Cárdenas S., E. 1999. Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales, microscopía electrónica y rango de hospedantes. *Instituto de Fitosanidad*, C. P. Montecillo, México. 147 pag.
- Carrillo, C., A. Wigdorovitz, C. Oliveros, P. Zamorano, A. Sadir, N. Gómez, J. Salinas, J. Escribano & M. Borca. 1998. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus VP1 expressed in transgenic plants. *Journal of virology*, 73 (2): 1688-1690.

- Casey, Ch. 2000. Integrated pest management for bedding plants, a scouting and pest management guide, 2nd edition. IPM No. 407. Cornell Cooperative Extension, Ithaca, NY. 119 pag.
- Castañeros, C. M. 1990. Alternativas a la crisis rural en México. *Agrocomunicación Saenz Colín*. México. 391 pag.
- Castellanos, I, 1996. La floricultura intensiva como alternativa del sector primario para la exportación a gran escala. Tesis, UNAM. México.
- Clark, M. F. and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal General of Virology*, 34: 475-483.
- Colegio de Postgraduados. 2004. Identificación y priorización de cadenas agroalimentarias en el estado de Morelos. Colegio de Postgraduados de Chapingo, Campus Veracruz; Mayo del 2004.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). 1999. Reporte Técnico.
- Corona, N. V. 1995. Las begonias ornamentales de México. *Revista Chapingo*. Serie Horticultura, 3: 71 – 76.
- Cortés A. D. 2001. Prontuario de plantas ornamentales que se comercializan en el Salto de San Antón, Cuernavaca, Morelos. *Memoria de Trabajo*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UAEM. 110 pag.
- Costa, A. S. 1976. Whitefly – transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 14: 429 – 449.

- Creamer, R. and B. W. Falk. 1990. Direct detection of transcapsidated barley yellow dwarf luteoviruses in doubly infected plants. *Journal of General Virology*, 71: 211-217.
- Chase, A. R. 1987. Compendium of ornamental foliage plant diseases. APS Press, St. Paul, MN. 100 pag.
- Chase, A. 1997. Foliage plant diseases diagnosis and control. APS, Press, St. Paul, Min. 168 pag.
- Chase, A., M. Daughtrey, and G. W. Simone. 1995. Diseases of annuals and perennials. Ball Publishing Co., Batavia, Ill. 202 pag.
- CIDRSEM (Comisión Intersecretarial para el Desarrollo Rural Sustentable de Estado de Morelos). 2003. Programa especial concurrente para el desarrollo rural sustentable del estado de Morelos 2002-2006. Gob. del Edo. de Morelos. 274 pag.
- Dal Bo, E., G. Chiarrone, J. Rolleri y L. Ronco. 1999. Tospovirus en los cultivos ornamentales de La Plata. *Rev. Fac. Agron. La Plata* 104 (1): 35-40.
- Daub, M. E., R. K. Jones and J. W. Moyer. 1997. Biotechnological approaches for virus resistance in floral crops. In: R. L. Geneve, J. E. Preece and S. A. Merkle (eds.) *Biotechnology of ornamental plants*. Wallingford: CAB International pp. 335-351.
- Daughtrey, M. L. and A. R. Chase. 1993. Ball field guide to diseases of greenhouse ornamentals. Ball Publishing, Chicagho, Ill. USA. 224 pag.
- Daughtrey, M. L., R. L. Wick and J. L. Peterson. 1995. Compendium of flowering potted plant disease. APS Press, St, Paul, MN. 90 pag.

- Davis, R. E., R. Hammond, R. A. Owens and Y. Zhao. 1999. Viroids. From scourge to boon in the 21st Century? *Agricultural Research*. December. USDA. Pp. 16-17.
- Davis University. 2002. Miscellaneous ornamental pests. General Exterminating, Inc. www.ipm.ucdavis.edu//PMG/PESNOTES/pn006.html
- DFSS (Division Field Services Support). 2003. Summary of the plant health regulations of the Netherlands. Ministry of Agriculture Nature Management and Plant Protection Service. July 2003
- Dijkstra, J. and C. P. De Jager. 1998. Practical plant virology. Protocols and exercise. Springer. USA. 459 pag.
- Dreckmann, P. 2001. Viruses in Brugmansia. Le Bon Jardinier. Ed. Francia. 40 pag.
- Elliot, R. M. (ed.) 1996. The Bunyaviridae. New York: Plenum Press. USA. 20 pag.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Report, May 11, 2004 http://www.eppo.org/QUARANTINE/QP_virus.htm
- Estrada L., E. 1987. El Códice Florentino; su información etnobotánica. *Tesis de Maestría*. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 98 pag.
- Fernández, J. A. 1999. Ingeniería genética en plantas. *Sociedad Española de Genética*. España. 345 Pag.
- FIRA. 1989. La floricultura en México y la comercialización internacional. *Boletín Informativo* N° 205, Vol. XXI. México, D. F. 48 pag.

