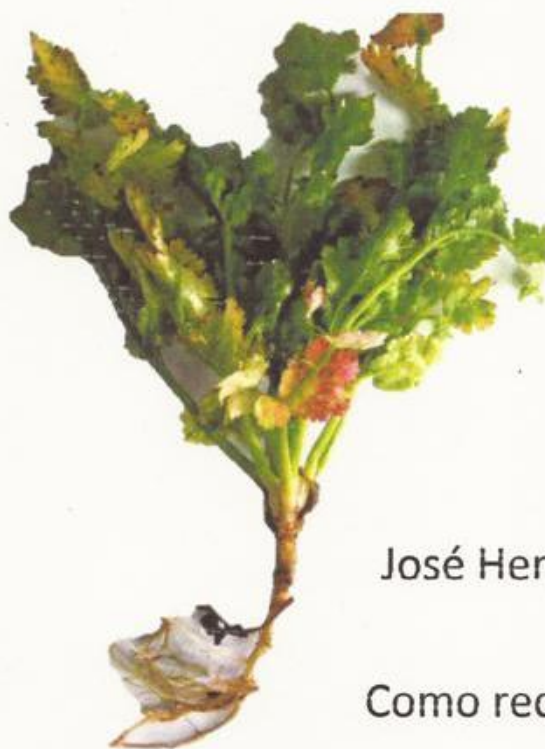




Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Parasitología Agrícola

Maestría en Protección Vegetal



ETIOLOGÍA DEL
"AMARILLAMIENTO O FUEGO"
DEL CILANTRO (*Coriandrum
sativum* L.) UN NUEVO
PROBLEMA FITOPATOLÓGICO

PRESENTA

José Heriberto Flores Monterrosas

Como requisito parcial para obtener
el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Méx. Octubre, 2011

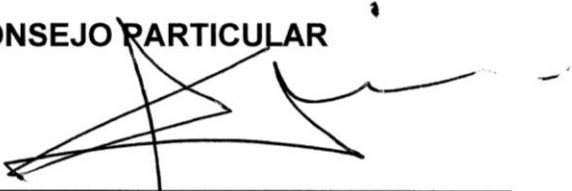


La presente tesis titulada: **ETIOLOGIA DEL “AMARILLAMIENTO O FUEGO” DEL CILANTRO (*Coriandrum sativum* L), UN NUEVO PROBLEMA FITOPATOLÓGICO.** Realizada por el **C. JOSE HERIBERTO FLORES MONTERROSAS**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
MAESTRIA EN PROTECCION VEGETAL

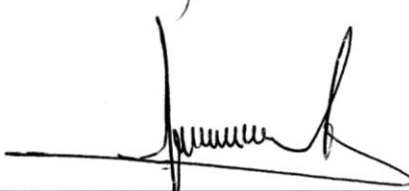
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



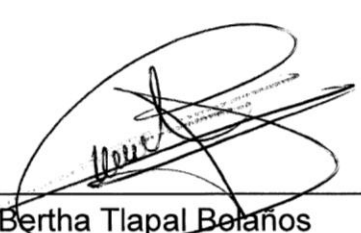
Dr. Víctor Manuel Pinto

CODIRECTOR:



MC. Camilo Hernández Juárez

ASESOR:



MC. Bertha Tlapal Bolaños

Chapingo, Estado de México, Noviembre de 2011.

Dedicatoria

A mis padres Esteban T. Flores J. y Jovita H. Monterrosas J. por motivarme a seguir en el camino del conocimiento teórico-científico. Pero sobre todo a mi padre, por hacerme ver que nunca se deja de aprender y que en el momento en que me gradué de licenciatura apenas había comenzado mi verdadera carrera en la vida.

Ellos por ser el más claro ejemplo de que se pueden hacer bien las cosas, cuando se desean, pero siempre y cuando si se es congruente con lo que se dice y se hace.

Por haberme enseñado que la educación no es la única manera de alcanzar el éxito, pero si es una gran herramienta para hacerlo en menor tiempo.

Por enseñarme que la familia es la base para estar bien con uno mismo y así poder brindarle algo a los demás.

Porque gracias a ellos aprendí a tener cordura y comprendí que siempre habrá momentos difíciles, pero pueden superarse y se puede aprender de ellos.

Por confiar en mí y estar a mi lado durante estos 24 años de existencia.

En cinco palabras papa, mama: "son mi fuente de inspiración"

Agradecimientos

Al la universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad de seguirme preparando en sus aulas, ya durante 7 años.

Al Departamento de Parasitología Agrícola de esta casa de estudios, por darme la posibilidad de hacer una Maestría que cumplió con todos mis propósitos y con un excelente nivel.

Al CONACYT por brindarme el apoyo económico y la confianza brindada durante estos 2 años.

Al área de Virología Agrícola del Departamento por ofrecerme un lugar y darme las facilidades para realizar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Victor Manuel Pinto por dirigir mi tesis, por su realismo, sus consejos y amabilidad mostrada, desde el momento en que entre a la Maestría.

Al M.C. Camilo Hernández Juárez por creer en mí y apoyarme en la investigación de este problema, con sus conocimientos, experiencia, consejos, y enseñanzas. Por motivarme a seguir a delante y enseñarme que la investigación, más que una herramienta, es un estilo de vida.

Al la M.C. Bertha Jlapal Bolaños, por brindarme su apoyo y conocimientos en la parte de hongos fitopatógenos de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Entomología de la DGSV del SENASICA, por brindarme su apoyo en el montaje de pulgones.

Al la M.C. Nancy Villegas por brindarme su tiempo, conocimientos, amabilidad y apoyo en la identificación de áfidos. Gracias también, por sus consejos y tolerancia para conmigo.

Al Tecnico. Mario por sus consejos, contribuciones y conocimientos en el área de Virología Agrícola.

Al mi padre por su apoyo en la colecta de material, muestreo y referencia de zonas con presencia del problema, a mi madre y a mis hermanos Ime, Luis, Jaime y Donald por apoyarme en diferentes momentos con sus consejos y apoyo incondicional durante estos 2 años.

Al mis amigos Martha, Geras, Andrés, Mercedes y Gildardo por apoyarme con el cuidado de mis plantas y actividades en laboratorio y a mis amigos, Sandra, Martha, Gerardo, Elizabeth, Fmita, Susy, Marina, Lupita, Maria, Kenia, Vianca, Deyxi, Rocío, Lily y todos mis compañeros por su amistad y apoyo, durante estos 2 años.

Al Mayte por sus consejos, amistad, ayuda, soporte y amor durante estos meses juntos....

Agradecimiento Especial a



Senasica | Servicio Nacional de Sanidad,
Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

"Laboratorio de Entomología y Acarología" de la Dirección General de Sanidad Vegetal DGSV-CNRF del SENASICA, por el apoyo brindado para el montaje y toma de fotografías de pulgones.

A cargo del M.C. Héctor Enrique Vega Ortiz (Jefe del Departamento de Entomología y Acarología) y en ejecución del Biol. Román Martínez Rosas (Coordinador del Laboratorio de Entomología y Acarología) y la Biol. Nallely Acevedo Reyes (Técnico en diagnóstico).

Contacto

M.C. Héctor Enrique Vega Ortiz

Jefe del Departamento de Entomología y Acarología

01(55) 59 05 10 00, 50 90 30 00 ext.51368

enrique.vega@senasica.gob.mx

Datos biográficos

José Heriberto Flores Monterrosas, nació en la Localidad de Palmarito Tochapán, Quecholac, Puebla el 5 de Agosto de 1987, Ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo para cursar sus estudios de Licenciatura, en la Carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, concluyendo estos, en el año 2009 de manera destacable al graduarse con Mención Honorífica. En ese mismo año ingreso a la Maestría en Protección Vegetal de esta misma casa de Estudios. A la par participo activamente en asesoría técnica y colaboro con asociaciones de productores de hortalizas. A la fecha se ha instruido en diagnostico fitosanitario e inocuidad, además de ser especialista en el cultivo del cilantro, diferentes hortalizas a campo abierto e invernadero, y estar acreditado en la elaboración de proyectos agrícolas.

ETIOLOGÍA DEL “AMARILLAMIENTO O FUEGO” DEL CILANTRO (*Coriandrum sativum* L) UN NUEVO PROBLEMA FITOPATOLÓGICO

¹Flores M. J. H.; ²Hernandez J. C.; ³Pinto M. V.; ⁴Tlapal B. B.

RESUMEN

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) es una especie importante por su uso alimenticio e industrial. En México el estado de Puebla es el principal productor, donde recientemente se observó la incidencia del síndrome conocido como “Amarillamiento o fuego del cilantro”, su origen aún desconocido y las numerosas pérdidas ocasionadas, lo convirtieron en un serio problema. Por lo anterior este trabajo tuvo como objetivos determinar la etiología de la enfermedad y su comportamiento en relación a 7 genotipos de cilantro; se realizaron ensayos con factores abióticos; se identificaron vectores asociados y se efectuaron pruebas de detección de bacterias, hongos y virus. Los resultados obtenidos, revelan que esta enfermedad es causada por el *Turnip Yellow Virus* (TuYV) y otros virus no identificados, que son transmitidos por *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*, y que asociados con tres especies de *Fusarium*, forman un complejo que incrementa la severidad del daño.

Key words: Cilantro, amarillamiento o fuego, virus, afidos, etiología, enfermedad

¹Autor de la tesis: Ing. José Heriberto Flores Monterrosas, Egresado de la Maestría en Protección vegetal, de la Universidad Autónoma Chapingo, E-mail: flores_m2@hotmail.com

²MC. Camilo Hernández Juárez, ³Dr. Víctor Manuel Pinto, y ⁴MC. Bertha Tlapal Bolaños, Asesores de la tesis, Profesores Investigadores del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ETIOLOGY OF “YELLOWING OR FIRE” IN CORIANDER (*Coriandrum sativum* L), A NEW PHYTOPATHOLOGICAL PROBLEM

¹Flores M. J. H.; ²Hernandez J. C.; ³Pinto M. V.; ⁴Tlapal B. B.

ABSTRACT

Coriander (cilantro in Spanish) is an important industrial and food crop worldwide. In Mexico, Puebla is the main coriander producer, where a relative new disease of “Yellowing or fire” of the leaves was recently observed. There is not information upon nature and disease etiology, but severe economic losses are already present in many growing areas. This work was performed to establish the origin and etiology of the disease on seven coriander genotypes. Several assays under control conditions were carried out to determine whether or not disease was connected to environmental factors (nutrients or herbicides) or phloem-limited bacteria, virus, fungi and insect vectors transmission. Results showed that this disease is caused by *Turnip Yellow Virus* (TuYV) and other unidentified virus that are transmitted by *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. However some *Fusarium* spp. Fungi were also associated. A complex disease might be the main explanation.

Key words: Coriander, yellowing or fire, virus, aphids, etiology, disease

¹Autor de la tesis: Ing. José Heriberto Flores Monterrosas, Egresado de la Maestría en Protección vegetal, de la Universidad Autónoma Chapingo, E-mail: flores_m2@hotmail.com

²MC. Camilo Hernández Juárez, ³Dr. Víctor Manuel Pinto, y ⁴MC. Bertha Tlapal Bolaños, Asesores de la tesis, Profesores Investigadores del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
ABREVIATURAS USADAS.....	XIX
1. INTRODUCCION GENERAL	1
2. OBJETIVOS GENERALES.....	4
3. REVISION DE LITERATURA	4
3.1. Generalidades.....	4
3.2. Origen y taxonomía del cilantro	4
3.3. Requerimientos agroclimáticos.....	5
3.4. Panorama Mundial	6
3.5. Panorama Nacional.....	9
3.6. Usos y composición	12
3.7. Variedades cultivadas	14
3.8. Requerimientos nutrimentales	15
3.9. Plagas y enfermedades reportadas en cilantro.....	16
3.9.1. Enfermedades del cilantro	16
3.10. Malezas	25
3.11. Daños por factores abióticos.....	26
3.12. Transmisión de agentes patogénicos por insectos.....	29
3.12.1. Transmisión de virus por insectos	29
4. METODOLOGIA GENERAL	31

CAPITULO 1. Descripción del problema, su posible transmisión por semilla y/o suelo, y su relación con otros agentes no bióticos

I.	INTRODUCCIÓN.....	33
II.	OBJETIVOS.....	34
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1.	Fase de campo.....	34
3.2.	Fase de laboratorio.....	36
3.2.1.	Lugar de trabajo	36
IV.	RESULTADO Y DISCUSIÓN	39
4.1.1.	Entrevista a productores.....	39
4.1.2.	Colecta de muestras	42
4.1.3.	Evaluación de la distribución espacial e incidencia de la enfermedad	51
4.2.	Fase de laboratorio.....	53
4.2.1.	Prueba de germinación.....	53
4.2.2.	Ensayo de transmisión de patógenos presentes en el suelo y por semilla.....	55
4.2.2.4.	Interacción de factores (suelo, fertilizacion y variedad)	57
4.2.3.	Ensayo de fitotoxicidad por Linuron.....	58
V.	CONCLUSIONES DEL CAPITULO	60

CAPITULO 2. Insectos asociados al “amarillamiento o fuego del cilantro”

I.	INTRODUCCIÓN.....	62
II.	OBJETIVOS.....	63
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1.	Identificación de insectos.....	63
3.2.	Pruebas de transmisibilidad	64

3.3.	Posibles virus transmitidos por los insectos encontrados	65
3.4.	Pruebas moleculares.....	65
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1.	Identificación.....	65
4.2.	Pruebas de transmisibilidad	74
4.3.	Sintomatología reproducida.....	74
4.4.	Periodos de incubación.....	78
4.5.	Afidos transmisores	79
4.6.	Posibles virus relacionados con la enfermedad en base a vectores encontrados	80
V.	CONCLUSIONES DEL CAPITULO.....	83
CAPITULO 3. Patógenos vasculares involucrados con la enfermedad		
I.	INTRODUCCIÓN.....	85
II.	ObjETIVOS	85
III.	MATERIALES Y METODOS.....	86
3.1.	Pruebas de diagnostico.....	86
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.1.	Pruebas de diagnostico.....	90
4.3.	Extracción de acidos nucleícos totales de platas enfermas	94
4.4.	Determinación de la integridad del AND y ARN	96
4.5.	PCR punto final	97
4.6.	Determinación de los posibles virus presentes.....	103
V.	CONCLUSIONES DEL CAPITULO	104

CAPITULO 4. Hongos asociados a la enfermedad

I.	INTRODUCCION.....	106
II.	OBJETIVO	106
III.	MATERIALES Y METODOS.....	107
3.1.	Colecta de material.....	107
3.2.	Aislamiento de los hongos	107
3.3.	Pruebas de patogenicidad.....	107
3.4.	Incidencia de hongos en semilla.....	107
3.5.	Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i>	108
3.6.	Prueba de patogenicidad en invernadero.....	108
3.7.	Re aislamiento	108
3.8.	Identificación morfológica y fisiológica.....	108
3.9.	Identificación molecular	109
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	110
4.1.	Hongos aislados.....	110
4.2.	Pruebas de patogenicidad.....	111
4.3.	Re aislamiento	115
4.4.	Identificación morfológica	118
4.5.	Identificación por PCR.....	121
V.	CONCLUSIONES DEL CAPITULO	123
5.	DISCUSION GENERAL	124
6..	CONCLUSIONES GENERALES	127
7..	RECOMENDACIONES	129
8..	BIBLIOGRAFIA.....	129

9. ANEXOS137

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de Cilantro, hinojo y anís a nivel mundial	7
Cuadro 2. Países con mayores rendimientos a nivel mundial de cilantro, hinojo y anís.....	9
Cuadro 3. Composición química de la semilla de cilantro.....	13
Cuadro 4. Promedio de los niveles de nutrientes en hojas y su rango de 17 parcelas de cilantro en 2000 y 2001.	16
Cuadro 5. Virus reportados en umbelíferas	19
Cuadro 6. Vectores de <i>Tospovirus</i>	30
Cuadro 7. Tratamientos utilizados en el ensayo de transmisión por semilla y patógenos presentes en suelo.....	38
Cuadro 8. Tratamientos establecidos, para los ensayos de Linuron.	39
Cuadro 9. Promedio y rangos de condiciones ambientales prevalecientes en los municipios afectados.	42
Cuadro 10. Semilla colectada en diferentes municipios del estado de Puebla.....	43
Cuadro 11. Porcentaje de germinación de las 6 variedades colectadas y el criollo.	54
Cuadro 12. Chicharritas colectadas en cilantro.....	68
Cuadro 13. Pulgones identificados en los distintos sitios de muestreo.	69
Cuadro 14. Periodos de incubación presentados para los diferentes síntomas.	78
Cuadro 15. Virus reportados en umbelíferas, transmitidos por los áfidos, sus agentes y mecanismos de transmisión.....	81
Cuadro 16. Resultados de la prueba de inoculación mecánica de diferentes colectas de plantas con síntomas de “amarillamiento o fuego del cilantro”.....	90
Cuadro 17. Virus que se transmiten mecánicamente, reportados en cilantro.....	92
Cuadro 18. Virus reportados en cilantro que no se transmiten mecánicamente.	93
Cuadro 19. Virus reportados en umbelíferas que no se transmiten mecánicamente.....	94

Cuadro 20. Muestras de plantas de las cuales se extrajeron ácidos nucleicos para las pruebas moleculares.	94
Cuadro 21. Muestras de pulgones y de re aislados de plantas con síntomas.	95
Cuadro 22. Virus de los que se sospecha y sus formas de transmisión.	103
Cuadro 23. Incidencia de hongos en 7 variedades de cilantro, colectadas en el Estado de Puebla.	111
Cuadro 24. Comparación de las especies de hongos a las cuales se parecen los aislados 1, 2, y 3.	122

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación Taxonómica de Cilantro	5
Figura 2. Principales países importadores de cilantro, hinojo y anís	8
Figura 3. Principales países exportadores de Cilantro, hinojo y anís	9
Figura 4. Principales estados productores de cilantro en fresco en México.....	10
Figura 5. Principales municipios productores de cilantro en el Estado de Puebla.....	10
Figura 6. Municipios productores de cilantro en fresco en el Estado de Puebla.....	12
Figura 7. Síntomas ocasionados por el <i>Carrot red leaf virus</i> (CRLV) derecha y sana izquierda.	21
Figura 8. Hoja de cilantro infectada que muestra manchas amarilla (lado izquierdo), hoja sana (lado derecho).	22
Figura 9. Daño por ácaros.....	25
Figura 10. Temperatura máxima en los municipios con problemas.	40
Figura 11. Temperatura mínima en los municipios con problemas.....	41
Figura 12. Precipitación en los municipios con problemas	41
Figura 13. Clorosis en nervaduras de hojas de cilantro en diferentes grados de severidad ..	45
Figura 14. Enrojecimiento de las hojas del cilantro.	46
Figura 15. Clorosis inter-venal	47
Figura 16. Moteado en hojas..	48

Figura 17. Manchas cloróticas en las hojas.....	49
Figura 18. Achaparramiento en plantas.....	50
Figura 19. Sitio de colecta, Tehuacán, distribución en manchones de la enfermedad.	51
Figura 20. Prototipo de la distribución de la enfermedad en el terreno.	52
Figura 21. Cultivo de cilantro en el municipio de Quecholac, afectado por la enfermedad, con una incidencia superior al 70%.	53
Figura 22. Germinación de semillas de la variedad Sun master, a los 12 días después de la siembra.	53
Figura 23. Comparación de una hoja sana (testigo) y una hoja enferma.	55
Figura 24. Hojas de plantas con y sin fertilizar.....	56
Figura 25. Plantas a los 52 días después de la siembra, con los respectivos tratamientos. ...	58
Figura 26. Síntomas de fitotoxicidad de Linuron.	59
Figura 27. Trips (<i>Frankliniella occidentalis</i> .) encontrados en cilantro.	67
Figura 28. Psílido <i>Bactericera cockerelli</i> (paratrioza) colectado en cilantro.	67
Figura 29. <i>Empoasca</i> sp. la chicharrita presente en la mayoría de los municipios visitados.	68
Figura 30. <i>Myzus persicae</i> , alado colectado en cilantro.....	70
Figura 31. <i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i> , áptero colectado en raíces de cilantro.....	71
Figura 32. <i>Macrosiphum euphorbiae</i> . Adulto alado. Colectado en cilantro.	72
Figura 33. Síntomas de necrosis de nervaduras en cilantro, provocado por el patógeno transmitido por áfidos.	74
Figura 34. Amarillamiento de nervaduras en cilantro provocada por patógeno transmitido por los áfidos.....	75
Figura 35. Síntomas de moteados, y enrojecimientos, reproducidos al hacer transmisión con áfidos.....	76
Figura 36. Plantas con síntomas de achaparramientos, moteados y enrojecimientos, reproducidos al hacer transmisión por áfidos.....	76
Figura 37. Plantas utilizadas como testigos, síntoma presentado al colocar áfidos, fue un ligero amarillamiento de la hoja y enrollamiento.	77