- FIRA. 1996. Consideraciones sobre el viverismo en el Estado de Morelos. *Boletín Informativo* Num. 289. Vol. XXIX. México, D. F. 28 pag.
- Gaebe, J. 2002. Greenhouse pesticide management. North Dakota State University Academic Press. 340 pagg.
- García, A. P. 1982. Marco de referencia del Programa de horticultura ornamental. Informe de labores. SARH. INIA – CAEZACA. Zacatepec, Morelos. 12 pag.
- García, G., C. Hernández y L. Martínez. 1999. Floricultura en México y entorno mundial. Proyecciones. *Revista electrónica*, DACS-ITESM. Año 1, No. 1, Junio – agosto 1999.
- Garnsey, S. M., T. R. Gottwald and R. K. Yokomi. 1998. Control strategies for citrus tristeza virus. En: Hadidi, A., R. K. Khetarpal and H. Koganezawa (eds). Plant virus disease control. APS Press, St. Paul, Ill. 56 pag.
- Goldbach, R. and D. Peters. 1996. Molecular and biology aspects of tospovirus. Taiwán Agricultural Research Institute. *Acta Hortoculturæ* Vol. 431.
- Gómez, G. G: 1994. La horticultura ornamental, alternativa para el sector social rural. IV Congreso Nacional de Horticultura Ornamental. Chapingo, México. UACH.
- Hamilton, R. Y., J. R. Edwarson, R. Y. B. Francki, H. T. Hsu, R. Koenig & R. G. Mine. 1981. Guidlenes for the identification and characterization of plant viruses. *Journal of General Virology*, 54: 223 – 241.

- Hernández X., E. 1986. Biología Agrícola: Los conocimientos biológicos y su aplicación en la agricultura. Compañía Editorial Continental. México. pp. 14.
- Heyden, D. 1985. Mitología y simbolismo de la flora en México prehispánico. UNAM. México. 176 pag.
- Horst, R. and P. Nelson. Compendium of chrysanthemum diseases. APS, St. Paul, MN. 88 pag.
- Hugh, T. 1994. La conquista de México. Editorial Patria. México. 896 pag.
- Ikin, R. and T. Parnell. 1999. Current Quarantine Principles and Germplasm. *Phytoparasitica* 27:4, 1999. Israel.
- INDAP. 2002. Panorama florícola: Información para la red nacional de flores. Vol. 1, No.7, Marzo.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. T. White (Eds.). 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA, 482 pag.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 1997. La agricultura de invernadero y vivero en el estado de Morelos. Aguascalientes, México.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI). 1998. La horticultura ornamental en México. 1ª Ed. Aguascalientes, México. 92 pag.
- Jarvis, W. R. 1997. Managing diseases in greenhouse crops. The American Phytopathological Society. USA. 340 pag.

- Jordá, L., A. Font, I. Lacasa, A. Guerrero, y M. Cano. 2000. Nueva enfermedad en el tomate. *Phytoma-España*, 119, 23-28.
- Koehler, C. S. 1994. Insect pest management guidelines for California Landscape Ornamental. Cooperative Extension University of California. Div. Agric. Nat. Res. 82 pag.
- Leszczyńska-Boris, H. 1990. Introducción al cultivo de plantas de follaje. *Serie Manuales de Horticultura Ornamental*. Escuela de Fitotecnia. Universidad Popular del Estado de Puebla. Puebla, México. 64 pag.
- Leyva, N. y J. P. Martínez. 2000. PCR "nested" o anidado en la detección molecular de fitoplasmas relacionados con la punta morada de la papa. *Memorias del Curso: Fitopatología molecular. Manual de Procedimientos*. Dirección General de Sanidad Vegetal. México. 25 pag.
- Linares, E. 1994. Los jardines de México, su historia, situación actual y retos futuros. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. Vol. I. N° 2. UACH. México.
- López G., V. (Ed.). 1994. Cuernavaca, una visión retrospectiva. H. Ayuntamiento de Cuernavaca, Morelos. México. 3ª Ed. 152 pag.
- Luna, L. 2002. Morelos: El sector agropecuario y la Alianza para el Campo. UNICEDES. UAEM. Morelos, México. 222 pag.
- Luna, L. y H. Sotelo. 2004. Morelos. El sector agropecuario y las inversiones en el periodo 1995-2004. UAEM, SAGARPA, SDA, F. C. Agropecuarias, CECIPA, UNICEDES. Formato en Compact Disk.
- Mathews, R. E. F. 1991. Plant virology. 3ª ED. Academic Press. San Diego. 403 pag.

- May, B. W. 1985. Virology. A practical approach. Ed. Oxford University Press. 260 pag.
- Milne, R. G. and E. Luisoni. 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology*, 68:270-274.
- Milne, R. G. and E. Luisoni. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in virology*, 68: 270 – 274.
- Mink, G. I. 1993. Pollen –and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review Phytopathology*. 31: 375-402.
- Miranda A., M. 1999. Multiplicación Clonal de gloxinia *Sinningia speciosa* (Fam. Gesneriaceae) in vitro. *Tesis Profesional*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UAEM. 46 pag.
- Momol, M. T., Dankers, H. and Adkins, S. 2003. First report of *Tomato spotted wilt virus* in hosta in Florida. Plant Management Network. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-1024-01 HN.
- Morris, T. J. and J. A. Dodds. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69: 854 – 858.
- Mundo, O. J. 2002. El perfil del viverista y del vivero ornamental como instrumento de generación de empleos y de ingresos para el desarrollo rural. *Tesis de Maestría*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UAEM. 129 pag.
- Munford, R. A., I. Baker and K. R. Wood. 1996. The biology of tospoviruses. *Annals of Applied Biology*, vol. 128, pp. 159-183.

- Muñoz M. y M. Gutierrez. 2001. Resultados de la prospección virológica en cultivos de tulipán (*Tulipa spp.*) en la zona sur de Chile. XI Congreso SOCHIFIT, Santa Cruz, Chile. VI Región. Diciembre 2001. L-16, pp. 10.
- Nault, L. R. and E. D. Ammar. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology*, 34: 503 – 529.
- OIRSA, 2000. Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional-VIFINEX, Guatemala. 90 pag.
- Olascoaga, R. 2000. La floricultura en México. XXVI Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Memoria. Depto. Parasitología Agrícola. UACH. 59 pag
- Oswald S., U. y F. Mestries (Coords.). 1992. Agricultura y T.L.C. *Cuadernos Agrarios*, N° 4, Enero – Abril. Nueva Epoca. CRIM – UNAM. México. 45 pag.
- Pappu, H. R., C. L. Niblett and R. F. Lee 1995. App or recombinant DNA technology in plant protection: Molecular approaches to engineering virus resistance in crop plants. *Word Journal of Microbiology and Technology*, vol. 11. pp. 426-437.
- Pirone, & K. F. Harris. 1977. Nonpersistent transmission of plant viruses by aphids. *Annual Review of Phytopathology*, 15: 55 - 73.
- Powell, Ch. and R. Linquist. 1992. Ball Pest & Disease Manual. Ball Publishing. Geneva Illinois. USA. 118 pag.