Figura 38. Comparación del testigo (A) con los síntomas de una planta infectada (B) inoculada con <i>Myzus persicae</i> y <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	77
Figura 39. Síntoma de Manchas cloróticas	78
Figura 40. Áfidos de la especie <i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i> , encontrados en cuello (A) y raíces (B) de plantas enfermas con “amarillamiento o fuego”.	80
Figura 41. Síntomas en plantas del primer ensayo de inoculación mecánica.....	91
Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando la integridad de los ácidos nucleicos de extractos obtenidos de las muestras de cilantro.	96
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando la integridad de los ácidos nucleicos de extractos obtenidos a partir de muestras de áfidos usados como vectores de virus en cilantro. Note la degradación a los 20 días de la extracción (con fecha 26-06-11). ..	97
Figura 44. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos obtenidos de las muestras de cilantro CL ₂ y CL ₁ (clorosis de nervaduras). Ma (marcador de peso molecular). b) tabla guía del marcador de peso molecular.....	98
Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gradiente térmico, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos obtenidos de muestras de cilantro. Carriles: a, 65°C; b, 62.84°C; c, 60.7°C; d, 58.56°C; e, 56.42°C; f, 54.28°C; g, 52.14°C; h, 50°C, M, marcador y -, un negativo.....	99
Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos de plantas con síntomas. La parte baja de la figura indica que las muestras dieron positivo.	100
Figura 47. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR para virus de la familia Luteoviridae, del segundo grupo de muestras (extraídas de plantas con “Amarillamiento o fuego”). El + corresponde a las muestras CL1. La parte inferior de la figura muestra la interpretación de la prueba.	101
Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de muestras para <i>Xylella fastidiosa</i> . En la parte baja se indica la interpretación de la prueba.	102
Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de gradiente térmico, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR en 11 muestras probadas para <i>Candidatus liberibacter solanacearum</i>	102
Figura 50. Aislamientos de hongos presentes en cilantro. a) aislado 1, b) aislado 2, y c) aislado 3.....	110

Figura 51. Osporas de hongos asociados a semilla de cilantro de las distintas variedades. A) <i>Alternaria</i> sp., B) <i>Arthrobotrys</i> sp., y C) <i>Cladosporium</i> sp.....	112
Figura 52. Plantas de cilantro atacadas por el aislado 1.....	113
Figura 53. Plántulas de cilantro invadidas por el aislado 2.	113
Figura 54. Plantas de cilantro atacadas por el aislado 3.....	114
Figura 55. Síntomas provocados por los hongos inoculadas en el ensayo en invernadero. a) planta inoculada con aislado 2, b) planta inoculada con aislado 1, c) planta inoculada con aislado 3, y d) testigo.....	115
Figura 56. Re aislamiento del aislamiento 1, de algunas de las variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro comparadas con el inóculo inicial.	116
Figura 57. Re aislamiento del aislamiento 2 de algunas de las variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro, y su comparación con el inóculo inicial.	116
Figura 58. Re aislamiento del aislamiento 3, de algunas variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro, y su comparación con el inóculo inicial.	117
Figura 59. Re aislamiento de los aislamientos 1 y 2 de las plantas utilizadas en el ensayo de patogenicidad en macetas, a) inóculo inicial aislamiento 1, b) inóculo inicial aislamiento 2.	117
Figura 60. Estructuras del aislamiento 1; a) monofialides, b) clamidosporas, c) conidios bicelulares y d) macroconidios.	119
Figura 61. Estructura morfológicas del aislamiento 2; a), c), d), f) clamidosporas, b) micelio, e) macroconidios.....	119
Figura 62. Estructuras morfológicas del aislamiento 3; a), e) macroconidios, b) conidios bocelilares, c), f) fialides, y d) vista general de conidios.	120
Figura 63. a) Siembra de la cepa 2, para la identificación a nivel de especie, mediante la prueba de coloración del medio, b) cepa 2 a los 10 días de ser sembrada.	120
Figura 64. Gel de agarosa al 0.8%, en el que se observa la integridad de los ácidos nucleicos.	121
Figura 65. Gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el fragmento amplificado resultante del PCR de los aislamientos, 1,2 y 3 aislados en cilantro.	121

ABREVIATURAS USADAS

Organizaciones o instituciones

- ☐ FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- ☐ ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
- ☐ ISTA: International Seed Testing Association
- ☐ SAGARPA: Secretaria De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación
- ☐ SNICS: Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
- ☐ SDR: Secretaria de Desarrollo Rural
- ☐ SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria Y Pesquera

Medidas o dimensiones

- ☐ °C: Grados centígrados
- ☐ Ha: Hectáreas
- ☐ f.sp.: Forma especial del hongo
- ☐ g: Gravedades
- ☐ hrs: Horas
- ☐ kg: Kilogramos
- ☐ i.a: Ingrediente Activo
- ☐ lt: Litros
- ☐ Picom: Picomoles
- ☐ M: Molar
- ☐ min: Minutos
- ☐ Msnm: Metros sobre el nivel del mar
- ☐ mM: Milimolar
- ☐ Ton: Toneladas
- ☐ ton•ha: Toneladas por hectárea
- ☐ μM: Micromolar
- ☐ μL: Microlitro
- ☐ U: Unidades

I. INTRODUCCION GENERAL

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) pertenece a la familia botánica Apiaceae (Umbeliferae), se conoce prácticamente en todo el mundo con diferentes nombres dependiendo el idioma. La producción mundial de cilantro se estima en 499,626 toneladas anuales y una superficie cosechada de 666,769 ha, según la FAO (2011); siendo los principales países productores a nivel mundial India, México, China, Bulgaria, Irán y Siria. Cabe destacar que México es el segundo productor a nivel mundial con cerca de 50,000 toneladas anuales, lo cual es bastante trascendente ya que en 1992 se ubicaba en el cuarto lugar y producía por debajo de las 25,000 toneladas al año según Diederichsen (1996). El mayor importador a nivel mundial es Estados Unidos de América (USA) debido al consumo en fresco por la comunidad migrante; USA importó más de 20,000 toneladas durante el año 2008. Por otro lado, los países que más exportan son los que más producen, a excepción de México que a pesar de ser el segundo productor a nivel mundial, no figura dentro de los países exportadores, esto se debe al consumo que se tiene en el país, a raíz de la cultura culinaria en relación a nuestros platillos. México tiene rendimientos por encima de las 8 toneladas en fresco por ha; en cuando a semilla van de 1.5 a 3.0 toneladas por ha (Diederichsen, 1996).

Los usos tradicionales del cilantro, se basan en productos primarios, como son los frutos y el follaje en fresco. El cilantro junto con otras especies vegetales se clasifica como “hierbas medicinales, aromáticas, y de condimento”. Se consume en forma fresca, cocida o deshidratada, además de ser industrializado para la extracción de aceite esencial y productos farmacéuticos. Un uso nuevo que se le ha encontrado es como antibacterial, debido a la sustancia llamada “dodecenal” que contiene en las hojas según lo reportado por el Universal (2005).

En México, la producción tiene como objetivo el consumo en fresco y son 22 los estados productores de cilantro, que en conjunto generaron 45,873.8 ton en fresco y sembraron cerca de 5,426.3 ha, SIAP-SAGARPA (2011). El estado de Puebla ocupó prácticamente la mitad de esa superficie, sembrando en ese año 2,647.3 ha y

produciendo más de 22,500.0 toneladas de este cultivo. Son 44 los municipios productores, generando un rendimiento promedio de 8.6 ton de producto en fresco por ha. El principal municipio productor a nivel estatal es Atlixco, seguido por Tepeaca y Quecholac.

La producción de cilantro a nivel mundial, se ha visto muy poco afectada por el ataque de plagas y enfermedades, a diferencia de la zanahoria y el apio, por lo cual se ha desviado la atención por completo hacia estos dos cultivos de la misma familia del cilantro; los reportes de daños de importancia económica por enfermedades, se han debido a la mancha bacteriana de la hoja (APS, 2011) En cuanto a las plagas solo se mencionan larvas de Lepidópteros causando daños. Existen reportes de otras plagas y enfermedades del cultivo pero no se mencionan como daños frecuentes o de importancia. La investigación en cuanto al tema fitosanitario en el cultivo del cilantro es escasa y se ha enfocado principalmente al control de malezas; debido a que en la mayoría de los países productores, la parte de interés es el fruto, y entonces se ha hecho muy poca investigación en relación al follaje.

En México la investigación en relación al cultivo (tesis de universidades), se ha enfocado al rendimiento de variedades, la nutrición y la comercialización. En el estado de Puebla, que es el principal productor de cilantro, la investigación se ha enfocado a las enfermedades fungosas; sin embargo, según reportes del CESAVER (2009) y datos de los productores, en los últimos 3 años, se ha presentado un problema fitosanitario de origen desconocido, en 15 de los municipios productores, algunos de ellos son; Quecholac, Palmar de Bravo, San Salvador el seco, Tehuacán, Atlixco, San Martín Texmelucan, donde se produce este cultivo desde ya hace más de 15 años; esta enfermedad es conocida por los productores como “Amarillamiento o fuego del cilantro” y ha ocasionado grandes pérdidas a pesar de no causar la muerte de la planta, las incidencias de la enfermedad son de hasta 100% y severidades que van del 60 al 100%, dañando la parte útil de la planta que es el follaje, esto principalmente en la temporada de altas temperaturas del ciclo de producción que abarca desde finales de marzo a finales de agosto. Los productores han invertido recursos en la aplicación de fungicidas y bactericidas, para tratar de

disminuir los daños por la enfermedad, sin embargo, no se ha logrado controlar una vez las plantas presentan los síntomas (Comunicación personal con productores de cilantro).

Los síntomas de la enfermedad observados en la planta son; 1) en hojas: clorosis con diferentes variantes (mosaico, moteado, coloraciones que van desde amarillo, rojo a púrpura, manchas cloróticas), deformación, clorosis y necrosis de nervaduras, 2) en tallos: acortamiento de entrenudos (Achaparramiento), 3) en raíces: no hay síntomas visibles.

En el estado de Puebla el CESAVER en (2009), realizó un estudio de las diferentes áreas productoras de cilantro y sus problemas fitosanitarios, debido a las pérdidas por causas de esta índole. En el boletín resultante se mencionó la incidencia de hongos, nematodos, insectos, bacterias, y deficiencias nutrimentales, sin embargo, no menciona a cuál de estos patógenos se debe la problemática actual, y recomienda un manejo Integrado del cultivo a fin de disminuir las pérdidas que se están ocasionando. Los síntomas que describen coinciden con los reportados por los productores para el “amarillamiento o fuego del cilantro”.

Este síndrome, sugieren muchas causas, que van desde deficiencias nutrimentales, daños por hongos, nematodos, bacterias, ó bien patógenos presentes en haces vasculares como virus, bacterias de floema ó Fitoplasmas, esto debido a que en la práctica el cilantro es una planta muy endeble, y con cualquiera los factores mencionados generaría síntomas hasta cierto punto parecidos a los descritos por los productores. Por otro lado, la agresividad de la enfermedad y la presencia de áfidos, entre otros insectos chupadores, que son potenciales vectores de agentes fitopatógenos, sugieren la posibilidad de tratarse de una enfermedad de origen viral u fitoplasmática

En la actualidad la información disponible sobre los patógenos que están provocando esta enfermedad (*“Amarillamiento o Fuego del cilantro”*) es muy escasa, y se desconoce la etiología del síndrome observado, que a la fecha sigue causando

pérdidas y se sigue expandiendo a nuevas áreas de producción, por tanto se plantearon los siguientes objetivos del trabajo:

II. OBJETIVOS GENERALES

- ⇒ Determinar la etiología del “Amarillamiento o Fuego del Cilantro”, para poder aplicar medidas de control adecuadas y disminuir las perdidas que hasta la fecha genera este problema.
- ⇒ Observar el comportamiento de 7 genotipos de cilantro, en relación con la enfermedad, para determinar si alguna de estas variedades es tolerante a la enfermedad.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. Generalidades

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) pertenece a la familia botánica Apiaceae (Umbeliferae), al igual que otros cultivos de importancia como la zanahoria, el perejil y el apio, por mencionar algunos. Es una especie anual de crecimiento rápido y erecto (FDA, 2011). Según las condiciones del lugar es cultivado en primavera-verano u otoño-invierno, en México se produce todo el año.

Se conoce prácticamente en todo el mundo pero con diferentes nombres dependiendo el idioma por ejemplo: cilantro, coriandro, cilandrio y culantro (español), kuzbara, kuzbura (Arabia), chamem (Armenia), yuan suil, hu sui (Chino), coriander, collender, chenese parsley (Ingles), koendoro (japonés), etc. Sin embargo en algunos países como la India y Etiopia donde se cultiva ampliamente, este llega a tener nombres variables incluso entre provincias, teniendo en la India 18 nombres distintos, siendo el más conocido dhanía y en Etiopia 7, siendo el más común dembilal (Diederichsen, 1996).

3.2. Origen y taxonomía del cilantro

En la lista de los centros de origen de las plantas cultivadas, Vavilov (1992) citado por García (2007), menciona que el origen del cilantro es Asia Central y el cercano

oriente en Abisinia y en cada una de estas áreas se puede encontrar de distintas. Es nombrado en un papiro egipcio que data de 1550 a. C. y que enlista plantas medicinales, además menciona que los judíos deben haber conocido el cilantro antes de llegar a Egipto (aproximadamente 2000 a.C.) ya que en el antiguo Testamento se menciona la palabra “Gad” y que es traducido usualmente como cilantro o probablemente pueda referirse a la especie *Artemisia* L. debido a su similitud con la palabra “goid” la cual es la palabra hebrea para cilantro (Diederichsen, 1996). Los frutos de cilantro más antiguos descubiertos se hallaron en la cueva Nahal Hemar en Israel (6000 a.C.) de acuerdo a Zohary *et al.*, (1993), citado por García (2007).

El cilantro pertenece a la subfamilia Apioidae, la cual incluye la mayoría de los géneros de la familia Umbelliferae. La taxonomía de las plantas cultivadas de esta familia es ampliamente mencionada por Mansfeld, (1959); Diederichsen, (1996) (Fig. 1).

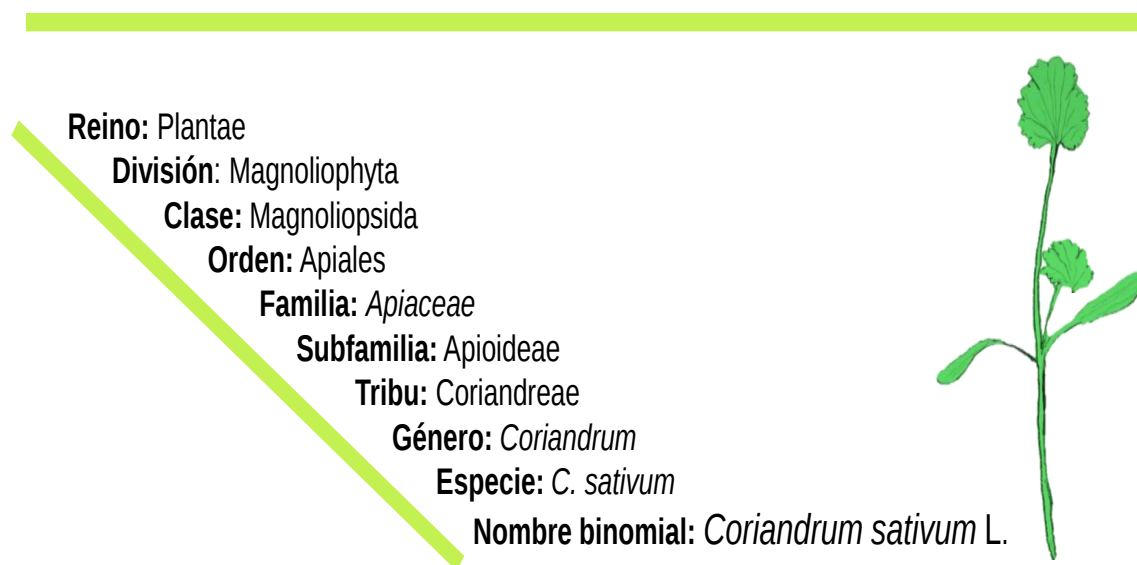


Figura 1. Clasificación Taxonómica de Cilantro Diederichsen, (1996)

3.3. Requerimientos agroclimáticos

El cultivo del cilantro se desarrolla bien en climas templados o templado-cálidos, en los que exista un rango de temperaturas de 16 a 20 °C desde la germinación hasta el momento de la cosecha de semilla, ya que el cultivo es susceptible a las heladas

aunque se le considera ligeramente resistente al frío respecto a otras umbelíferas (Purseglove et al. 1981, citado por García, 2007). En relación a la altitud, puede alcanzar un buen desarrollo hasta los 1200 msnm aunque existen variedades que soportan mayores altitudes. De acuerdo a Nau, (1999), citado por García, (2007), la temperatura a la cual germinan las semillas se ubica entre los 18 a 21 °C siendo estas indiferentes a la iluminación de las semillas durante la germinación, es decir, la semilla germina si está expuesta a la luz o si ha sido cubierta con algún medio. Asimismo, este autor agrega que el rango de temperatura dentro del cual la planta alcanzará a desarrollarse se sitúa entre los 13 a 14 °C. Simón, (1984), citado por García, (2007), mencionó que se desarrolla entre los 7 a 27 °C, con una precipitación anual de 0.3 a 2.6 m.; agregó que es un cultivo tolerante al frío, calor y estrés hídrico. Smith *et al.*, (2011), menciona que puede crecer bajo un amplio rango de condiciones climáticas. En el verano el cultivo puede madurar de 40 a 45 días; además de tolerar heladas ligeras.

3.4. Panorama Mundial

3.4.1. Producción

La producción mundial de cilantro se estima en 499,626 toneladas anuales y una superficie cosechada de 666,769 ha, FAO, (2011) estos datos contemplan la producción de hinojo y anís, ya que no existen datos aislados del cultivo en específico y que sean actuales. Los principales productores a nivel mundial son India, México, China, Bulgaria, Irán y Siria (Cuadro 1). Aunque la diferencia entre el mayor productor y los demás prácticamente es del doble. Cabe destacar que México es el segundo productor a nivel mundial con 50,000 ton anuales (FAO, 2011), lo cual es bastante trascendente ya que en 1992 se ubicaba en el cuarto lugar y producía por debajo de las 25,000 ton al año (Diederichsen, 1996).

Cuadro 1. Principales países productores de Cilantro, hinojo y anís a nivel mundial

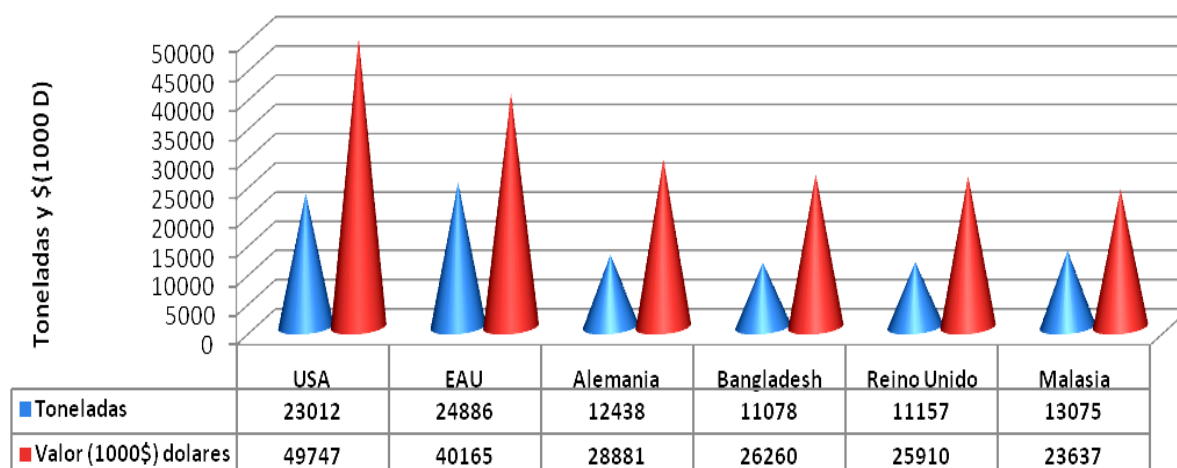
Lugar	País	Toneladas
1	India	176,615
2	México	50,000
3	China	42,000
4	Bulgaria	33,957
5	Irán	31,431
6	Siria	30,829
7	Marruecos	23,000
8	Egipto	22,000
9	Rusia	11,200
10	Túnez	9,800

Fuente: Elaborado con datos de la FAO hasta el 2009.

3.4.2. Importación

Los países que más importan son aquellos países donde se industrializa o bien se consume el producto por su uso culinario, pero en el caso de Estados Unidos de América (USA) se dan ambas cosas, debido a que a pesar de producirse cilantro en sus dos estados líderes en producción agrícola (California y Florida), este es el mayor importador a nivel mundial, dado que se consume en fresco por las comunidad latina que se encuentra habitando en este país. Como se ilustra en la fig. 2, según datos de la FAO,(2011), este país importó más de 20,000 toneladas durante el año 2008, con un valor de cerca de 50 millones de dólares en ese mismo año, seguido de Emiratos Árabes Unidos (EAU), Alemania, Bangladesh entre otros. Los datos al igual que en producción y rendimiento son la suma de cilantro, hinojo y anís; los dos últimos ocupan un % muy bajo comparados con el cilantro. Cabe mencionar, que a pesar de que en nuestro país se consume ampliamente el cilantro en fresco, se tiene un superávit.

Figura 2. Principales países importadores de cilantro, hinojo y anís



Fuente: Elaborado, con datos correspondientes al 2008, FAO, 2011.

3.4.3. Exportación

Por otro lado los países que más exportan son los que más producen, a excepción de México que a pesar de ser el segundo productor a nivel mundial, no figura dentro de los países exportadores, esto se debe principalmente al enorme consumo interno que se tiene, a raíz de la cultura culinaria. Y a pesar de exportar grandes cantidades de cilantro fresco a USA, no es suficiente para rebasar las 1,000 ton anuales o visto en dinero los 3 millones 500 mil dólares anuales, según datos de la FAO, (2011), los principales exportadores son India, Bulgaria, Siria, China, Turquía, Países bajos, etc. (Fig. 3), donde la india sobrepasa las 120,000 ton anuales u expresado en valor los 236 millones de dólares anuales. De igual manera los datos contemplan cilantro, hinojo y anís, pero con % de participación incipiente dentro de estas cifras.

3.4.4. Rendimiento

Palestina es el país con mejores rendimientos a nivel mundial con 9.2 ton•ha (FAO, 2011), cabe recalcar, que México pose excelentes rendimientos ya que ocupa el segundo lugar y se encuentra por encima de las 8 toneladas por ha como se muestra en el cuadro 2.

En cuando a producción de semilla de cilantro en específico los rendimientos van de 1.5 a 3.0 toneladas por ha (Diedrichsen, 1996).

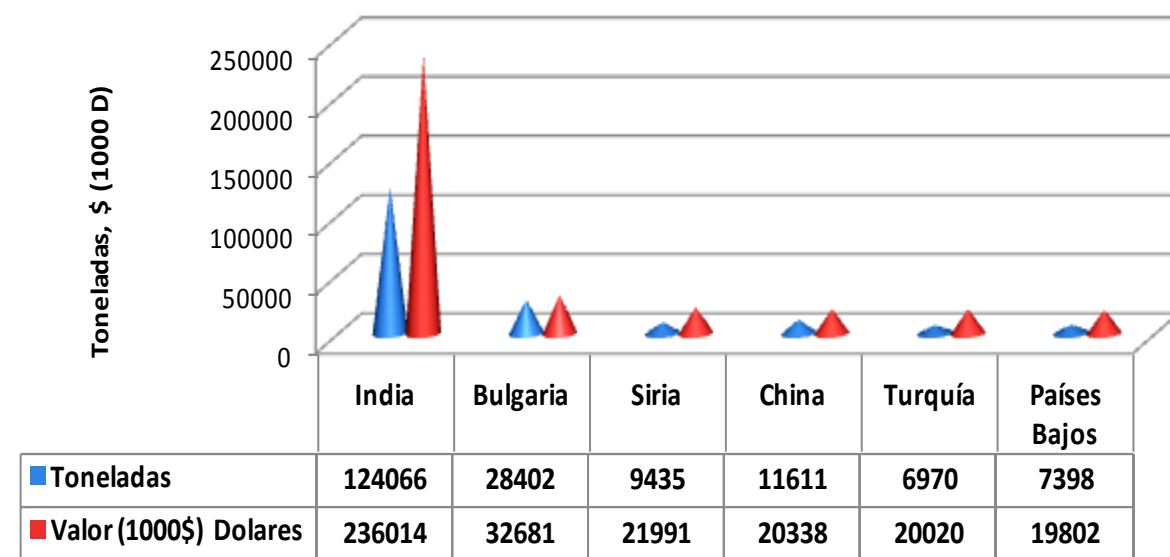


Figura 3. Principales países exportadores de Cilantro, hinojo y anís
Fuente: Elaborado con datos de 2008, FAO, 2011.

Cuadro 2. Países con mayores rendimientos a nivel mundial de cilantro, hinojo y anís.

Lugar	País	Ton•ha ⁻¹
1	Palestina	9.5281
2	México	8.5616
3	Perú	5.2664
4	Países Bajos	2.6569
5	Australia	2.0559
6	Líbano	1.8
7	Guatemala	1.5544
8	Serbia	1.4251

Fuente: Elaborado con datos de la FAO, 2011.

3.5. Panorama Nacional

Son 22 los estados productores de cilantro en México, que en conjunto generaron 45,873.8 toneladas de cilantro en fresco durante el 2010 (SIAP-SAGARPA, 2011),

quien más siembra es quien más cosecha; sin embargo, lo que determina la cantidad producida, es el rendimiento obtenido por ha.

Para el 2010 se sembraron, cerca de 5,426.3 ha en todo el país (SIAP-SAGARPA, 2011). Ocupando prácticamente la mitad de esa superficie el estado de Puebla, quien sembró en ese año 2,647.3 ha y produjo más de 22,500.0 toneladas de este producto, superando con mucho a Baja California Norte quien produjo 4,934.2 toneladas (Fig. 4), y es el segundo productor en volumen. Además de los anteriores, destacan; Sonora, Michoacán, Jalisco, Tlaxcala, Coahuila, y Aguascalientes que superan las 1000 toneladas anuales (SIAP-SAGARPA, 2011).

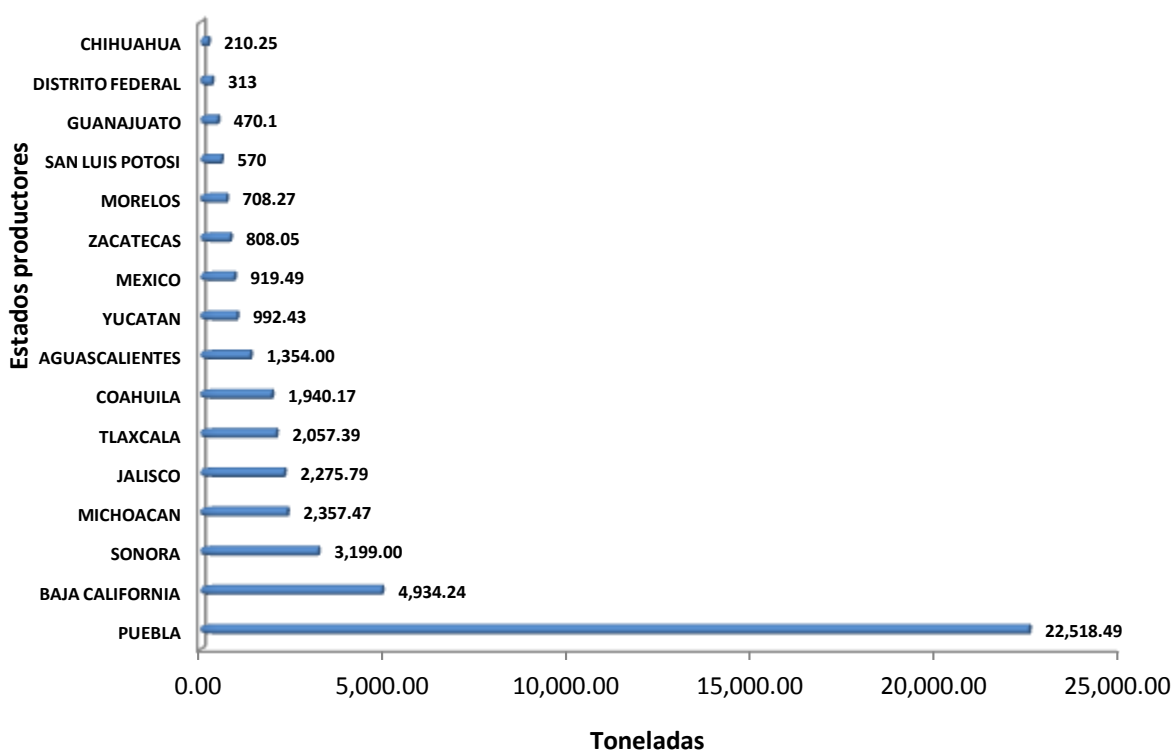


Figura 4. Principales estados productores de cilantro en fresco en México. *Fuente: Elaborado con datos de SIAP-SAGARPA, (2011)*

En el estado de Puebla son 44 los municipios productores de cilantro que en conjunto sembraron 2,647.32 ha para el 2010, y produjeron 22,518.4 toneladas de cilantro fresco en ese año; con rendimientos promedio de 8.6 toneladas por ha; el

principal municipio productor a nivel estatal es Atlixco que siembra 327.2 ha y produce 3,277.0 ton al año (Fig. 5), se guido por Tepeaca que produce 2,894.0 ton y Quecholac con 1,805.0 ton (SIAP-SAGARPA, 2011).

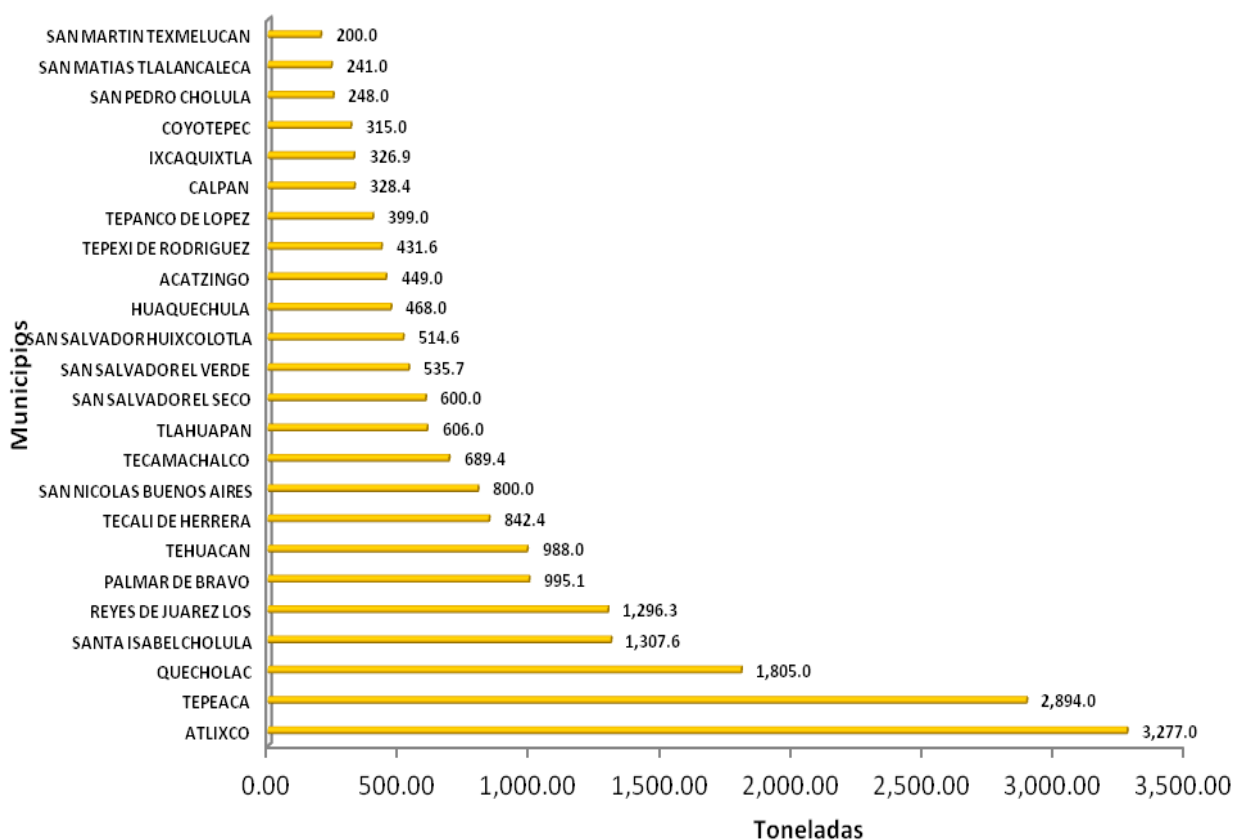


Figura 5. Principales municipios productores de cilantro en el Estado de Puebla.
Fuente: Elaboración propia con información del SIAP-SAGARPA, (2011).

Cabe que los principales productores poseen características climáticas parecidas (Fig. 6), así como los sistemas de producción implementados e incluso coinciden con los mismos mercados de venta. Por ejemplo: Cuapiaxtla de Madero, Tehuacán, Acatzingo, San Salvador Huixcolotla, San Martín Texmelucan, Palmar de Bravo, Tecamachalco, San \Salvador el seco, San Nicolás Buenos Aires, Los Reyes de Juárez, Quecholac, Atlixco y Tepeaca que son municipios vecinos.

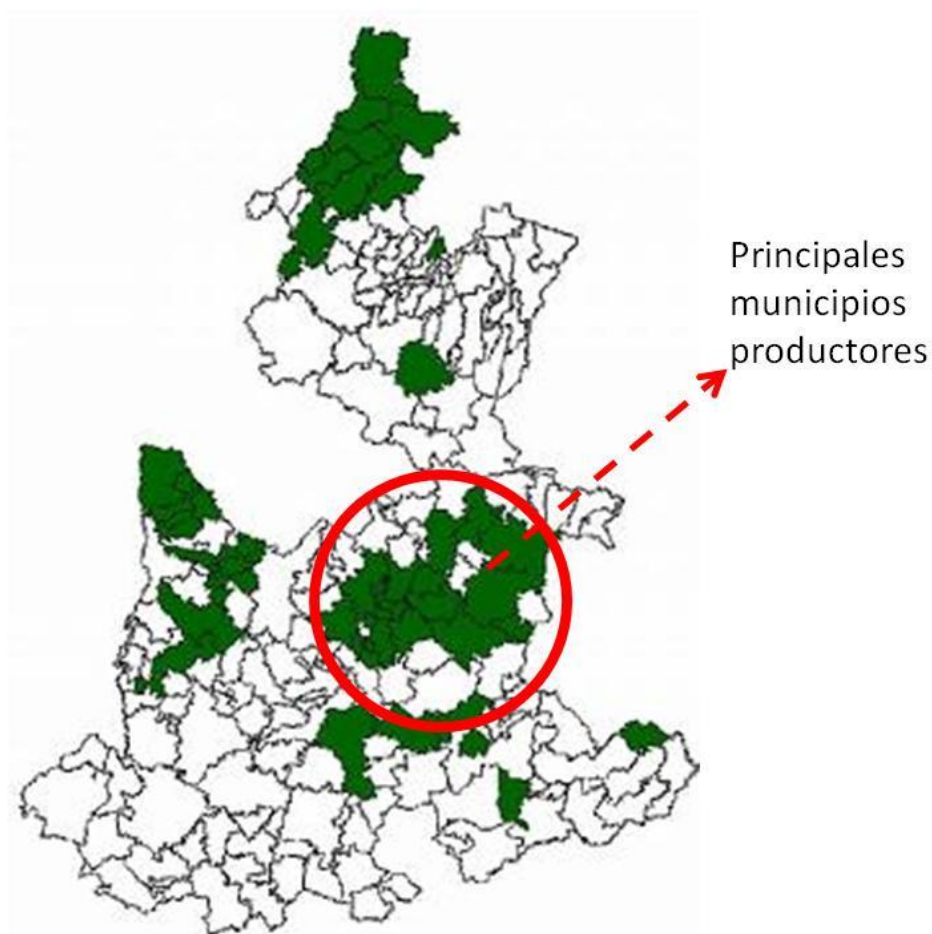


Figura 6. Municipios productores de cilantro en fresco en el Estado de Puebla
Fuente: Tomado de SDR de Puebla, 2011.

En cuanto al rendimiento de cilantro en fresco, SIAP-SAGARPA, (2011) mencionaron que el promedio nacional es de 8.6 ton•ha, muy cercano al reportado por la FAO (2011); pero el rendimiento varía en función de las características climáticas de la zona de producción, el sistema de producción, manejo, así como el control de plagas y enfermedades. En el estado de Puebla el rendimiento por ha es de 8.62 ton, mientras que el estado con mayor rendimiento a nivel nacional para el año 2010 fue Hidalgo con 15.7 ton casi el doble del promedio nacional.

3.6. Usos y composición

3.6.1. Composición

El uso de los frutos del cilantro está relacionado con la composición química. La composición general se presenta en el Cuadro 3. Los componentes más importantes

son el aceite esencial y los ácidos grasos. El contenido de aceite esencial es de 0.03 y 2.6% del peso y en cuanto a los ácidos grasos esta entre 9.9 y 27.7%. En follaje en fresco destaca su contenido de Vitamina A y B6 (Girenko, 1982; Diederichsen, 1996).

Cuadro 3. Composición química de la semilla de cilantro (Stoletova 1931; Diederichsen, 1996) y composición química en hojas frescas (FDA, 1995).