- Prins, M., and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol.* 6:31-35.
- Productores de Ornamentales de Morelos A. C. (POMAC). 2002. Directorio de productores asociados. Morelos, México. 12 pag.
- Ramírez G. y P. Bustamante. 2001. Detección del Pepino Mosaic Virus (PepMV) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante técnicas serológicas. XI Congreso SOCHIFIT. Santa Cruz, Chile. VI Región. Diciembre 2001. P-9. pag 36.
- Romero C. S. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. Dpt. Parasitología Agrícola, UACh. México, 244 pag.
- Roselló, S. Y F. Nuez. 1999. Estado actual de la lucha contra el virus bronceado en el tomate. *Vida Rural* No. 90, Julio. Eumedia, Madrid, España. Pp. 32-40.
- Rubio, T., M. Borja, H. Scholthof, P. Feldstein, J. Morris & a. Jackson. 1999. Broad-spectrum protection against tomboviruses elicited by defective interfering RNAs in trnsgenig plants. *Journal of virology*, 73 (6): 5070-5078.
- Rueda H. R. 1998. Breves notas sobre el proceso evolutivo de la tenencia de la tierra en Morelos. *Las hojas de la comunidad*. UNICEDES. UAEM. Morelos, México. pp. 145.
- SAGAR (Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural). 1998. Demanda mundial y situación de la horticultura ornamental en México. SEMARNAP, México. pp. 4-25.

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). 2002. Firma de la Declaratoria de Operación de la Cadena Productiva de Ornamentales. Boletín Oficial Num. 009/02. CGCS-SAGARPA, Méx. D. F., 10 de enero, 2002.
- Sayki, R., D. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis and H. Ehrlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Salomone A., V. Masenga, G. Minuto, C. Parodi and P. Roggero. 2003. First report of *Tomato spotted wilt virus* (Tospovirus, Bunyaviridae) infecting *Euphorbia eritrea* and *Asclepias curassavica* in Liguria, Italy. *The British Society for Plant Pathology*. V 1: 45-47.
- Serranos, J. 1996. De frente a la Ciudad de México. El despertar de los Estados que lo circundan. CRIM – UNAM – CONACYT – UAQ – Gobierno de Querétaro. México. 10 pag.
- Sidek, Z. 1999. Viruses of cucurbits: The strategies. *MCB-MAPPS Plant Protection Conference '99. Proceeding*. Z. Sidek et al. (Eds.) pp 68-71.
- Sidek, Z. A. Samad, and I. Sulaiman. 1993. Detection of cucumber mosaic virus in weeds in Malaysia using dot immunology assay. *Journal of Plant Protection in the tropics*. 10 (2): 111.
- Spiegel. 1999. International Transfer of Plant Propagation Material. The XIVTh International Plant Protection Congress (IPPC). Section: International transfer of plant propagation material, germoplasm and relevant quarantine policies and regulations; International research Cooperation on IPM. July 25–30, 1999. Jerusalem, Israel. pp. 6.

- Sotomayor, A. 2000. Actividad biológica de AMISTAR 50® (Azoxystrobin) para el control de enfermedades foliares en ornamentales. XXVI Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. *Memoria*. Depto. Parasitología Agrícola. UACH. 59 pag.
- Stefani, E. 2001. Normativas fitosanitarias para la internación de material vegetal en la Comunidad Europea. XI Congreso SOCHIFIT, Santa Cruz, Chile. VI Región. Diciembre 2001. L-66, pp. 32.
- Streets, R. B. 1984. The diagnosis of plant diseases. The University of Arizona Press. Arizona, USA. 6.24.
- Strider, D. L. 1985. Disease of floral crops. Volume 1 and 2. Praeger, New York, USA. 638 and 579 pag.
- Sumset (Eds.). 1990. Western Garden Book. Lane Publishing Co. CA, USA. 592 pag.
- Tsuda, S. 1999. Tomato spotted wilt tospovirus: Plant-infecting Bunyaviridae. *Virus* 49:119-130.
- Taunton (Eds.). 1990. Fine gardening. N° 14. USA. 82 pag.
- Taunton (Eds.). 1991. Fine gardening. N° 21. USA. 94 pag.
- Ullman, D.E., Sherwood, J.L., and T.G. German. 1997. Thrips As Vectors of Plant Pathogens, pp. 539-565, In (ed.) T.L. Lewis, Thrips As Crop Pests, CAB International, London.
- UNICEDES (Ed.) 1998. Las hojas de la comunidad. UAEM. Cuernavaca, México. 471 pag.