Componente	% semilla	Componente	% en 100g hojas
Agua	11.37	Agua	87
Proteína	11.49	Proteína	3.3
Grasa	19.15	Grasa	0.6
Fibra	28.43	Fibra	1.2
Almidón	10.53	Carbohidratos	6.5
Pentosa	10.29	Calcio	390 mg
Carbohidratos	1.92	Fosforo	60 mg
Contenido mineral	4.98	Hierro	20 mg
Aceite esencial	0.84	Vitamina A	10.3 UI
		Tiamina	60 mg
		Niacina	0.8 mg
		Vitamina B6	0.2 mg
		Acido ascórbico	200 mg

3.6.2. Usos

Los usos del cilantro se basan en las diferentes partes de la planta; los usos tradicionales de la planta, se dirigen a productos primarios, los frutos y el follaje en fresco, y van desde uso industrial, ecológico, medicinal, antibiótico y culinario. De manera particular se describen a continuación: 1) Industria; el aceite esencial y los ácidos grasos de los frutos son utilizados de manera separada o combinada. El extracto de aceite esencial es usado como saborizante en productos alimenticios así como en la manufactura de jabones. (Diederichsen, 1996). Los ácidos grasos obtenidos de los frutos se utilizan como lubricante en procesos técnicos (Luk'janov and Reznikov 1976; Diederichsen, 1996). 2) Uso ecológico; como planta melífera, ya que existe una gran cantidad de insectos que se alimentan del polen de sus flores, en el caso de las abejas, se estima que una hectárea de cilantro permite coleccionar

500 kilogramos de miel (Reznikov, 1976; Diederichsen, 1996). 3) Uso medicinal; las semillas ayudan a una mejor digestión y para la halitosis, también es usado para el tratamiento de las úlceras y el reumatismo. En la India los frutos son considerados; carmativos, diuréticos, tónico, estomacal, anti bilis y afrodisíaco. El aceite esencial es reconocido por sus efectos antibacteriales (Diederichsen, 1996). Remedia los espasmos en el estómago y contrarresta los efectos de la tensión nerviosa. Si se usa con demasiada libertad, las semillas pueden tener un efecto narcótico. Utilizado externamente, como cataplasma para tratar los dolores reumáticos. El aceite esencial de la semilla se utiliza en aromaterapia (Blade, 1998). 4) Antibiótico; Estudios realizados por investigadores de la Universidad Autónoma de Guadalajara y la Universidad de Berkeley descubrieron que el cilantro contiene un compuesto llamado 'dodecenal', que elimina a la salmonela y podría ayudar a la prevención de ciertas enfermedades, el 'dodecenal' es dos veces más potente que el antibiótico más común utilizado para la eliminación de la salmonela: la gentamicina. Además del dodecenal, los investigadores consiguieron aislar cerca de una docena de componentes antibióticos del cilantro fresco (El universal, 2005). 5) Uso Culinario de la semilla; la semilla se utiliza en la preparación de pescado y carne, pero solo para hornear. Hoy en día la mayoría del cilantro como especia se consume en polvo. En la preparación de las especias de decapado, los embutidos, los condimentos y saborizantes para pastelería, galletas, bollos y pasteles, y los productos del tabaco. El cilantro es usado también para preparar muchas bebidas alcohólicas (Diederichsen, 1996). 6) Uso culinario en fresco; se podría decir el único en México, se emplea en un sin número de platillos por ejemplo; los tacos, los caldos, las salsas, ensaladas, sopas, pozole, los moles de hoyo, y como adorno de los platillos, En China incluso se llega a consumir la raíz del cilantro, y es usada como vegetal; sin embargo, este uso es insignificante en el comercio mundial (Blade, 1998).

3.7. Variedades cultivadas

En USA se produce Long Standing, el cual alcanza 75 cm de alto al madurar, y prospera sobre los 15°C (FDA, 2011). También se siembran las variedades; Slo bolt, Leisure, Santos y Caribe, las cuales tienen cierta tolerancia a los calores y tienen una

alta calidad en follaje y rendimiento (Walters, 2007). Smith et al., (2011) menciona a Long Standing, Leisure, Santos y Terra. Schreiber.

En México, si hablamos de una clasificación general se encuentra: 1) Verde Puebla; con resistencia a floración precoz, adaptable, aromático, de color verde oscuro brillante, de hojas grandes y pueden hacerse hasta dos cortes sin alteración en el tamaño de las hojas. 2) Tipo Marruecos: Ciclo del cultivo de 70 a 80 días, las hojas usadas principalmente para condimentación debido a su olor, de color acre más o menos. 3) Europeo Mediterráneo: Ciclo del cultivo de 70 a 80 días, arbustivo, verde obscuro, altura de 30 a 40 cm, de larga duración. 4) Americano: Ciclo del cultivo de 80 a 90 días, verde en tono medio, altura de la planta, 60 cm. 5) Romaine: Hojas muy aromáticas y poco cerosas además de tener, la planta, un follaje verde claro (García, 2007). Si nos referimos a variedades en específico, una de ellas es la producida por la empresa Caloro seed, conocida con el nombre de “Pakistan”, los materiales que sobresalen según Gómez, (1997) son: a) Elsa 96, un material criollo con hojas cerosas, grandes y muy aromáticas, de un color verde oscuro, que se le utiliza para consumo nacional, b) Romaine, un material destinado a la exportación, las hojas son poco cerosas y aromáticas, tiene poca resistencia calor, y c) Marroquí, un material de exportación, las hojas son poco cerosas y aromáticas, de color verde claro. Silos y Martínez, (2003), por su parte mencionan la siembra de los materiales: Santo, Marín, Marroquí, Cilantro Poblano, San José García, Jal., Los Mochis, Querétaro, Slow Bolts, Río Verde, Tontoyuca, Criollo Ramos, Long Standing, Sun Master y Criollo Santos, en la Región de la Comarca Lagunera.

3.8. Requerimientos nutrimentales

Un análisis de los tejidos de una serie de parcelas de cilantro en Australia sugiere recomendaciones actuales de fertilizantes con macronutrientes para cilantro, así como tablas de referencia para la identificación de deficiencias (Cuadro 4). Por otro lado se encontró que la aplicación de micronutrientes en el cultivo, no tiene efectos en el rendimiento (Hooper and Dennis, 2002).

Cuadro 4. Promedio de los niveles de nutrientes en hojas y su rango de 17 parcelas de cilantro en 2000 y 2001.

Elemento	Promedio	Rango	Elemento	Promedio	Rango
N (%)	4.3	3.1 - 5.8	Zn	29.21	24 - 43
P (%)	0.47	0.27 - 0.72	Mn	40.29	22 - 51
K (%)	4.82	2.6 - 6.7	Fe	260.75	72 - 637
Mg (%)	0.32	0.18 - 0.45	B (mg/kg)	26.5	17 - 53
Ca (%)	1.06	0.68 - 1.8	Cu	9.22	4.0 - 18.0
Na (%)	0.31	0.14 - 0.57	S (mg/kg)	0.39	0.23 - 0.54
Cl (%)	1.15	0.57 - 1.9			

Fuente: Tomado de Hooper and Dennis, (2002).

3.9. Plagas y enfermedades reportadas en cilantro

3.9.1. Enfermedades del cilantro

3.9.1.1. Bacterias

El tizón bacteriano causado por *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*, provoca necrosis y reducción del número de frutos en las umbelas y manchas en las hojas, esta bacteria es sistémica y se transmite por semilla; incluso la polinización de los insectos puede ayudar a su diseminación. La bacteria persiste en el suelo y puede afectar a otras especies de plantas cultivadas o inclusive malezas. Para su prevención, se puede dar un tratamiento a la semilla antes de la siembra por 6 días a 65°C con calor seco (Diederichsen, 1996). En Australia esta enfermedad se considera la más importante ya que está ampliamente difundida y ocasiona pérdidas mayores al 50% y degrada severamente el valor de la semilla producida. La variedad Marroquí es muy susceptible a esta bacteria (Hooper and Dennis, 2002).

Al respecto en México se reportó, en el Municipio de Texcoco, estado de México, plantas afectadas con manchas foliares de forma regular y limitadas por la nervaduras, al inicio de color amarillo claro y conforme avanza su desarrollo se tornan negras y acuosas, finalmente necrosando el tejido. Se considera de tipo sistémico y llegó a matar a la planta. Se aisló el patógeno y se identificó como *Pseudomonas syringae* (Pérez, 1986).

La pudrición suave bacteriana, causada por *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*, ataca también apio y zanahoria. Los síntomas empiezan con el desarrollo de lesiones acuosas y suaves, que crecen con gran rapidez y destruyen los tejidos afectados. Se propaga por el agua de riego y las salpicaduras o bien por los implementos de labranza. Su crecimiento se favorece por altas temperaturas y humedad relativas alta (FDA, 1995).

Finalmente Lee and Liu, (2004). Mencionan en Taiwán a *Xanthomonas campestris* pv. *Coriandri*. Esta bacteria provoca tizón en las hojas, en el cual los primeros síntomas son pequeñas manchas en las hojas y tallos, el centro de las manchas se torna rápidamente a café, con un halo amarillento, y colapsa la parte afectada muriendo el tejido. En casos menos severos, puede provocar manchas cloróticas en forma de “V”.

3.9.1.2. Hongos

1) En raíz y cuello; A) *Fusarium oxysporum* que causa la marchitez del cilantro, el ataque de este hongo provoca daños en el sistema radicular y al follaje, al afectar el funcionamiento de las raíces, el follaje se torna amarillento y marchito. Si las plantas sobreviven al ataque suelen quedarse enanas. Los tejidos de la raíz y el cuello se oscurecen (Srivastava, 1972; Diederichsen, 1996). Este hongo prospera mejor en condiciones de altas temperaturas (FDA, 1995). Algunas investigaciones indican que este patógeno ataca específicamente a cilantro pero no infecta a otras plantas umbelíferas (Smith *et al.*, 2011). B) *F. solani*, provoca la pudrición y necrosis de la raíz del cilantro, este hongo se ve favorecido con la presencia de alta humedad relativa, suelo húmedo y días calurosos, incrementándose por tanto la severidad de la enfermedad en época de lluvia. (Barrales y García, 2004 y Castro, 2010). C) *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, y *F. graminearum*, son hongos que pueden causar daños al cultivo en el suelo (McVicar *et al.*, 2004; García, 2007). D) *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii* es mencionado por, Koike, (2005), Kenneth, (2008) y Singh, (2009) como forma especial del cilantro. E) *Rhizoctonia bataticola* y *R. spp*, provocan la pudrición de la raíz y las hojas en contacto con el suelo, las cuales desarrollan lesiones secas e irregulares, que llegan

a destruir todos los tejidos afectados, cuando la humedad es alta, se desarrolla un moho blanco o gris en los tejidos enfermos, el hongo se propaga fácilmente por el agua de riego o de lluvia o por salpique y por los implementos de labranza (FDA, 1995). F) *Phoma apiicola*, genera la pudrición de la raíz y la corona, la infección comienza a nivel de campo pero suelen presentarse los síntomas después de la cosecha, durante el almacenamiento. Las lesiones son de color verde-azul, pero rápidamente se tornan a negro. Los tejidos son destruidos por el hongo y la planta colapsa (FDA, 1995). G) *Pythium ultimum* provoca achaparramiento, y clorosis en la base de las hojas que eventualmente se marchita, el sistema radical y el cuello de las plantas presenta pudrición, en etapas avanzadas las hojas jóvenes y las plantas llegan a colapsar (Garibaldi *et al.*, 2010).

2) En follaje: A) *Alternaria petroselini* genera síntomas de tizón foliar en el cultivo (Castro, 2010). B) *A. radicina* Así mismo, causa tizón en la hojas, favoreciéndose el ataque, por alta humedad relativa, suelo húmedo y días calurosos, manifestándose con mayor severidad en la época lluviosa (Barrales y García, 2004). C) *Protomyces macrosporus*, genera las agallas del tallo (Das, 1971; Diederichsen, 1996 y FDA, 1995). D) *Erysiphe polygoni*, *E. umbelliferum* o *E. heraclei*, son causantes de la enfermedad conocida como cenicilla de la hoja, el síntoma típico es la aparición de manchas blancuzcas sobre la parte superior de las hojas, generalmente son atacadas primero las hojas más viejas, pasando luego a las más jóvenes, al tallo y al fruto, en la India se han reportado pérdidas de hasta 80% de la producción de semilla (FDA, 1995). E) *Sclerotinia* sp o moho blanco puede provocar la pudrición del tallo, dando lugar a tallos rotos y la pérdida de rendimiento (Blade, 1998). F) *Microdochium* sp provoca daños en el follaje, las plantas infectadas lucen gris claro, de forma irregular, con lesiones hundidas de hasta 1 cm de largo en los tallos superiores, umbelas y ramas distorsionadas o muertas por encima de los puntos donde las lesiones se unen, la enfermedad se produce inicialmente como focos dispersos, pero se extiende rápidamente (Hooper and Dennis, 2002). El hinojo, eneldo, anís, comino, zanahoria, comino y apio son especies cultivadas no susceptibles (Dennis, 2002). G) *Septaria* y *Sclerotinia*, ocasionan daños en el follaje

(Hooper and Dennis, 2002), además de la roya y manchas en las hojas (Diederichsen, 1996). H) *Glomerella cingulata* origina la antracnosis (FDA, 1995).

3) En flores: A) *Sclerotinia* sp o moho blanco puede originar deterioro de flor (Blade, 1998). B) *Aureobasidium* sp y *Ascochyta* sp causan la enfermedad que se conoce como el tizón o roya de la flor y puede ocasionar graves pérdidas. C) *Fusarium* spp, *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, provocan que las flores emergentes se vuelven marrones y negras y vayan muriendo a medida que emergen, esta enfermedad es más frecuente cuando persisten condiciones de humedad durante la floración (Blade, 1998).

4) En Fruto y semilla: A) *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp. y *Alternaria* spp, provocan la enfermedad del moho del grano es causada por. (Rajan et al., 1990; Diederichsen, 1996).

3.9.1.3. Virus

En Umbelíferas se ha reportado una gran cantidad de virus (cuadro 5), pero los mas mencionados son: *Carrot motley dwarf* (CMDV), *Carrot red leaf virus* (CRLV), el *Carrot thin leaf virus* (CTLV), *Carrot mottle virus* (CaMoV), *Celery mosaic virus* (CeMV), Watermelon mosaic virus (WMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV).

Cuadro 5. Virus reportados en umbelieras

Virus	Familia o genero	Transmisión	Fuente
<i>Carrot red leaf virus</i> (CRLV) (Fig. 7)	Poleroviridae	<i>Cavariella aegopodii</i>	a, b, c, d, e
<i>Carrot mottle virus</i> (CaMoV)	Umbraviridae	<i>Cavariella aegopodii</i> , <i>Semiaphis heraclei</i> , y Mecánicamente	a, b, c, d, e
<i>Carrot thin leaf virus</i> (CTLV)	Potyviridae	<i>Myzus persicae</i> <i>Cavariella aegopodii</i>	b, c, d, e
<i>Celery mosaic virus</i> (CeMV)	Potyvirus	<i>Aphis apigraveolens</i> , <i>A. apii</i> , <i>A. fabae</i> , <i>A. gpssypii</i> , <i>A. middletonii</i> , <i>Cavariella capreae</i> , <i>Myzus persicae</i> , y otras 13 especies. Mecánicamente	b, d, e

Virus	Familia o genero	Transmisión	Fuente
<i>Watermelon mosaic virus</i> (CMV)	Bromoviridae Cucumovirus	Mecánicamente, por semilla. <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphis craccivora</i> and <i>Myzus persicae</i> , y más de 60 especies.	b, c, d, e
<i>Celery Latent virus</i>	Potyviridae Potyvirus	Semilla	b, d, e
<i>Celery yellow spot virus</i>	Luteovirus	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	c, d, e
<i>Carrot Y virus</i>	Potyviridae	<i>Myzus persicae</i>	e
<i>Carrot mosaic virus</i>	Potyvirus	Afidos	a, c, e
<i>Carrot latent virus</i>	Rhabdovirus	<i>Semiaphis heraclei</i>	b, c
<i>Carrot yellow leaf virus</i>	Closteroviridae Closterovirus	<i>Semiaphis heraclei</i>	c, e
<i>Carrot temperate virus</i>	No clasificado	Semilla y polen	c
<i>Celery Strap Leaf Virus</i> (SLRV)	Nepovirus	<i>Xiphinema diversicaudatum</i> Mecánicamente Semilla e injerto.	d, e
<i>Celery yellow net virus</i>	No clasificado	Injerto, mecánicamente, vectores desconocidos.	d, e
<i>Celery yellow mosaic virus</i>	Potyvirus	Afidos	e
<i>Celery mosaic virus</i>	Potyvirus	Afidos	g
<i>Celery ring spot virus</i>	?	?	g
<i>Cilantro yellow blotch</i> (Fig. 8)	Closterovirus ?	<i>Hyadaphis coriandri</i> , y <i>H. foeniculi</i> , semilla	a, j
<i>Coriander feathery red vein</i>		Afidos	e
<i>Parsnip yellow fleck virus</i> (PYFV)	Sequiviridae Sequivirus	<i>Cavariella aegopodii</i> , <i>C. pastinacae</i>	b, e
<i>Parsnip mosaic virus</i>	Potyviridae Potyvirus	Pulgones	h, i
<i>Parsnip leaf curl virus</i>	No agrupado	Mecánicamente	e
<i>Parsley virus 5</i>	Potexvirus	Pulgones	b, e
<i>Parsley green mottle virus</i>	Potyvirus	Afidos	e
<i>Parsley latent virus</i>	?	?	b
<i>Alfalfa mosaic alfamovirus</i>	Bromoviridae Alfamovirus	<i>Myzus persicae</i> y 13 pulgones más	b, e, f
<i>Beet curly top virus</i>	Geminiviridae Curtovirus	<i>Circulifer tenellus</i> , <i>C. opacipennis</i>	e
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Tospovirus	<i>Frankliniella occidentalis</i>	d, e
<i>Arabis mosaic virus</i>	Comviridae Nepovirus	Semilla y nematodos	e
<i>Artichoke yellow ringspot virus</i>	Comviridae Nepovirus	Semilla	e
<i>Groundnut ring spot virus</i> (GRSV)	Nepovirus	Semilla	

Virus	Familia o genero	Transmisión	Fuente
<i>Caraway latent virus</i>	Comoviridae (?)Nepovirus	Mecánicamente	e
<i>Chicory yellow mottle virus</i>	Comoviridae Nepovirus	Mecánicamente Semilla	e
<i>Tomato Black Ring Virus</i>	Comoviridae Nepovirus	Semilla, polen y <i>Longidorus spp.</i>	d, e
<i>Broad bean wilt virus</i>	Fabavirus	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis craccivora</i>	c
<i>Arracacha virus A</i>	Comoviridae Nepovirus	Injerto	e
<i>Arracacha virus Y</i>	Potyviridae Potyvirus	Afidos	e
<i>Clover yellow vein virus</i>	Potyvirus	Afidos	h
<i>Apium virus Y</i>		Afidos	a
<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	Polerovirus	Afidos	l

Fuentes de las cuales se tomo información para elaborar el cuadro: (a) Smith, 1972, (b) Sutic et al., 1999, (c) Font et al., 1999, (d) Rubatzky, et al. 1999 y (e) Davis and Raid, 2002. (f) Alhubaishi et al. 1987, (g) Diederichsen, 1996, (h) FDA, 1995 (i) Murrant and Roberts, 1971, (j) Koike, (2006, (k) Ávila et al., 1990, (l) Casper, 1988.



Figura 7. Síntomas ocasionados por el *Carrot red leaf virus* (CRLV) derecha y sana izquierda. Tomada de Murrant, (1972).



Figura 8. Hoja de cilantro infectada que muestra manchas amarilla (lado izquierdo), hoja sana (lado derecho). *Tomada de Koike, (2006).*

3.9.1.4. Fitoplasmas

En cilantro, el amarillamiento del Aster (Aster yellow Fitoplasma), es una enfermedad transmitida por chicharritas. Las plantas infectadas se hacen evidentes en el momento de la floración, las flores se vuelven amarillas y frecuentemente crecen más que las de las plantas no infectadas. Las plantas no producen semillas (Manitoba, 2011).

El Amarillamiento del Aster es una enfermedad que ocurre en muchos cultivos, incluyendo a muchos otros miembros de la familia de la zanahoria. Las plantas infectadas pueden ser amarillentas y tener malformaciones en las partes florales. Las plantas infectadas son a menudo estériles y pueden ser más altas que las plantas sanas. Esta provoca la decoloración de los órganos reproductivos de la planta y la producción de semillas es severamente afectada (Blade, 1998).

El agente viriscente (BLTVA o Beet leafhopper-transmitted virescence agent) es otro de los fitoplasmas que puede atacar a cultivos de la familia Umbelliferae. Este es transmitido por la chicharrita *Circulifer tenellus*. Las hojas de plantas infectadas con este patógeno se tornan purpura rojizo, y las plantas florecen prematuramente. Los

órganos de las flores se deforman y los pétalos se tornan verdes (Rubatzky and Quiros, 1999).

3.9.2. Plagas del cilantro

3.9.2.1. Plagas en semilla

Un insecto específico que causa daños en cilantro es *Systole coriandri* (= *Systole albipennis*); la larva daña los frutos y sobrevive en el tallo, las semillas afectadas no pueden ser usadas para siembra (Diederichsen, 1996). En Etiopía causa grandes pérdidas en semilla, el control biológico se realiza por parásitos *Tetrastichus* spp. y *Liondontomerus* spp. (Jansen, 1981; Diederichsen, 1996).

El escarabajo galleta (*Stegobium paniceum*), ataca a la semilla, y se ha encontrado comúnmente en bancos de germoplasma (Diederichsen, 1996).