- Vaira, A. M., L. Semeria, S. Crespi, V. Lisa, A. Allavena and G. P. Accotto. 1995. Resistance to tospovirus in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of tomato spotted wilt virus: Correlation between transgene expression and protection in primary transformants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8, 66-73.
- Valverde, R. A., S. T. Nameth & R. L. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255 – 258.
- Van der Vlugt, RAA, Stijer CCMM, Verhoeven J, Lesemann DE, 2000. First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Disease*, 84, 103.
- Van Gundy, S., M. O. Mundo y M. S. Vilchez T. 1999. 2º Curso Internacional Enfermedades de los cultivos ornamentales. *Memoria*. Fac. C. Agropecuarias, UAEM. Cuernavaca, Morelos. Méx. 90 pag.
- Vega A., J. C. y R. Rivera B. 2001. Los virus: Cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva CINVESTAV – Depto. Ing. Genética, Unidad Irapuato, Mich. Vol. 20, Nov. – Dic. Pp. 349-355.*
- Vern, D. 1999. New and emerging plant viruses. Related by the Colloquium of Virology Committee of APS. August, 1999. Montreal, Canada. pp. 5-9.
- Wick, R. L. 2000. Diagnosing plant diseases of floricultural crops. *Floral notes*, Volume 13, No. 1. Jul-Ag. Univ. of Massachusetts, USA. Pp. 24-29.
- Zaitlin, M. and P. Palukaitis. 2000. Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:117-143.

20 °C. Al tubo con los 400 µl de sobrenadante se le adicionan 20 µl de proteinasa K(50 µg/ml) y se agita en vórtex/1 min, para enseguida colocarlo a 50 °C/30 min. Transcurridos los 30 min se le adicionan 420 µl de fenol saturado y se homogeniza por inversión, para centrifugarlo a 5000 rpm/ 15 min/ 4°C. Se recupera el sobrenadante y se le adiciona un volumen igual de cloroformoalcohol isoamílico (24:1, V:V), se agita en vórtex/ 1 min y se centrifuga a 5000 rpm/ 15 min/ 4 °C. Se recupera el sobrenadante, se le agrega 2.5 veces de etanol salado (acetato de potasio) al 2 % en etanol) y se incuba a – 20 °C por una hora o toda la noche. Enseguida se centrifuga la muestra a 7500 rpm/ 15 min/ 4 °C, se descha el sobrenadante y la pastilla se resuspende por inmersión en etanol, se repite dos veces más. Luego se deja invertido el tubo para evaporar totalmente el etanol y secar la pastilla que contiene el ARN. Finalmente, se resuspende la pastilla en 30 µl de agua M. Q. estéril y se guarda a – 20 °C. Se cuantifica el ARN. Existen varias maneras para medir la cantidad (o concentración) de los ácidos nucleicos, como la fluorescencia en bromuro de etidio, la auto-radiografía, quimioluminiscencia y la PCR; pero uno de los más sencillos y más usados es el método espectrofotométrico. En este método las lecturas se toman a una longitud de onda de 260 nm.

Electroforesis y preparación de geles de agarosa: Utilizando columnas de cromatografía preparadas con celulosa CF-11, el ARN-dc es analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida de agarosa del 6% al 15 % y un bufer para electroforesis TAE (tris-Acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA)., a 100 volts por 3.5 hrs. Se incluyen como marcadores de peso molecular, los RNA-dc de tobacco mosaic virus (TMV = 4.3 y 0.4 x 10⁶ Daltons) y cucumber mosaic virus (CMV = 2.0, 1.9, 1.3 y 0.5 x 10⁶ Daltons), además de los tratamientos enzimáticos con RNAasa y DNAasa de los extractos de RNA-dc obtenidos de las plantas enfermas.

La electroforesis es útil para visualizar la calidad del ácido nucleico obtenido, dado que lo separa en bandas que nos indican el tamaño aproximado o longitud del ácido nucleico en cuestión, así como el rendimiento de la extracción indicado por la intensidad de cada banda. Si se observa un continuo o barrido, sin bandas definidas, puede indicar degradación de producto (Leyva y Martínez, 2000).

C) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS.

El protocolo de ampliación del DNA comprende tres etapas sucesivas: Una etapa de desnaturalización que permite la separación de las cadenas dobles complementarias de DNA; etapa de hibridación, cuya duración y temperatura varían según la composición y longitud de los oligonucleótidos, en esta etapa, los oligonucleótidos desarrollan sus secuencias complementarias enmarcando la región por ampliar, mismas que permiten determinar la especificidad de la

PCR; y finalmente la etapa de extensión que conduce a la síntesis de una secuencia complementaria de una cadena matriz en presencia de la enzima polimerasa y de los nucleótidos precursores, la enzima recopia el DNA partiendo de los cebos. La reacción en cadena a partir de la repetición de 20 a 40 ciclos de desnaturalización–hibridación–extensión es lo que conduce a una acumulación exponencial del DNA (Creamer y Falk. 1990; Albouy y Devergne, 2000).

En el diagnóstico de virus cuyo genoma es un RNA, se requiere incluir antes de la PCR una etapa previa durante la cual el RNA es recopiado en cDNA con la ayuda de una enzima transcriptasa inversa. Entonces la técnica recibe el nombre de RT-PCR. Una vez que el DNA ha sido ampliado, su visualización y caracterización se realizan mediante electroforesis en gel de agarosa que separa las moléculas de DNA en función de su peso molecular. La revelación se produce al agregar bromuro de etidio que tiene la particularidad de fluorecer al exponerlo a luz ultravioleta (Albouy y Devergne, 2000).

D) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA (PCR-NESTED) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FITOPATOPLASMAS.

Esta técnica es muy versátil y simple de realizar, pero se deben de tomar precauciones extremas con posibles contaminantes, siempre se debe trabajar en un lugar limpio, usar guantes y material estéril, así como también tener cuidado de no tocar la parte interior de los tubos.

Materiales, equipo y soluciones stock: Termociclador, cámara de electroforesis, transiluminador de luz ultravioleta, fuente de poder, buffer de electroforesis TBE, agarosa, bromuro de etidio (10 mg/ ml), dNTPs 10 mM, buffer de PCR 10X, MgCl₂ 25 mM, Taq polimerasa (5 U/μl), oligonucleótidos o primers 10 (pmoles/μl, DNA de plantas con síntomas sospechosos.

Procedimiento general: Descongelar todos los reactivos (incluyendo el DNA) a utilizar y centrifugarlos por unos segundos para prevenir contaminaciones. Preparar la reacción de PCR (mantener los tubos en hielo) en un volumen del 25 μl de la siguiente forma:

Componente	cantidad
H ₂ O Mq	17.8 μl
Buffer 10X	2.5 μl
MgCl ₂ 25 mM	2.0 μl
dNTPs	0.5 μl
P1 10 pMoles/ ml	0.5 μl
Tint 10 pMoles/ ml	0.5 μl
Taq-polimerasa	0.2 μl
DNA	1 μl

Mezclar bien la reacción y agregar 2 gotas de aceite mineral estéril, centrifugar por unos segundos. Amplificar utilizando el siguiente programa termociclaror:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	4 min	1
94° C	45 seg	
60° C	1 min	
72° C	1 min y 30 seg	35
72° C	5 min	1

Es muy importante no disminuir la temperatura de aliniamiento de los primers, al contrario, si se observan amplificaciones inespecíficas, es conveniente incrementarlo hasta un máximo de 60 o 65 °C. Temperaturas menores a los 55 grados no se recomiendan, debido a que ha observado ampliación inespecífica, incluso de un tamaño muy cercano al esperado, lo cual llevaría a la obtención de resultados erráticos.

Realizar la segunda reacción de PCR utilizando los primers R16F2/R16R2, utilizando el mismo protocolo anterior y el mismo programa de temperaturas. El DNA a utilizar sería el producto del PCR P1/Tint anterior diluido 1:30. Con este segundo se obtiene un producto de aprox. 1200 pb.

Realizar la electroforesis en geles de agarosa bajo el siguiente procedimiento: Disolver 1.5 gr de agarosa en 100 ml de TBE 1X para obtener un gel al 1.5 %. Fundir en microondas y dejar enfriar a aproximadamente 60 °C, vaciar al molde y esperar a que solidifique (usar el molde apropiado al número y cantidad de muestra). Agregar buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel. Mezclar 8 µl del producto de PCR con el buffer de carga (2 µl) y vaciar dentro del pozo. Cargar también el marcador de peso molecular. Cerrar la cámara y utilizar aproximadamente 85 Volts si se usa una cámara chica y hasta 120 Volts si es cámara grande (toma aproximadamente 1 hr). Teñir el gel con bromuro de etidio y visualizar con luz UV. Tomar fotografía, Analizar resultados (Leyva y Martínez, 2000).