3.9.2.2. Plagas en follaje

Gusanos de la hoja (*Spodoptera exigua* H., *Spodoptera litura* F., *Spodoptera littoralis* B.) devoran grandes cantidades de follaje rápidamente, su control es relativamente fácil (FDA, 1995). Entre otros gusanos Smith et al., (2011), mencionó a *Trichoplusia ni* del cual la larva daña al cultivo al alimentarse de las hojas, y puede provocar la muerte de la planta o un retraso en el crecimiento. Un daño secundario es la presencia de cuerpos o excrementos en el producto final.

Los áfidos son responsables de pérdidas económicas considerables en la mayoría de los cultivos de umbelíferas. Las plantas son dañadas por su alimentación y la toxicidad de la saliva que puede provocar deformaciones foliares como la torsión de las hojas, acucharamiento y enrollamiento. Su alimentación, al igual que el de la mosca blanca, debilita la planta y también da lugar a la deposición de "melaza". Varias especies de áfidos son vectores de virus, y este aspecto del daño de áfidos a menudo excede las pérdidas causada por la alimentación de los áfidos y la colonización de las plantas. Las especies reportadas en umbelíferas son; *Myzus persicae*, *Myzus ornatus*, *Acyrothosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Cavariella aegopodii* y *C. pastinacae*, *Dysaphis apiifoli* y *D. foeniculus*, *Dysaphis*

crataegi, *Rhopalosiphum conii*, *Hyadaphis foeniculi*, *H. coriandi* y finalmente *Macrostoteles fascifrons* (Rubatsky and Quiros, 1999).

Cuando el cultivo es atacado por pulgones, los síntomas observados son, amarillamiento, desecamiento y muerte de tejidos, pudiendo llegar a la muerte de la planta en casos extremos, solo en aquellos casos donde las poblaciones sean altas no se recomienda su control, ya que el daño individual de un pulgón es muy pequeño. Los pulgones suelen ser más agresivos durante épocas secas al igual que los ácaros, prefieren las partes más tiernas del follaje (FDA, 1995). Existen diferentes autores que reportan la presencia de pulgones atacando al cultivo, por ejemplo, Urias, et. al., (1992), reportan *Caveriella aegopodi*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*, mientras que Blackman and Eastop, (2000), indicaron a *Aphis gossypii*, *Brachycaudis helichrysi*, *Hyadaphis coriandri*, *H. foeniculi*, *Myzus ornatus* y *Semiaphis heraclei*. Araujo; (1986); Diederichsen, (1996) solo menciona a *Myzus persicae* y *Hyadaphis coriandri* en cilantro. La FDA, (1995), alude a *Semiaphis* sp., *Hyadaphis* sp. y *Caveriella* sp.

Existen ácaros que pueden afectar al cultivo, como *Tetranychus telarius* L. que se alimenta normalmente de la superficie inferior de las hojas; ocasiona síntomas de amarillamiento, bronceado, y quemadura de las hojas (Fig. 9). El follaje puede lucir deformado y arrugado, en ocasiones se nota una telaraña. Los ácaros atacan con mayor intensidad en épocas secas y con temperaturas altas, prefiriendo los órganos más tiernos de la planta; se recomienda el control a base de dicofol, tetradion, dicarzol, dinocap, metamidofos y jabones insecticidas (FDA, 1995).

Las chicharritas afectan al cilantro al transmitirle el fitoplasma Aster yellows Phytoplasma (Manotoba, 2011). El daño a los cultivos es causado por la perforación de tejidos del tallo y hojas, matando a las células y transmitiendo enfermedades. Tal vez la plaga más importante es *Macrostoteles fascifrons*, que es el principal vector Aster yellows Phytoplasma. *M. divisus* y *Aphrodes bicinctus*, también son vectores de esta enfermedad. *Circulifer tenellus* es un vector de la remolacha que transmite el

Beet Leafhopper-Transmitted Virescence Agent (BLTVA) que infecta a la zanahoria (Rubatsky and Quiros, 1999).



Figura 9. Daño por ácaros

Los trips que se han reportado en cultivos de umbelíferas son *Frankliniella tritici*, *F. occidentalis* y *Thrips tabaci* (Rubatsky and Quiros, 1999); otras especies son *Thrips palmi* y *T. tabaci*, además de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (FDA, 1995).

3.9.2.3. Nematodos

Los nematodos reportados en cilantro son: *Meloidogyne incognita* (Midha y Trivedi, 1988) y *M. javanica* (Paruthi et al., 1987). Por su parte Smith et al., (2011) menciona *Trichodorus* sp. El CESAVEP, (2009), indicó la presencia de los géneros, *Dorylamus* sp, *Tylenchorrhynchus* sp, *Pratylenchus* sp, *Longidorus* sp, *Aphelenchus* sp. Estos nematodos son pequeños organismos que causan nodulos “jicamas” en las raíces y provocan obstrucción del agua y nutrientes a la planta, por consiguiente la detención del crecimiento, amarillamiento y en el caso de *Longidorus* sp se considera un vector de virus.

3.10. Malezas

El cilantro tiene baja capacidad de competencia con las malezas (FDA, 1995), debido a que las plántulas de cilantro crecen lentamente compitiendo pobremente con las

malezas durante el ciclo de cultivo, aunado a que el cultivo es sembrado densamente lo cual dificulta el uso de cultivadoras o el deshierbe mecánico (Smith et al., 2011).

Las malezas gramíneas anuales y malezas de hoja ancha anuales son las mas comunes en cilantro (Blade, 1998).

Las opciones actuales para los herbicidas de uso en cilantro son limitadas y generalmente no proporcionan un control de todas de las malas hierbas en los campos de producción; Como resultado, los productores hacen el control de malezas antes de la siembra, mediante la rotación de cultivos. El control manual de las malezas es generalmente necesario antes de la cosecha; por lo tanto, los costos de deshierbe pueden ser muy altos a menos que los programas de control de malezas sean bien planificados y ejecutados (Smith et al., 2011).

En trabajos experimentales probando diferentes herbicidas en el mercado, se encontró que Linuron, resulto ser efectivo en el control de malezas de hoja ancha y angosta y selectivo al cilantro, a una dosis de 0.75 kg. de i.a. por ha, en postemergencia. Así como atrazina con 1.8 kg. de ingrediente activo por ha, en postemergencia temprana por su selectividad al cultivo y el control de malezas de hoja ancha (Ruiz, 2006).

3.11. Daños por factores abióticos

3.11.1. Deficiencias o toxicidades nutrimental

Las deficiencias de nutrientes esenciales son el resultado de las cantidades inadecuadas de nutrientes en los factores del suelo o del medio ambiente que limitan la disponibilidad para la planta. La toxicidad de nutrientes se produce cuando los niveles excesivos son absorbidos por las plantas.

Rubasky and Quiros, (1999), describen los síntomas de deficiencia y en casos muy raros de toxicidad, como se observa a continuación:

Nitrógeno: La deficiencia de nitrógeno causa lento y restringido crecimiento de los cultivos, raíces y tallos son pequeños, delgados, erguidos y duros, y la madurez se retrasa. Las hojas son más pequeñas de lo normal, son pálidas, y cuando la

deficiencia es muy fuerte presentan una pérdida del color verde. Las hojas inferiores son las primeras afectadas. Las hojas más viejas pueden desarrollar un tinte rojo marginal, y algunas veces de color blanco amarillento. El exceso de nitrógeno tiende a favorecer el crecimiento y un follaje succulento. Alto contenido de nitrógeno de amonio, especialmente en las proximidades de las raíces, pueden causar lesiones.

Fosforo: La deficiencia da lugar a retraso en el crecimiento, tallos delgados, cortos y retraso de la madurez. Las hojas de algunas umbelíferas dan coloración violácea, ocurriendo primero generalmente en la parte inferior. Los tallos y los pecíolos también desarrollan color purpura. La deficiencia es más frecuente en suelos ácidos, fríos y húmedos. La toxicidad se observa rara vez.

Potasio: La deficiencia resulta en una reducción del rendimiento y por lo general follaje moteado. Las hojas más viejas desarrollan colores grises cerca de los márgenes y áreas cloróticas a lo largo. Algunas plantas desarrollan color verde brillante con manchas necróticas marginales y entre las venas. Los tallos débiles y sistema radicular escaso. El exceso de potasio aumenta la salinidad del suelo y por tanto las plantas lucen marchitas.

Calcio: La deficiencia restringe el crecimiento, y causa la muerte de hojas, pecíolos y del crecimiento apical, por tanto se suprime la extensión del tallo. En ocasiones se presenta la muerte del punto de crecimiento y los tejidos adyacentes presentan el corazón necrosado. El crecimiento de las raíces se ve restringido y mueren las puntas. Es raro ver toxicidad de este elemento.

Magnesio: La deficiencia se presenta entre las venas de las hojas, teniendo una clorosis, comenzando en los márgenes. Los bordes de las hojas pueden adquirir un tono rojizo. Los síntomas en las hojas jóvenes se parecen a la deficiencia de nitrógeno. Es raro ver toxicidad de este elemento.

Manganeso: La deficiencia comienza en las hojas jóvenes presentando áreas con moteados amarillos. Las plantas presentan falta de vigor y son de color verde

amarillento pálido. Las hojas más viejas presentan clorosis intervenal. Es raro ver toxicidad de este elemento.

Boro: La deficiencia provoca que las plantas jóvenes reduzcan considerablemente el crecimiento o mueran. La muerte del crecimiento apical es un síntoma común de deficiencia. Las hojas más viejas son cloróticas y deformes. Los tallos son cortos, duros y las hojas se distorsionan. Las hojas jóvenes presentan grietas laterales a través de los pecíolos. Los brotes axilares se inician, pero no se desarrollan, porque el tejido apical muere. Las hojas viejas son de color pálido y algunas veces los márgenes rojos. Alrededor de la raíz se produce coloraciones café claro, las cuales se producen alrededor de la raíz en el xilema. La toxicidad se observa rara vez.

Azufre: Los síntomas de deficiencia son similares a los de nitrógeno. Además se reduce el crecimiento y los tallos son débiles. La toxicidad se observa rara vez.

Hierro: La deficiencia aparece como áreas de color amarillo o distintas áreas blancas entre las venas de las hojas más jóvenes. La toxicidad se observa rara vez.

Zinc: Los primeros síntomas de deficiencia aparecen al observarse una coloración amarilla entre las venas de las hojas más jóvenes, seguido por el crecimiento de brotes reducidos. La toxicidad se observa rara vez.

Molibdeno: La deficiencia causa palidez, distorsión, y hojas muy delgadas, con amarillamiento intervenal. La toxicidad se observa rara vez.

Cobre: La deficiencia se manifiesta en las hojas jóvenes con un color verde oscuro y con poco desarrollo. Las hojas más viejas parecen marchitas y comúnmente amarillentas. La toxicidad se observa rara vez.

Cloro: Es poco frecuente esta deficiencia, pero se expresa como retraso del crecimiento radicular, bronceado de las hojas, hojas marchitas, cloróticas y necróticas en ocasiones. La toxicidad se observa rara vez.

3.11.2. Salinidad

Los síntomas de un exceso de sales en el suelo incluyen, disminución de la germinación, pérdida de postura, crecimiento pobre, Desuniformidad en el desarrollo de raíces primarias. En algunos cultivos el exceso de sales provoca necrosis marginal de las hojas (Davis and Raid, 2002).

3.12. Transmisión de agentes patogénicos por insectos

3.12.1. Transmisión de virus por insectos

El método de transmisión de virus más común y económicamente más importante en el campo es a través de insectos vectores. Los principales insectos vectores se encuentran dentro de los órdenes coleóptera, Thysanoptera, hemíptera, ortóptera y homóptera, este último incluye pulgones. (Familia aphididae), chicharritas (Familia cicadellidae); moscas blancas (familia Aleurodidae). Otras familias de insectos que transmiten virus pero con menor importancia son los piojos harinosos, el de las escamas (familia Coccoideae) y el de los periquitos (familia menbracidae), otros son las chinches verdaderas, las cuales tienen partes bucales perforadoras y succionadoras, los restantes grupos de insectos tienen partes bucales masticadoras y la transmisión de virus es mucho menos común. Por lo menos 10 virus que infectan a las plantas son transmitidos por chicharritas, incluyendo virus de ARN de doble cadena, los virus baciliformes y los pequeños virus isométricos; estos virus producen alteraciones en las plantas en la región del floema. Todos son circulativos, se sabe que varios de ellos se propagan en el vector (virus propagativos) y que algunos persisten a través de la muda y son transmitidos en grado variables a través de la etapa de huevecillo del vector se puede transmitirlo por primera vez (Moreno y Jaramillo, 2004).

Los trips transmiten virus del genero *Tospovirus*, pero apenas el 0,15% de las especies de Thysanoptera (9 de 5500) se sabe que son vectores. Además, estas especies no están estrechamente relacionadas entre sí, lo que sugiere que muchas especies de trips han perdido una asociación con tospovirus o que cada especie de Tospovirus ha evolucionado en una relación independiente con una especie de trips

en específico, los géneros que contienen a las especies vectores son *Frankliniella*, *Thrips*, y *Scirtothrips* (Mound, 2001), como se observa en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Vectores de *Tospovirus*, Mound, (2001).

Genero <i>Thripinae</i>	Especies descritas	Vectores reportados
<i>Frankliniella</i>	160 especies	5 especies
<i>Thrips</i>	280 especies	3 especies
<i>Scirtothrips</i>	90 especies	1 especie

3.12.2. Transmisión de fitoplasmas por insectos

A la fecha se conoce que todos los vectores de fitoplasmas son insectos y, se encuentran dentro del orden Homóptera, siendo los principales vectores los cicadélidos que pertenecen al suborden Auchenorrhyncha (Acosta, 2002).

Existen muy pocos trabajos en relación a cilantro, sin embargo, para la familia umbelíferae, Rubatzky, et al. (1999), señala que los insectos *Macrostelus fascifrons* y *Aphrodes bicinctus* son capaces de transmitir Aster yellows Phytoplasma, un fitoplasma que afecta a un amplio rango de plantas incluyendo la zanahoria, el apio y otra gran cantidad de umbelíferas, y que por otro lado *Circulifer tenellus* es capaz de transmitir el Beet leafhopper-transmitted virescence agent (BLTVA) que es otro fitoplasma que ataca a las umbelíferas.

3.12.3. Transmisión de bacterias vasculares por insectos

De igual manera no existen trabajos en específico sobre bacterias vasculares en cilantro; sin embargo, en su pariente cercano la zanahoria se han demostrado últimamente que existe una asociación entre el "Candidatus *Liberibacter solanacearum*" y el psilido de la zanahoria, y el primer informe indica que el desorden en las zanahorias descrito anteriormente podrían estar asociado con una bacteria (Munyanza et al., 2010). Por otro lado se ha logrado probar bajo condiciones controladas que *B. cockerelli* puede transmitir "Ca. *L. solanacearum* " a zanahoria, pero a un ritmo relativamente pequeño. Es interesante que *B. cockerelli* y *Trioza*

apicalis, dos especies de psílidos geográficamente distantes de las plantas hospedantes diferentes, pueden albergar la misma especie de *Liberibacter* (Munyanza, 2010).

IV. METODOLOGIA GENERAL

Para determinar la etiología de la enfermedad, se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Colecta de muestras (suelo, semilla, insectos y plantas enfermas), entrevista a productores.
- 2.- Prueba de transmisión mecánica
- 3.- Influencia de Macronutrientes y herbicida (Linuron)
- 4.- Transmisión por suelo y semilla

Los pasos 1, 3 y 4 se especifican en el Capítulo 1, mientras que el paso 2 en el capítulo 3.

- 5.- Determinación de insectos vectores presentes (Capítulo 2)
- 6.- Determinación de patógenos vasculares involucrados (Capítulo 3)
- 7.- Determinación de hongos asociados (Capítulo 4)

Capítulo I. Descripción del problema, su posible transmisión por semilla y/o suelo, y su relación con otros agentes no bióticos.



Aproximadamente el

34% de los virus que atacan a Umbelíferas se transmiten por semilla (ICTV, 2011)

CAPITULO 1. Descripción del problema, su posible transmisión por semilla y/o suelo, y su relación con otros agentes no bióticos.

I. INTRODUCCIÓN

Las síntomas del “amarillamiento o fuego” del cilantro, son: achaparramiento de la planta, clorosis de las hojas con diferentes variantes (mosaico, moteado, coloraciones que van desde amarillo, rojo a purpura, manchas cloróticas), deformación de las hojas, clorosis y necrosis de nervaduras. Los cuales sugieren a la vez muchas causas, que van desde deficiencias nutrimentales, daños por hongos, nematodos, bacterias, ó bien patógenos presentes en haces vasculares como virus, bacterias de floema ó Fitoplasmas; esto, debido a que en la practica el cilantro es una planta muy endeble, y con cualquiera los factores mencionados generaría síntomas hasta cierto punto parecidos a los descritos por los productores.

No existe ningún reporte de la etiología de la enfermedad a la fecha; sin embargo, al realizar una prueba de transmisión mecánica sobre plantas diferenciales (ver capítulo 3) de una muestra con los síntomas del “amarillamiento o fuego”, esta resulto negativa, esta prueba sirvió de base para plantear los ensayos y metodología a seguir en la búsqueda del agente causal, ya que se tiene que determinar como primer paso cuales son los medios de transmisión del o los agentes causales de la enfermedad, es decir, ¿se transmite por semilla, suelo, vectores? o bien, se trata de factores abióticos como la fertilización o el herbicida más utilizado (Linuron); en el cultivo y de esta forma descartar de manera ordenada a los diferentes factores y patógenos de los que se sospecha. En base a esto se establecieron los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

- ⇒ Tener un primer acercamiento al problema, según la perspectiva de los productores, para generar hipótesis del posible agente(s) causal(es),
- ⇒ Determinar si el o los agentes causales, se transmiten por semilla o se encuentra(n) en el suelo, para determinar el origen de la enfermedad y descartar la participación de patógenos del suelo (nematodos y hongos),
- ⇒ Hacer pruebas de deficiencia nutrimentales con los macronutrientes N, P, K., para descartar la fertilización como causante de la enfermedad,
- ⇒ Determinar si el problema se asocia con daños por fitotoxicidad por Linuron, para descartar el herbicida como causante del problema.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fase de campo

3.1.1. Entrevista a productores

Para tener un punto de partida se formularon algunas preguntas que fueron hechas de manera indirecta a los productores (Anexo I) en base a estas se destermino cuáles podrían ser los patógenos involucrados a nivel de grupo (hongos, bacterias, virus, etc.).

Además se efectuo un análisis de la condiciones ambientales prevalecientes en los municipios con presencia del “amarillamiento o fuego”, en base a las normales climatológicas reportadas por el SMN, (2011), para determinar los rangos en los cuales se presenta la enfermedad.

3.1.2. Colecta de muestras

Para la colecta de material, se realizaron cuatro recorridos con las siguientes rutas: 1) Quecholac, Tehuacán y San Salvador el seco, 2) Quecholac y Palmar de Bravo 3) Atlixco, y 4) San Martín Texmelucan y San Matías Tlalancaleca. Y se colecto, semilla, suelo, insectos y plantas enfermas.

3.1.2.1. Semilla y suelo

Se colectó semilla en 7 municipios: San Matías Tlalancaleca, San Martín Texmelucan, Quecholac, Palmar de Bravo, San Salvador el seco, Atlixco y Tehuacán. La semilla colectada, fue adquirida mediante el apoyo de productores de parcelas donde se encontraba presente la enfermedad y mediante la compra en casas semilleras de la región.

En cuanto al suelo, se trabajó con suelo de tres municipios Tehuacán, San Salvador el seco y San Martín Texmelucan. Se tomaron dos estratos, 500 gramos de los primeros 15cm y 500 gramos más, de los 15 a los 30 cm. En total se tomaron 10 submuestras de 1000 gramos para completar cerca de 10 kg. La colecta de suelo se realizó en zigzag a lo largo del terreno. Las muestras de suelo se tomaron del suelo circundante a las plantas con síntomas de la enfermedad.

3.1.2.2. Plantas enfermas

La colecta de plantas enfermas se realizó en 6 municipios; San Matías Tlalancaleca, San Martín Texmelucan, Quecholac, Palmar de Bravo, San Salvador el seco, y Tehuacán. Para lo cual se realizó un muestreo dirigido sobre plantas con síntomas, las cuales se colocaron en bolsas de plástico en una hielera y se transportaron al laboratorio donde se conservaron en el refrigerador, manteniéndolas a 4°C, hasta su proceso.