ANEXO 3

Características generales de las inclusiones inducidas por los virus fitopatógenos

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Composición	Agregados de: Partículas virales; proteínas codificadas por el genoma del virus; mezcla de virus, proteína y organelos.
Distribución	Inicio de infección - Hoja inoculada: hojas apicales; hojas basales. - Infección avanzada: Toda la planta.
Localización	Citoplasmáticas, nucleares (en el núcleo), nucleolares (en el nucleolo).
Forma	Amorfas: Fibrosas, granulosas, vacuoladas, bandeadadas, laminadas, en forma de placas, cuerpos densos, irregulares, etcétera Cristalinas: Hexagonales, piramidales, rectangulares, isométricas, en forma de aguja (paracristalinas).

Nota: Algunos virus inducen diferentes tipos de inclusiones, tanto la del grupo al que pertenecen, como la típica que lo caracteriza dentro del género al que pertenecen

Fuente: Cárdenas, 1999.

ANEXO 4

Síntomas observados en las plantas colectadas

CULTIVO	SINTOMAS
Abutilón	Mosaico foliar, deformación de hojas y flores
Alcatraz	Mosaico, deformación de lamina foliar
Alfeli	Mosaico foliar, deformación de hojas y flores
Anturio	Mosaico foliar, deformación de brácteas y espádice
Azucena	Manchas cloróticas, deformación de hojas, tallos florales y flores
Begonia cerosa	Mosaico foliar, deformación de hojas y brotes, enanismo
Begonia real	Mosaico foliar, deformación de hojas y brotes, raquitismo
Bugamvillea	Mosaico foliar, epinastia
Cactus (<i>Mamillaria</i>)	Mosaico, amarillamiento, brotes deformes
Cactus (<i>O. linguiformis</i>)	Mosaico, deformación y adelgazamiento de pencas
Cactus (Pitahaya)	Mosaico
Cactus (Scontria)	Mosaico en ramas, necrosamiento de tejido
Coleo amarillo	Mosaicos, acortamiento de entrenudos
Coleo rizado	Deformación de hojas, rizado, acortamiento de entrenudos
Coleo variegado	Deformación de hojas, acortamiento de entrenudos
Crisantemo	Mosaico inconspicuo, enanismo deformación y flores reducidas
Croton	Torcimiento y deformación de hojas, acortamiento de entrenudos
Cymbidium	Bandeado
Filodendro selum	Mosaico
Gerbera	Deformación de flores, mosaico, enanismo
Girasol	Mosaico, deformación de hojas, deformación de inflorescencia
Gladiola	Bandeado de nervaduras, deformación de hojas, tallo floral y flores
Gloxinia	Variegado, mosaico, enanismo, deformación de flores
Helecho Blechum	Deformación de fronda, amarillamiento
Helecho Cuero	Amarillamiento de foliolos, deformación de frondas
Helecho Pteris	Deformación de fronda, mosaico difuso
Hiedra gold	Mosaico, amarillamiento, deformación de hojas
Hortensia	Mosaicos, deformación de hojas, brotes y flores
Impatiens	Mosaico, deformación generalizada, manchas necróticas en ramas
Impatiens variegado	Mosaico, deformación generalizada, manchas necróticas en ramas
Lirio azul	Rayado amarillo, mosaico amarillo, torcimiento de hojas
Lily	Mosaico, deformación de hojas, y flores, bulbos aéreos
Mandevila	Mosaico, deformación de lámina foliar
Malvón	Mosaico, reducción de lámina foliar
Noche buena	Mosaico, deformación de hojas, amarillamiento general
Odontoglossum	Mosaico y abullonamiento en flores
Petunia	Mosaico, deformación de hojas, acortamiento de entrenudos
Rosa	Mosaico en hojas, variegación de flores, deformación de flores
Rudbeckia	Variegación, reducción del crecimiento
Salvia	Mosaico, abullonamiento
Spatiphyllum	Deformación de hojas, amarillamiento difuso
Terciopelo	Mosaico, deformación de hojas e inflorescencia
Vinca o teresita	Variegación, acortamiento de entrenudos, mosaico

ANEXO 5

Especies de plantas ornamentales colectadas

FAMILIA	GENERO	ESPECIE	N. COMÚN
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i>	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	Terciopelo
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i>	<i>Hippeastrum hybrid</i> Lectin.	Azucena
Apocynaceae	<i>Catharanthus</i> <i>Mandevilla</i>	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don <i>Mandevilla splendens</i> (Hook.) Woodson	Vinca o teresita Mandevila
Araliaceae	<i>Hedera</i>	<i>Hedera helix</i> L.	Hiedra gold
Araceae	<i>Anthurium</i> <i>Philodendron</i> <i>Spathiphyllum</i> <i>Zantedeschia</i>	<i>Anthurium andreaeanum</i> Lind. <i>Philodendron selloum</i> K. Koch <i>Spathiphyllum</i> sp L. <i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng	Anturio Filodendro selum Spatiphyllum Alcatraz
Asteraceae (Compositae)	<i>Chrysanthemum</i> <i>Gerbera</i> <i>Helianthus</i> <i>Rudbeckia</i>	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> Ramat. <i>Gerbera jamesonii</i> H. Boulus y Hook <i>Helianthus annuum</i> L. <i>Rudbeckia hirta</i> L.	Crisantemo Gerbera Girasol Rudbeckia
Balsaminaceae	<i>Impatiens</i>	<i>Impatiens waleriana</i> Hook. F. <i>Impatiens balsamina variegata</i> L.	Impatiens Impatiens variegado
Begoniaceae	<i>Begonia</i>	<i>Begonia rex</i> L. <i>Begonia x hiemalis</i> L.	Begonia real Begonia cerosa
Cactaceae	<i>Hylocereus</i> <i>Mamillaria</i> <i>Opuntia</i> <i>Scontria</i>	<i>Hylocereus</i> sp L. <i>Mamillaria</i> sp L. <i>Opuntia linguiformis</i> D. Griffiths <i>Scontria chotylla</i> L.	Pitahaya Biznaga Nopal Organillo
Cruciferae	<i>Matthiola</i>	<i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.	Alelí
Euphorbiaceae	<i>Codiaeum</i> <i>Euphorbia</i>	<i>Codiaeum variegatum</i> L. <i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd y Klotzsch	Croton Noche buena
Geraniaceae	<i>Pelargonium</i>	<i>Pelargonium x domesticum</i> Bailey	Malvón
Gesneriaceae	<i>Sinningea</i>	<i>Sinningea speciosa</i> Hiern	Gloxinia
Iridaceae	<i>Gladiolus</i> <i>Iris</i>	<i>Gladiolus hortulanus</i> Bailey <i>Iris germánica</i> L.	Gladiola Lirio azul
Labiatae	<i>Coleous</i> <i>Salvia</i>	<i>Coleous blumei</i> L. <i>Salvia officinalis</i> L.	Coleo rizado Coleo Arc-en-ciel Coleo amarillo Salvia
Liliaceae	<i>Lilium</i>	<i>Lilium maculatum</i> Thunb.	Lily
Malvaceae	<i>Abutilón</i>	<i>Abutilón x hybridum</i> Hort.	Abutilón
Nictaginaceae	<i>Bougamvillea</i>	<i>Bougamvillea glabra</i> Choisy	Bugamvilea
Orchidaceae	<i>Cymbidium</i> <i>Odontoglossum</i>	<i>Cymbidium</i> sp <i>Odontoglossum</i> sp	Orquídea Orquídea
Polypodiaceae	<i>Blechnum</i> <i>Pteridium</i> <i>Rumora</i>	<i>Blechnum</i> sp L. <i>Pteridium</i> sp L. <i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forst.) Ching	Helecho Blechnum Helecho Pteridium Helecho Cuero
Rosaceae	<i>Rosa</i>	<i>Rosa hybrida</i> L.	Rosa
Saxifragaceae	<i>Hydrangea</i>	<i>Hydrangea macrophylla variegata</i> Ser.	Hortensia
Solanaceae	<i>Petunia</i>	<i>Petunia híbrida</i> Hort. y Vilm.	Petunia

Fuente. Sumset, 1990; Tauton, 1990; Tauton, 1991.