3.1.2.3. Insectos

Para colectar los insectos, se utilizó una red entomológica, se tomando 30 redadas por cada 15 metros lineales, con un recorrido en zigzag a través del terreno, los insectos se depositaron en un frasco con alcohol al 70%. Además se hizo muestreo dirigido a plantas con síntomas, de las cuales se colectaron los insectos presentes en follaje y raíz, colectándolos de 24 plantas (matas).

Se realizaron colectas en 6 municipios; San Matías Tlalancaleca, San Martín Texmelucan, Quecholac, Palmar de Bravo, Zacatec y Tehuacán.

3.1.3. Evaluación de la distribución e incidencia de la enfermedad

Para evaluar la incidencia de la enfermedad, se contaron una a una, plantas que presentaran los síntomas del “Amarillamiento o Fuego del Cilantro” y se anotaron las plantas enfermas por surco. Para el dato la incidencia, se efectuó la suma de las plantas con síntomas y se calculó la densidad de población del cilantro. La determinación cuantitativa solo se realizó en el municipio de San Martín Texmelucan, debido a que no era tan alta como en otros municipios. Esta se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia} = (\text{plantas enfermas} / \text{total de la población}) \times 100$$

La distribución espacial de la enfermedad se pudo determinar en todos los municipios, anotando la forma en la que las plantas enfermas se distribuían en el terreno.

3.2. Fase de laboratorio

3.2.1. Lugar de trabajo

Se trabajó conjuntamente en el Laboratorio e Invernadero de Virología Agrícola, del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.2. Prueba de germinación

Este ensayo tuvo como propósito determinar el % de plantas que no germinan por malas características de la semilla o bien por bajo vigor.

Se desinfectó la semilla con hipoclorito de sodio al 3% durante 1min, posteriormente se enjuagó dos veces en agua destilada estéril durante 1minuto cada una y se secó en papel sanitario.

Posteriormente se colocaron en papel sanitario 100 semillas de cada variedad en hileras y se humedecieron diariamente, se realizaron evaluaciones desde los 10 a los 24 días después de la inducción de la germinación. Se utilizaron las variedades; American pasific, Líder, Sun master, Pakistán, Long Standing, Criollo, y Canadiense.

3.2.3. Ensayo de transmisión por semilla y patógenos presentes en el suelo

Este ensayo trató de suponer las características en las que se lleva la producción en campo, debido a que bajo esas condiciones son bajo las cuales se desarrolla la enfermedad, pero se controlaron los factores del suelo, las variedades usadas, plagas y nutrición.

Se utilizó suelo estéril y no estéril, el primero se esterilizó durante 2 horas a 150 °C y 15 PSI, y posteriormente se puso a secar durante 2 días. Los recipientes utilizados fueron vasos de poli estireno expandido (inícel) de 0.5 litros. Se colocaron 300 gramos de suelo en cada vaso, se humedecieron y se sembraron 50 semillas de cada variedad en cada vaso.

Las variedades utilizadas para este ensayo, fueron, American pasific (v1), Pakistán 1 (v2), Canadiense (v3), Líder (v4), Sun master (v5), Pakistán 2 (v6), y Long standing (v7). El suelo utilizado fue el de los municipios de Tehuacán y San Salvador el Seco. La siembra se llevó a cabo el día 28 de Julio del 2010 y se manejó el experimento hasta el 18 de septiembre del mismo año, cuando el cultivo tenía 52 días de establecido. Se utilizó un modelo de parcelas divididas (Cuadro 7); con 2 repeticiones, teniendo un total de 63 tratamientos. No se tuvo testigo porque no se sabía si las variedades estaban libres de cualquier patógeno en semilla, sin embargo, el testigo para cada variedad fue los tratamientos con suelo estéril y fertilizado (T57 al T63), ya que se utilizó un suelo no problema (suelo usado en el invernadero de Virología Agrícola).

No se efectuó análisis estadístico ya que el objetivo no fue evaluar ninguna variable cuantitativa, sino más bien cualitativa, como la presencia de síntomas por la posible incidencia de patógenos proveniente de semilla o bien presentes en el suelo. Así como determinar visualmente, los síntomas de las deficiencias nutrimentales de los tres principales elementos N, P, K.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en el ensayo de transmisión por semilla y patógenos presentes en suelo

Tehuacán		Tehuacán		San salvador el seco		San salvador el seco		Suelo del invernadero
Suelo estéril		Suelo no estéril		Suelo estéril		Suelo no estéril		Estéril
Fertilizado	No fertilizado	Fertilizado	No fertilizado	Fertilizado	No fertilizado	Fertilizado	No fertilizado	Fertilizado
V6 (T1)	V7 (T14)	V3 (T15)	V1 (28)	V6 (29)	V2 (42)	V5 (T43)	V4 (T56)	V7 (T57)
V3 (T2)	V1 (T13)	V6 (T16)	V5 (27)	V2 (30)	V1 (41)	V7 (44)	V3 (T55)	V1 (T58)
V2 (T3)	V5 (T12)	V2 (T17)	V6 (26)	V7 (31)	V5 (40)	V1 (45)	V6 (T54)	V4 (T59)
V7 (T4)	V3 (T11)	V7 (T18)	V3 (25)	V4 (32)	V7 (39)	V6 (46)	V5 (T53)	V2 (T60)
V4 T5	V2 (T10)	V1 (T19)	V4 (24)	V5 (33)	V3 (38)	V4 (47)	V1 (T52)	V5 (T61)
V5 T6	V4 (T9)	V4 (T20)	V7 (T23)	V1 (34)	V6 (37)	V3 (48)	V7 (T51)	V3 (T62)
V1 T7	V6 (T8)	V5 (T21)	V2 (T22)	V3 (35)	V4 (36)	V2 (49)	V2 (T50)	V6 (T63)

La fertilización se realizo de igual manera en que la realizan los productores en campo. Se uso la formula general 210-35-35, N-P-K respectivamente.

3.2.4. Ensayos de fitotoxicidad con Linuron

Debido a que en toda la región visitada el Linuron es el herbicida más utilizado, se decidió hacer un experimento con dosis altas para determinar si los síntomas pudiesen deberse al uso excesivo de este producto.

Por lo anterior, se sembraron 7 variedades; A. pasific (v1), Pakistán 1 (v2), Canadiense (v3), Líder (v4), Sun master (v5), Long standing (v6), y Criollo. Se les aplicaron las dosis recomendadas para el producto, usado una dosis baja y una alta, en dos momentos pre y post emergencia al cultivo (Cuadro 8). El suelo utilizado fue el de San Salvador el seco. Se utilizo una aspersora manual de 1 L de capacidad, la cual se calibro, para aplicar un volumen de 400 litros por hectárea, con 1.5 y 3 kg del producto Linuron. El diseño experimental fue completamente al azar, con 16 tratamientos para cada ensayo, dos repeticiones y un testigo con agua sola.

Cuadro 8. Tratamientos establecidos, para los ensayos de Linuron.

Variedad	Pre emergencia		Post emergencia		Testigo
	Dosis alta 2 kg/ ha	Dosis baja 1.5 kg/ ha	Dosis alta 3 kg/ ha	Dosis baja 1.5 kg/ ha	
V1	5g/l (T6)	3.7g/l (T12)	7.5g/l (T1)	3.7g/l (T13)	0g/l (T15)
V2	5g/l (T7)	3.7g/l (T7)	7.5g/l (T6)	3.7g/l (T9)	0g/l (T18)
V3	5g/l (T5)	3.7g/l (T10)	7.5g/l (T4)	3.7g/l (T8)	0g/l (T21)
V4	5g/l (T3)	3.7g/l (T11)	7.5g/l (T7)	3.7g/l (T10)	0g/l (T19)
V5	5g/l (T2)	3.7g/l (T14)	7.5g/l (T2)	3.7g/l (T14)	0g/l (T17)
V6	5g/l (T4)	3.7g/l (T13)	7.5g/l (T3)	3.7g/l (T11)	0g/l (T20)
Criollo	5g/l (T1)	3.7g/l (T9)	7.5g/l (T5)	3.7g/l (T12)	0g/l (T16)

Para estos ensayos tampoco se requirió hacer análisis estadístico, ya que la variable a evaluar fue de tipo cualitativo y se evaluaron los síntomas por fitotoxicidad del herbicida. Se hicieron observaciones desde los 5 hasta los 20 días después de la aplicación.

IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de campo

4.1.1. Entrevista a productores

Esta actividad arrojó la siguiente información:

1) Variedades sembradas

1.1) Las variedades más usadas por los productores son: Canadiense, Sun Master, Líder, Pakistán, Long Standing, American Pasific y algunos criollos, aunque estos últimos están perdiendo terreno frente a las variedades comerciales, debido a que son más precoces a floración, son susceptibles a plagas y enfermedades y poseen hojas más pequeñas,

1.2) La mayoría de los productores compra la semilla en las tiendas de agroquímicos y aquellos que aun siembran criollos, es porque los producen ellos mismos o bien los compran en los mercados de los fines de semana,

1.3) El ciclo del cultivo varia, desde los 75 a los 85 días después de la siembra,

1.4) La cantidad de semilla sembrada varia de 20 a 35kg•ha.

2) Época de siembra y condiciones ambientales

2.1) El cilantro se siembra todo el año.

2.2) Hay rotación de cultivos con Brassicaceas (Brócoli, col, coliflor, rabanito), lechuga, cebollín, etc.

2.3) Se efectuó un análisis de las condiciones ambientales prevalecientes en los municipios con problemas reportados por el CESAVER, (2009), en base a las normales climatológicas del SMN, (2011), encontrando que son parecidas (fig. 10, 11, y 12).

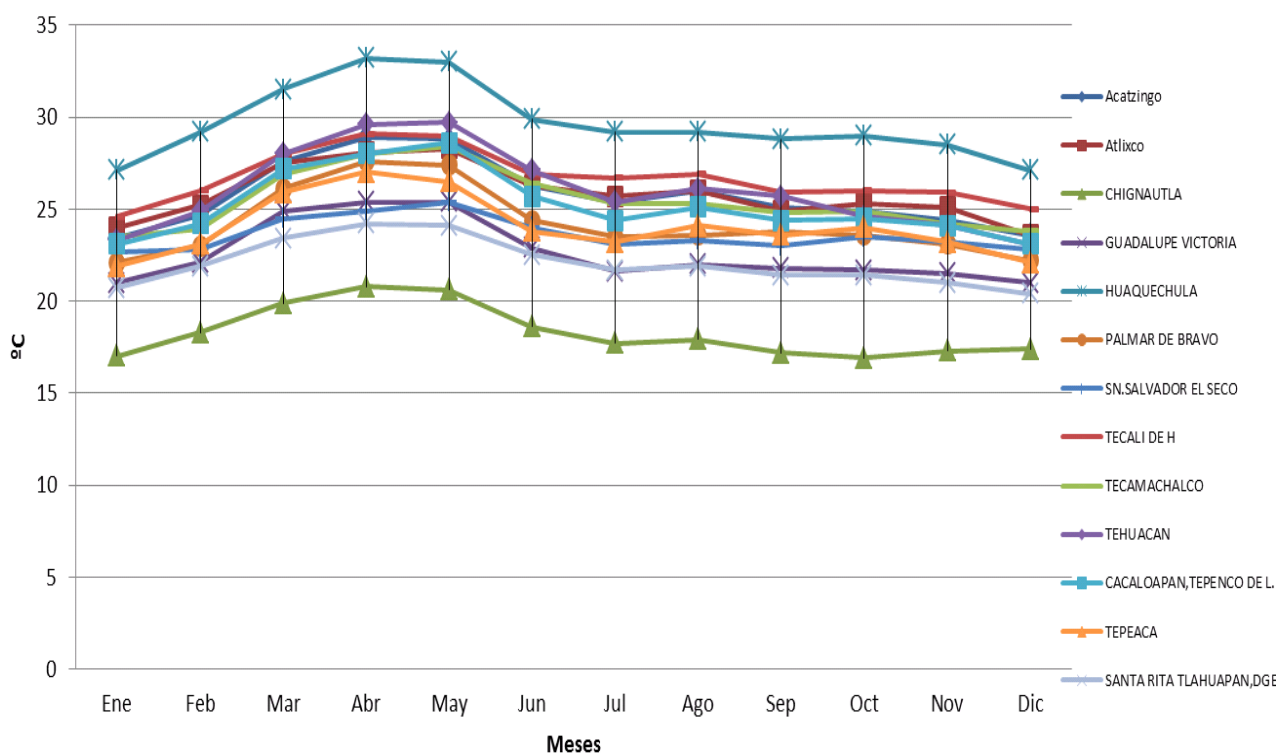


Figura 10. Temperatura máxima. Fuente: elaboración con datos del SMN, 2011.

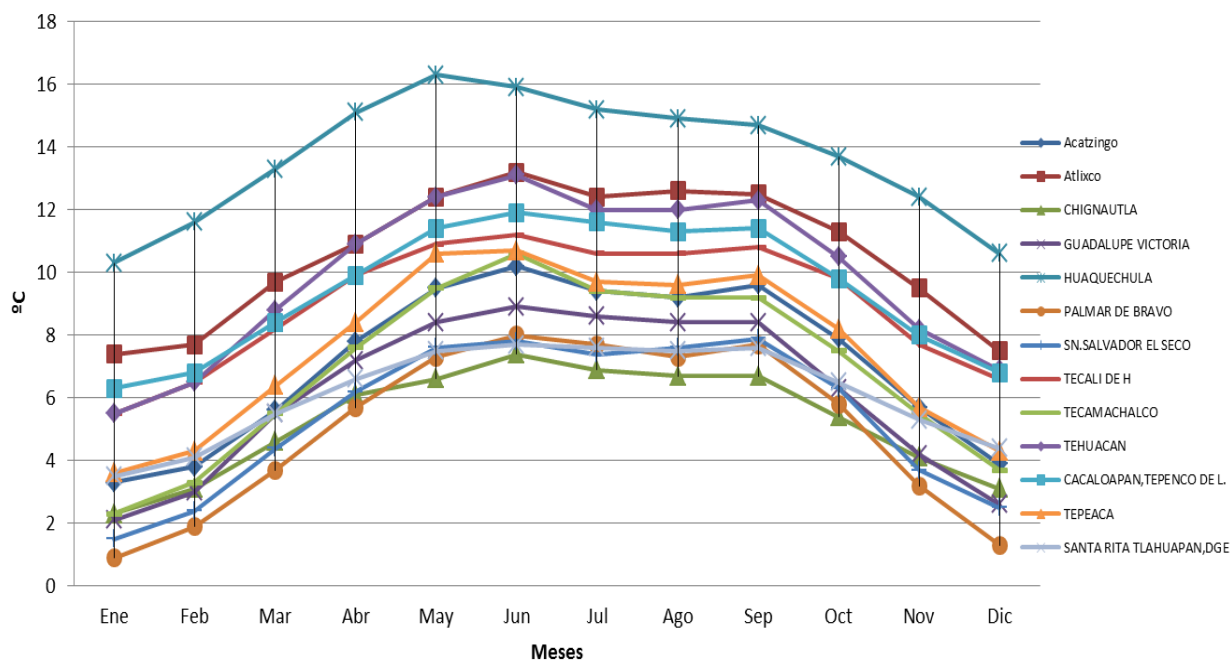


Figura 11. Temperatura mínima. *Fuente: elaboración con datos del SMN, 2011.*

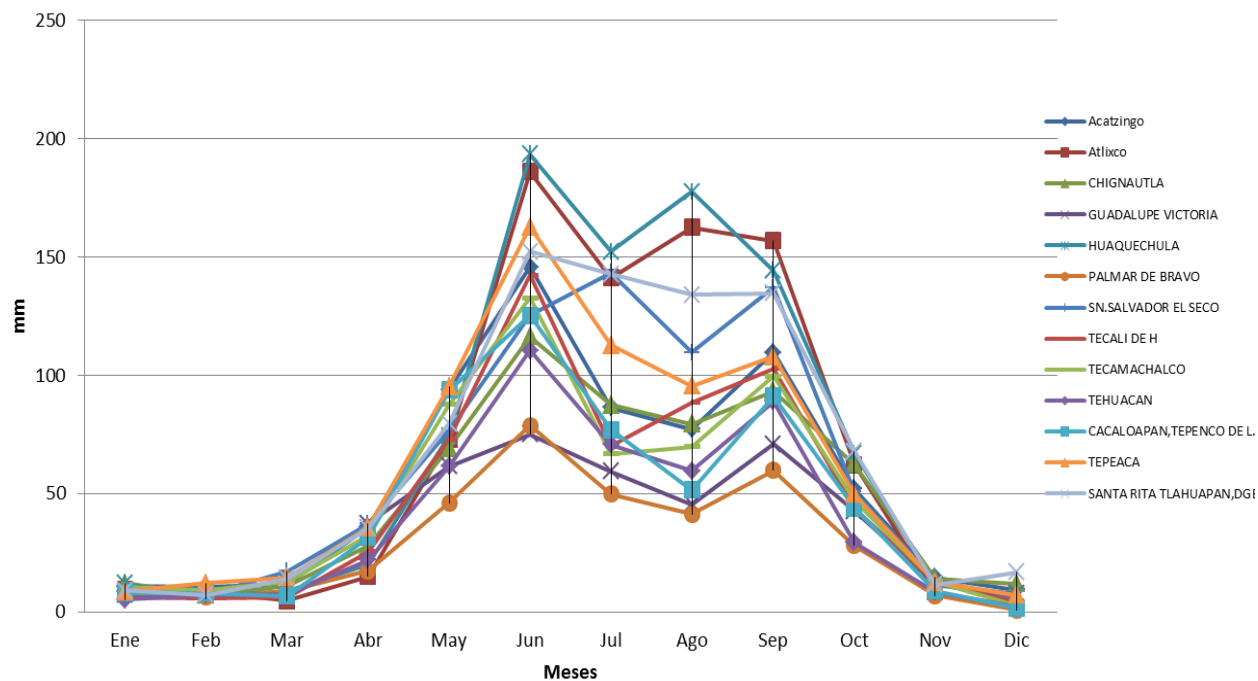


Figura 12. Precipitación. *Fuente: elaboración con datos del SMN, 2011.*

Los rangos encontrados en cuanto a las condiciones ambientales se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Promedio y rangos de condiciones ambientales prevalecientes en los municipios afectados.

Factores	Min	Max
Temperatura	5	29.6
Media de temperatura	11.8	21.7
Precipitación	352	875.1
Altura sobre el nivel del mar	1,190.0 MSNM	2,790.0 MSNM

3) *en relación a los patógenos.*

3.1) La mayoría de los productores mencionaron el ataque de “chahuixtle” que es lo equivalente a los daños por áfidos, araña roja, y gusanos,

3.2) Los principales problemas parasitológicos son; la bacteria en hojas y el “amarillamiento o fuego”.

3.3) El “amarillamiento o fuego” se presenta en los meses con mayores temperaturas, mientras que la mancha bacteriana en temporada lluviosa,

3.4) Se ha presentando desde hace 2 años aproximadamente,

3.5) Puede aparecer en cualquier etapa del cultivo, 3.6) las perdidas por esta enfermedad van del 50 al 70% del cultivo, por esta razón, una vez que aparece, prefieren eliminar el cultivo,

3.7) Una vez que aparecen los síntomas no se puede hacer nada, no se han podido recuperar las plantas a pesar de aplicar agroquímicos,

3.8) La mayoría de los productores manifiestan que todo es a causa de las altas temperaturas presentes.

4.1.2. Colecta de muestras

4.1.2.1. Semillas

Las variedades que se colectaron fueron 6 y un criollo, las cuales son; Sun master, Pakistán, Canadiense, Líder, Long Standing, American Pasific, y Criollo. Las variedades mayormente sembradas son las primeras 3 mencionadas. En el primer

recorrido se colectaron a las variedades, 1, 2, 3, 4, 7; en el segundo 1, 7; en el tercero 5 y 6; y en el cuarto 7 (Cuadro 10), es decir, al final se tuvieron repeticiones de la misma variedad, pero colectadas en diferente municipio.

Cuadro 10. Semilla colectada en diferentes municipios del estado de Puebla.

No	Variedad	Municipio	Comunidad
1	Pakistán 1y 2	Palmar de Bravo, Quecholac	La noria, Palmarito Tochapán
2	Líder	Tehuacán	Tepanco
3	American Pasific	San salvador el seco, Quecholac	Zacatepec, Manjarrez
4	Canadiense	Palmar de Bravo, Quecholac	Nazareno, Palmarito Tochapán
5	Criollo	Atlixco	Atlixco
6	Long Standing	Atlixco	Atlixco
7	Sun master	Quecholac, Tehuacán, San Matías Tlalancaleca	San Isidro, San Matías Tlalancaleca

4.1.2.2. Suelo

Se colectaron 3 muestras de suelo de los municipios de San Salvador el seco, Tehuacán, y San Martín Texmelucan.

4.1.2.3. Plantas enfermas

Las plantas de cilantro seleccionadas y colectadas, presentaban la siguiente sintomatología:

- 1) Clorosis de nervaduras, la cual se encontró en diferentes grados de severidad. En casos avanzados las nervaduras se necrosan, y la necrosis sigue avanzando hasta abarcar gran parte de la hoja. El grado de daño depende de la etapa de la planta en la cual se presente la enfermedad (Fig. 13).
- 2) Enrojecimiento en hojas, es uno de los síntomas más típicos dentro del complejo de la enfermedad estudiada. El enrojecimiento de la hoja empieza por los márgenes, hasta cubrir por completo, incluso a las nervaduras. Este síntoma se puede observar en toda la planta pero comienza por las hojas más viejas (Fig. 14).

- 3) Clorosis inter-venal, luce como mosaico en la hoja. Este síntoma comienza como una ligera clorosis entre los nervios, la cual se va haciendo más notoria a medida que la hoja envejece, pero nunca cubre las nervaduras, ya que estas se mantienen siempre de color verde oscuro. El síntoma se observa en hojas de todas las etapas pero principalmente en las hojas más viejas (Fig. 15).
- 4) Moteado en hojas, es una más de la variantes de clorosis que presentan las plantas enfermas, y se expresa como una clorosis amarillenta de las hojas, que comienza por los márgenes pero de manera des uniforme, lo cual provoca que luzca como un moteado. En etapas avanzadas las hojas pueden lucir como si estuvieran necrosadas. Los márgenes de algunas hojas pueden lucir rojizos. Este síntoma se presenta en hojas de cualquier etapa pero principalmente en las hojas viejas (Fig. 16).
- 5) Manchas cloróticas, distribuidas de manera des uniforme en la hoja. Este síntoma es uno de los que se presentan con menor incidencia en las plantas enfermas con “amarillamiento o fuego del cilantro” y en la mayoría de ocasiones se encuentra de manera aislada. Se caracteriza por la aparición de manchas cloróticas en las hojas de diferentes etapas. Estas manchas comienzan en algún punto de las nervaduras y se van extendiendo hasta cubrir toda la hoja, dependiendo de la etapa en la cual se presente el síntoma (Fig. 17).
- 6) Achaparramiento bastante notable desde etapas tempranas, este se presenta en la mayoría de las plantas enfermas, es uno de los síntomas que más afectan en términos comerciales al cultivo, ya que la parte aprovechable es el follaje, y en estos casos este es muy reducido. Se caracteriza por el acortamiento entre los entrenudos de la planta y su aparición en cualquier etapa del cultivo (Fig. 18).

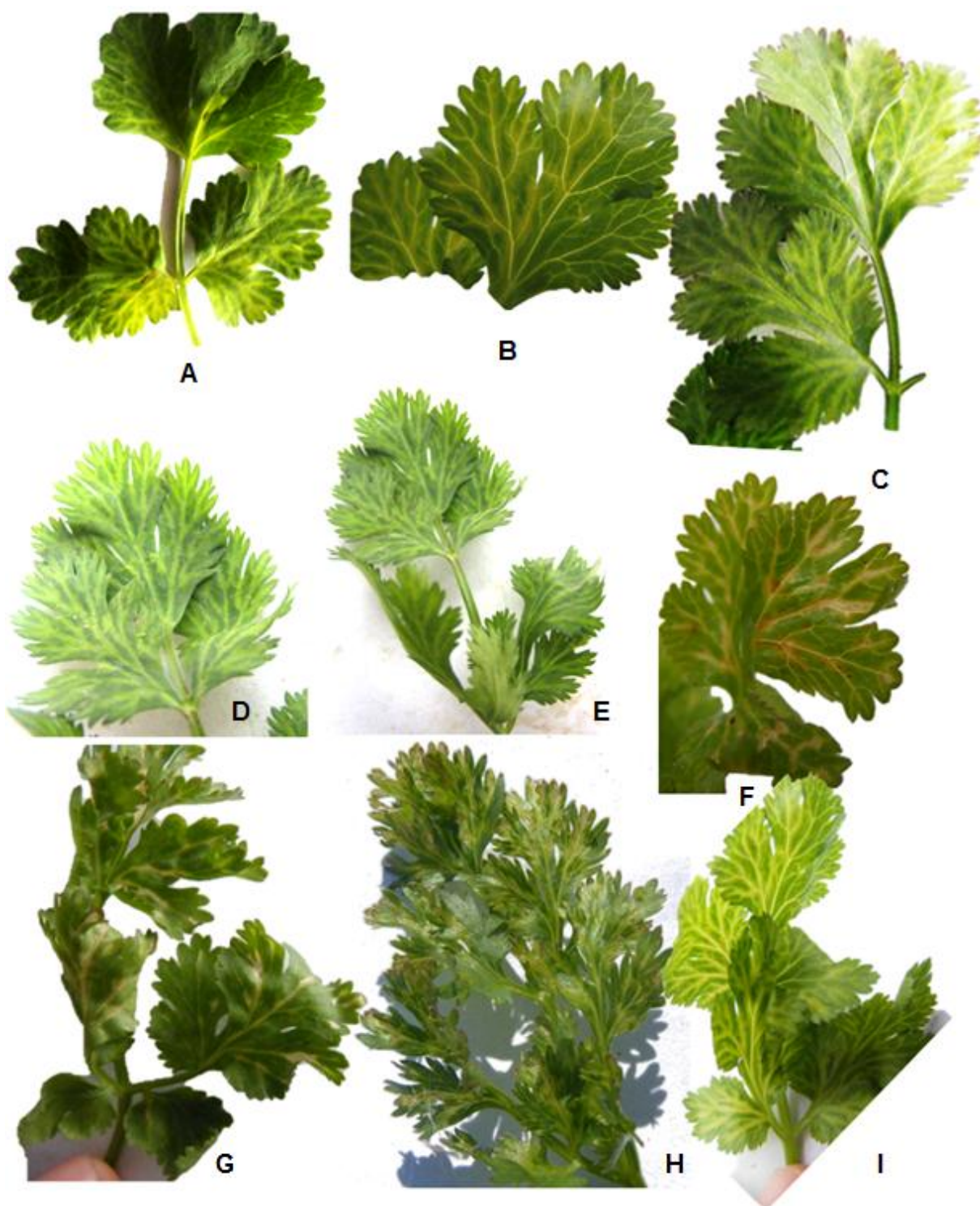


Figura 13. Clorosis en nervaduras de hojas de cilantro en diferentes grados de severidad (A-E, I) etapas iniciales (F-H), necrosis de las venas en etapas avanzadas.

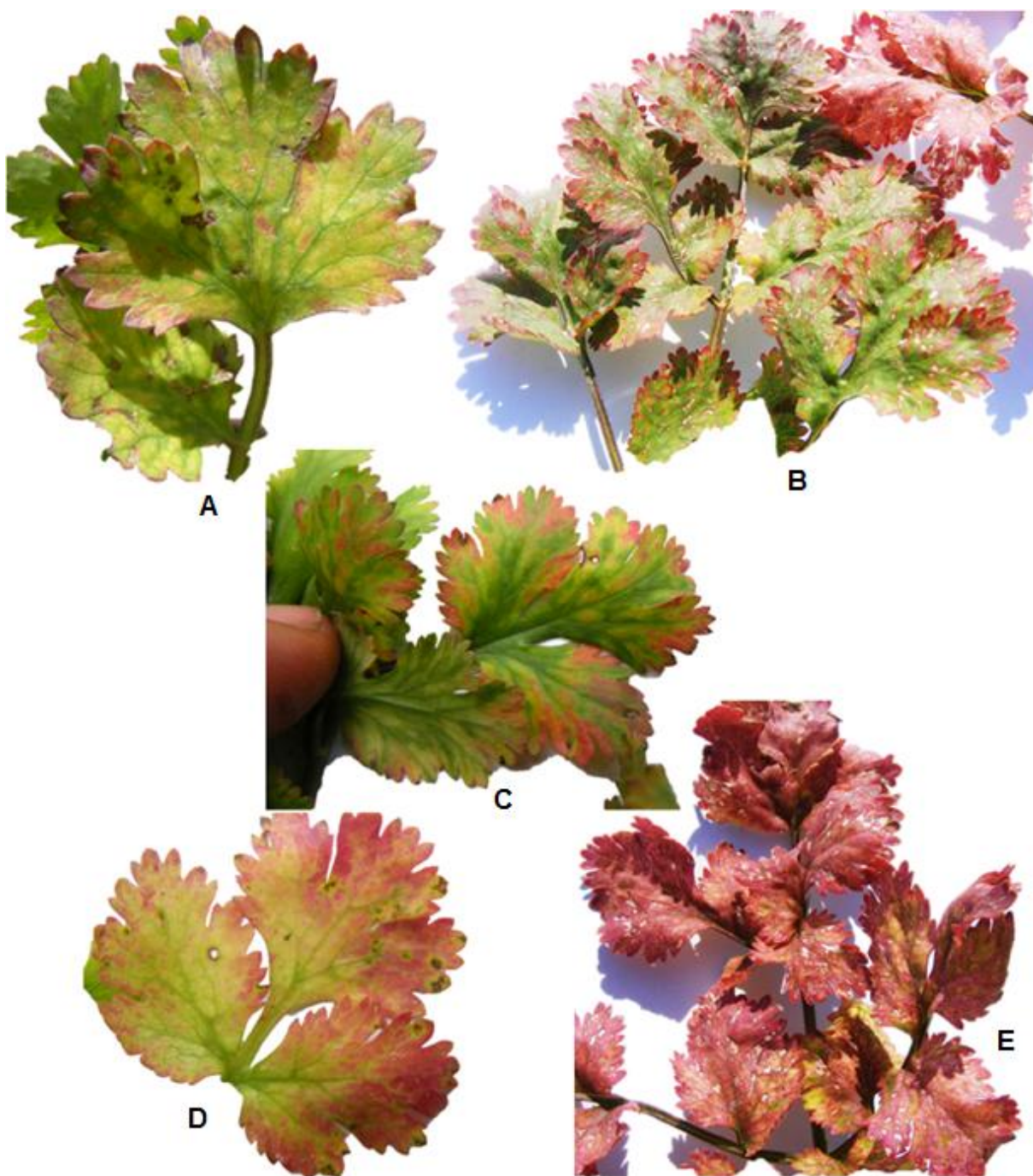


Figura 14. Enrojecimiento de las hojas del cilantro. (A-D) etapas iniciales, comenzando por los márgenes (E) etapa avanzada, cubriendo toda la hoja.

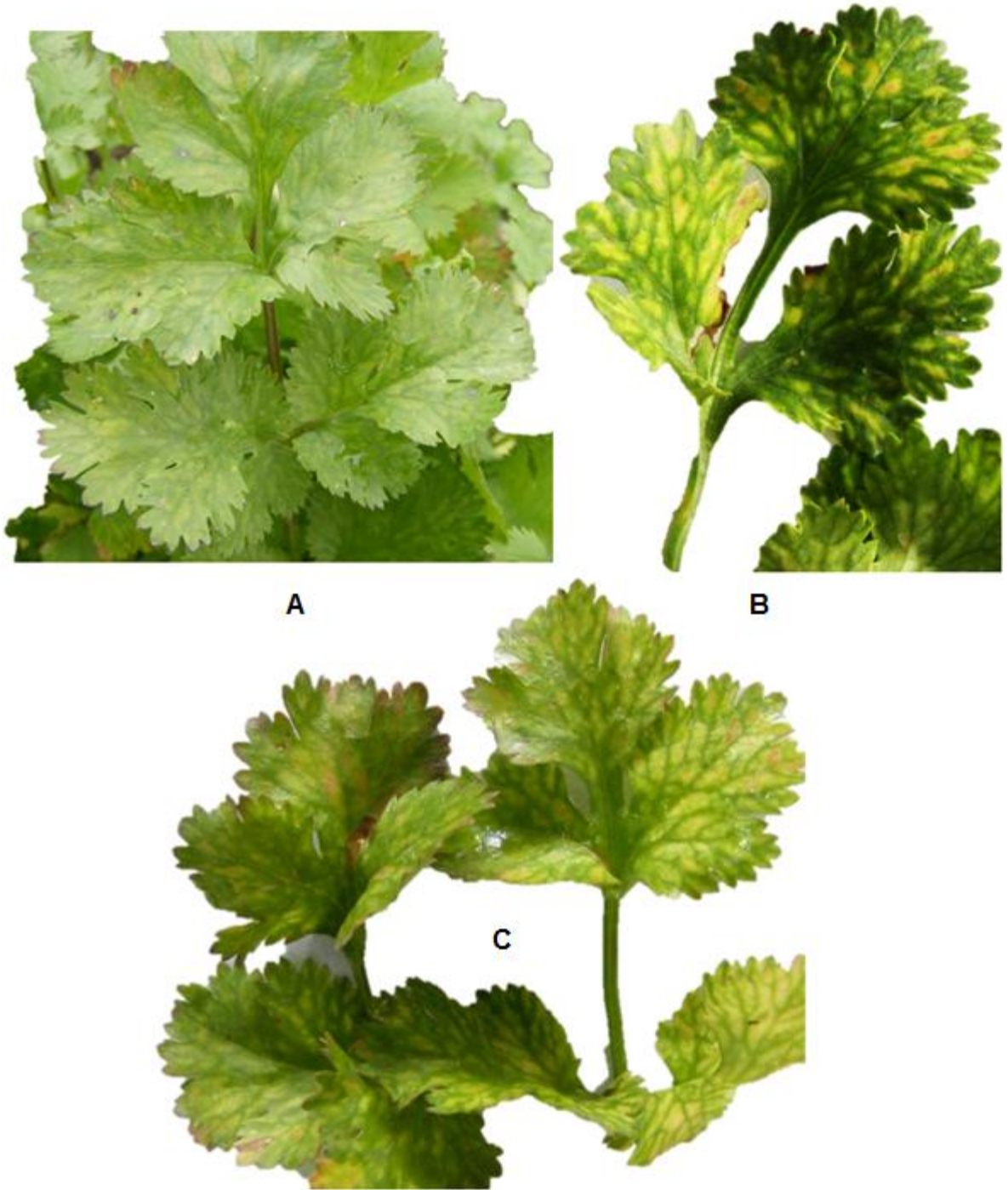


Figura 15. Clorosis inter-venal, la cual luce como mosaico en la hoja. (A etapa inicial (B) y (C) etapas avanzadas, cubriendo todo el espacio intervenal.

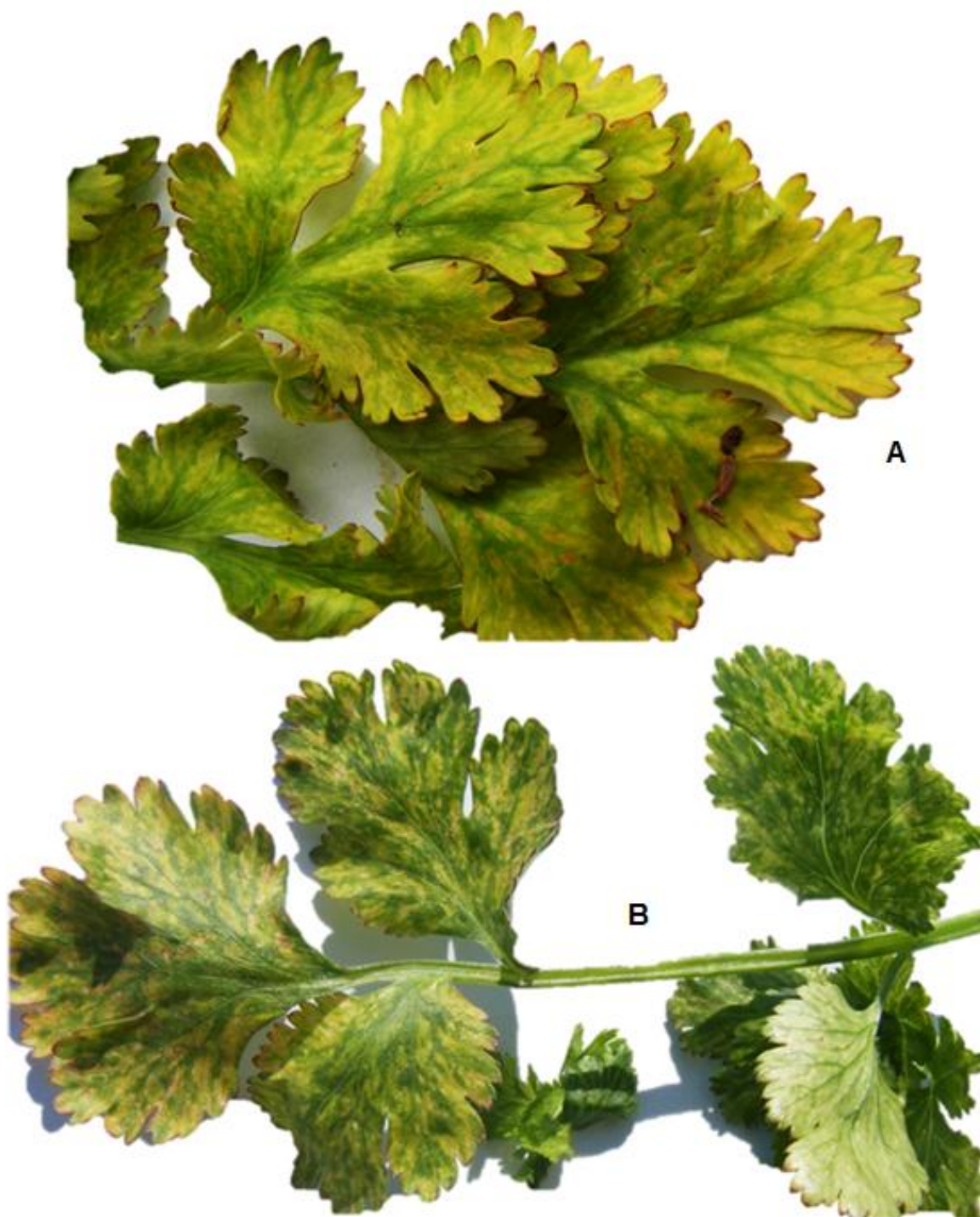


Figura 16. Moteado en hojas. (A) Etapa intermedia en la cual ha avanzado de los márgenes hacia el centro, (B) etapa avanzada, las clorosis se torna cafésosa.

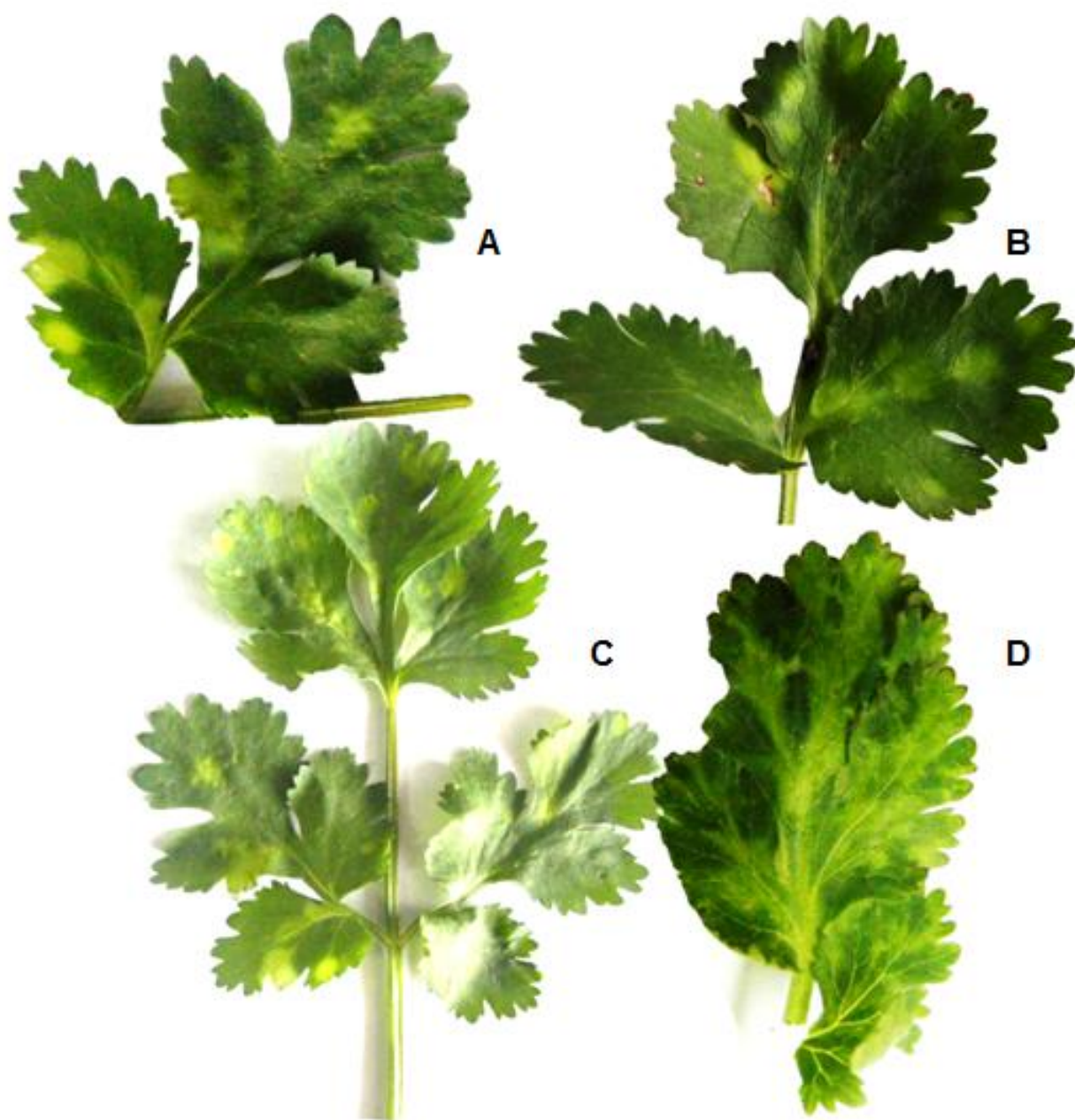


Figura 17. Manchas cloróticas en las hojas. (A) y (B) etapas iniciales, las manchas se inician por las venas, (C) las manchas crecen y cohalecen, (D) en este caso este síntoma se encuentra mezclado junto con clorosis de nervaduras, y se ha expandido por toda la hoja.



Figura 18. Achaparramiento en plantas. Se caracteriza por el acortamiento entre los entrenudos de la planta y su aparición en cualquier etapa del cultivo. Esta es una planta característica de “amarillamiento o fuego del cilantro”, ya que posee todos los síntomas.

4.1.2.4. Insectos

Los insectos, colectados fueron trips, catarinas, moscas de diferentes tipos, pulgones, chicharritas, avispas y psíidos (su identificación y pruebas realizadas se observa en el capítulo 2).

4.1.3. Evaluación de la distribución espacial e incidencia de la enfermedad

El patrón de distribución espacial de la enfermedad en el terreno, fue en manchones (Fig. 19) y se encontró mayormente distribuida en las orillas y disminuyó hacia el centro de la parcela (Fig. 20).

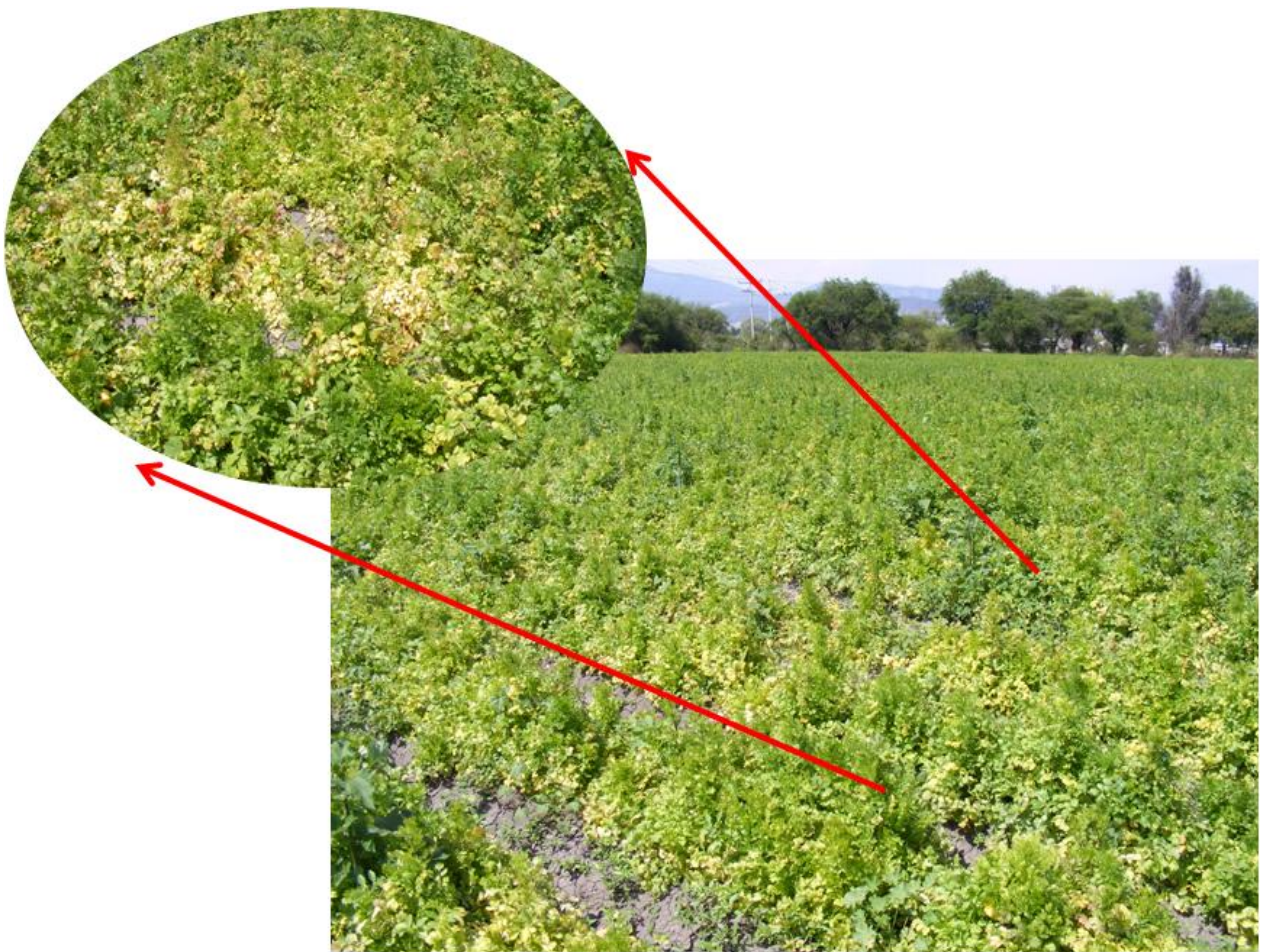


Figura 19. Sitio de colecta, Tehuacán, distribución en manchones de la enfermedad.

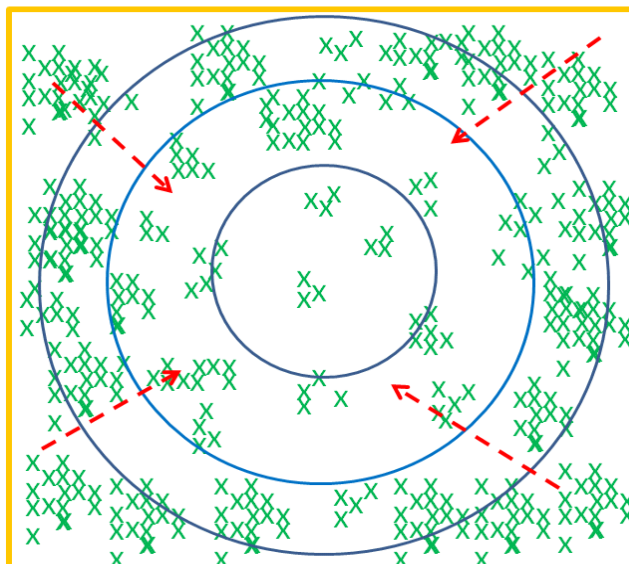


Figura 20. Prototipo de la distribución de la enfermedad en el terreno.

La incidencia de enfermedad en el municipio de San Martín Texmelucan fue baja (8.7%); se tomó como el número de matas enfermas, ya que es difícil contar plantas independientes, la fórmula utilizada fue;

5755 matas enfermas, densidad de población aproximada; 66,000 matas

$$\text{Incidencia} = 5755/66000 = 0.0871 \times 100 = \mathbf{8.71\%}$$

Aunque la incidencia fue baja, esta huerta ya había sido cosechada con anterioridad; lo cual podría indicar que la enfermedad se presentó en una etapa cercana a la cosecha. En otras parcelas se han presentado incidencias superiores al 70% (Fig. 21), en la que se abandona el cultivo. Las incidencias mayores se presentan cuando la enfermedad afecta al cultivo en etapas tempranas y cuando las temperaturas son altas y hay baja humedad relativa.



Figura 21. Cultivo de cilantro en el municipio de Quecholac, afectado por la enfermedad, con una incidencia superior al 70%.

4.2. Fase de laboratorio

4.2.1. Prueba de germinación

La germinación de más del 50% de las semillas se registro entre los 10 y los 12 días después de la siembra (Fig. 22), para todas las variedades a excepción de A. pasific y el criollo colectado en Atlixco, que mostraron una germinación del 40% y 20% respectivamente (Cuadro 11).



Figura 22. Germinación de semillas de la variedad Sun master, a los 12 días después de la siembra.

El mayor % de germinación fue presentado por las variedades; Pakistán, Canadiense y Líder, (82%, 79% y 76% respectivamente), sin embargo el ISTA (2011) maneja un 85% para las empresas semilleras. A. Pasific, Sun master y Long Standing y el criollo tuvieron porcentajes de germinación muy bajos (Cuadro 11), posiblemente debidos a la antigüedad de la semilla o a los hongos presentes (ver Capítulo IV). El bajo % de germinación del criollo se puede deber al mal manejo durante la producción de semilla, o bien al mal beneficio de esta, después de la cosecha, ya que las maquinas o métodos utilizados pueden estar dañándola según sus metodologías de cosecha y beneficiado empleadas como lo manifiesta el ISTA, (2011) en sus reportes.

Cuadro 11. Porcentaje de germinación de las 6 variedades colectadas y el criollo.

Variedad	(dds)	% de germinación
American pasific	24	40%
Líder	12	76%
Sun master	12	66%
Pakistán	10	82%
Long Standing	12	55%
Criollo	24	20%
Canadiense	11	79%

dds: días después de la siembra, tomado cuando mas del 50% habían germinado

Estos resultados conllevan a pensar que la semilla no está cumpliendo con los estándares que se exigen por los productores y el SNICS, o con los que se manejan para la mayoría de semilla de hortalizas y otros cultivos; sin embargo, seria indispensable controlar los factores de humedad relativa y temperatura para corroborar dichos datos, ya que es indispensable que los % de germinación sean superiores al 85%, porque solo así se garantiza tener una densidad de población que pueda influir de manera positiva en el rendimiento, debido a que al menos se garantizara que la semilla tiene el suficiente vigor para generar una planta sana y con mayor capacidad de competencia para defenderse de los patógenos.

4.2.2. Ensayo de transmisión de patógenos presentes en el suelo y por semilla

Los resultados de este ensayo se dividieron en dos factores, suelo y variedad y fertilización, como se muestra a continuación:

4.2.2.1. Suelo

Suelo de Tehuacán: a) las plantas sembradas en suelo no estéril (T15 al T28), generaron plantas con poco crecimiento y clorosis de hojas comenzando por los márgenes (fig. 23), b) las plantas sembradas en suelo estéril (T1 al T14) no presentaron achaparramiento, ni clorosis apical.

Suelo de San Salvador el Seco: a) Las plantas sembradas en suelo no estéril (T43 al T56), presentaron menor vigor y un ligero achaparramiento, b) las plantas en suelo estéril (T29 al T42) se mostraron sanas (fig. 25)

Suelo testigo: las plantas mostraron vigor y ningún síntoma (T56 al T63), Fig. 25.

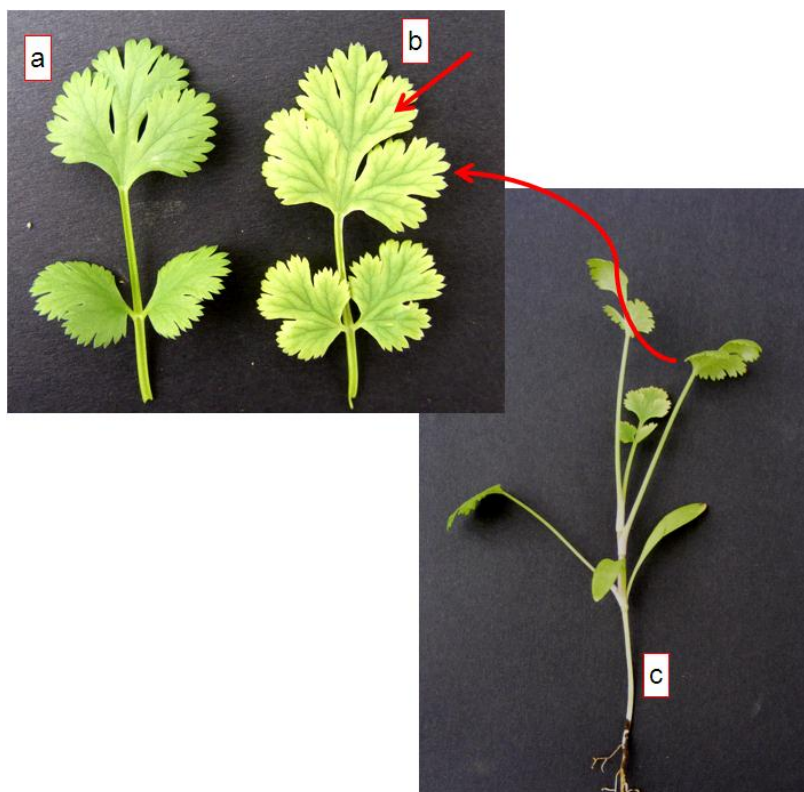


Figura 23. Comparación de una hoja sana (testigo) y una hoja enferma. (a) Hoja de una planta sana (T56), (b) hoja de una planta enferma (T15), y (c) planta con achaparramiento y clorosis apical (T15).

4.2.2.2. Fertilización

Las plantas fertilizadas, fueron vigorosas y de color verde intenso, en comparación con las no fertilizadas, que fueron amarillentas y poco vigorosas en todos los tratamientos (Fig. 24). Las deficiencias observadas son muy parecidas a las mencionadas por Rubasky and Quiros, (1999) para nitrógeno, expresada como, lento y restringido crecimiento de los cultivos, raíces y tallos son pequeños, delgados, erguidos y duros, y la madurez se retrasa; hojas más pequeñas de lo normal, son pálidas, y cuando la deficiencia es muy fuerte presentan una pérdida del color. Las hojas inferiores son las primeras afectadas, las hojas más viejas pueden desarrollar un tinte rojo marginal, y algunas veces de color blanco amarillento.

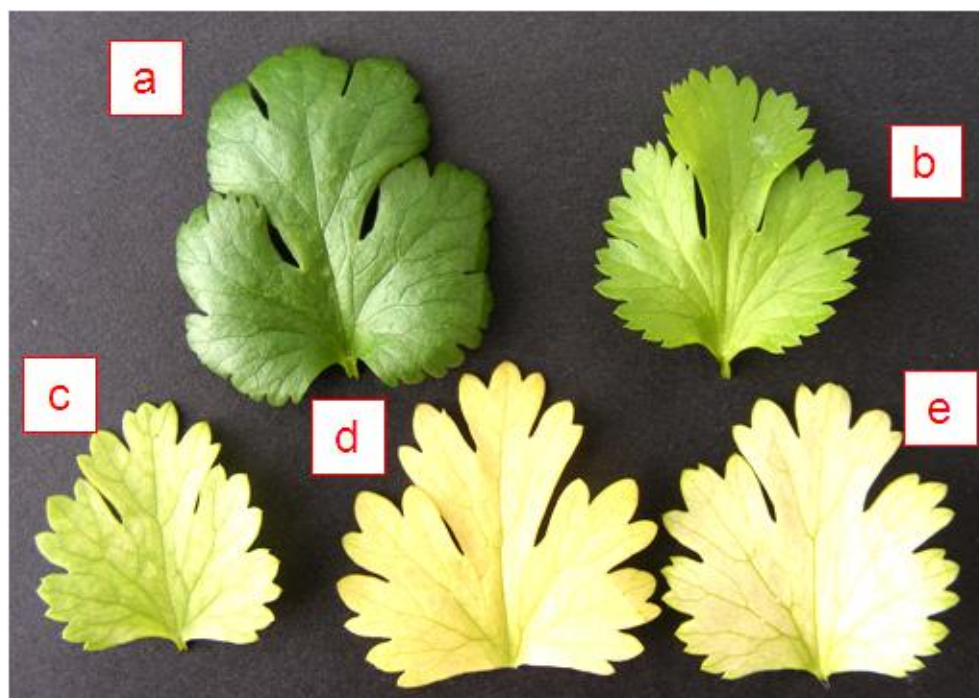


Figura 24. Hojas de plantas con y sin fertilizar. (a) Hoja de planta fertilizada tratamiento T63, (b, c, d y e) síntoma de avance de posible deficiencia de nitrógeno, tratamiento T42.

4.2.2.3. Variedad

Todas las variedades presentaron el mismo comportamiento, al observarse de manera visual, en cuanto a los tratamientos y las variables evaluadas.

4.2.2.4. Interacción de factores (suelo, fertilización y variedad)

- 1) No se presentó ningún síntoma relacionado con la enfermedad de interés (Amarillamiento o Fuego) a excepción de la reducción de crecimiento y clorosis de las plantas sembradas en suelo no estéril de Tehuacán (T15 al T28). Estos síntomas pueden ser causados por un patógeno que se encuentre obstruyendo el paso de agua y nutrientes, como lo menciona, Agrios, (2010), que si el movimiento del agua a las hojas se inhibe por algún patógeno, las hojas no pueden funcionar adecuadamente, la fotosíntesis se reduce o se detiene, y son muy pocos nutrientes o poco disponibles para ir a las raíces, que a su vez se ven debilitadas y enfermas y pueden incluso morir; si los agentes patógenos destruyen parte de las raíces de una planta o tapan el xilema o elementos del floema, interfieren con la translocación de agua y de nutrientes inorgánicos u orgánicos, que a menudo causan una reducción en el tamaño de la planta.
- 2) El achaparramiento y clorosis, fue evidente en los tratamientos donde no se fertilizó (fig. 25) esto sugiere que los síntomas, se ven frenados, en cierta medida, cuando la planta tiene mayor disposición de nutrientes y genera más defensas. Por otro lado este posible patógeno está dañando las raíces y/o los haces vasculares de las plantas, por lo cual se requiere revisar las plantas para determinar daños en raíz y hacer su aislamiento (ver Capítulo IV).
- 3) Las deficiencias observadas, fueron principalmente de nitrógeno; y son distintos a los provocados por el “amarillamiento o fuego del cilantro”, por lo que, la enfermedad no se debe a la falta de este nutrimento, ya que los productores realizan una fertilización adecuada del cultivo y las condiciones ambientales son poco favorables para la aparición de las posibles deficiencias en la época del año en la que se presenta la enfermedad. Para los nutrientes P y K, no se observaron deficiencias nutrimentales a pesar de no haber fertilizado, lo cual indica que el síndrome en estudio no está relacionado con deficiencias de los macronutrientes P, y K, ya que el suelo utilizado fue el mismo de las parcelas con problemas.

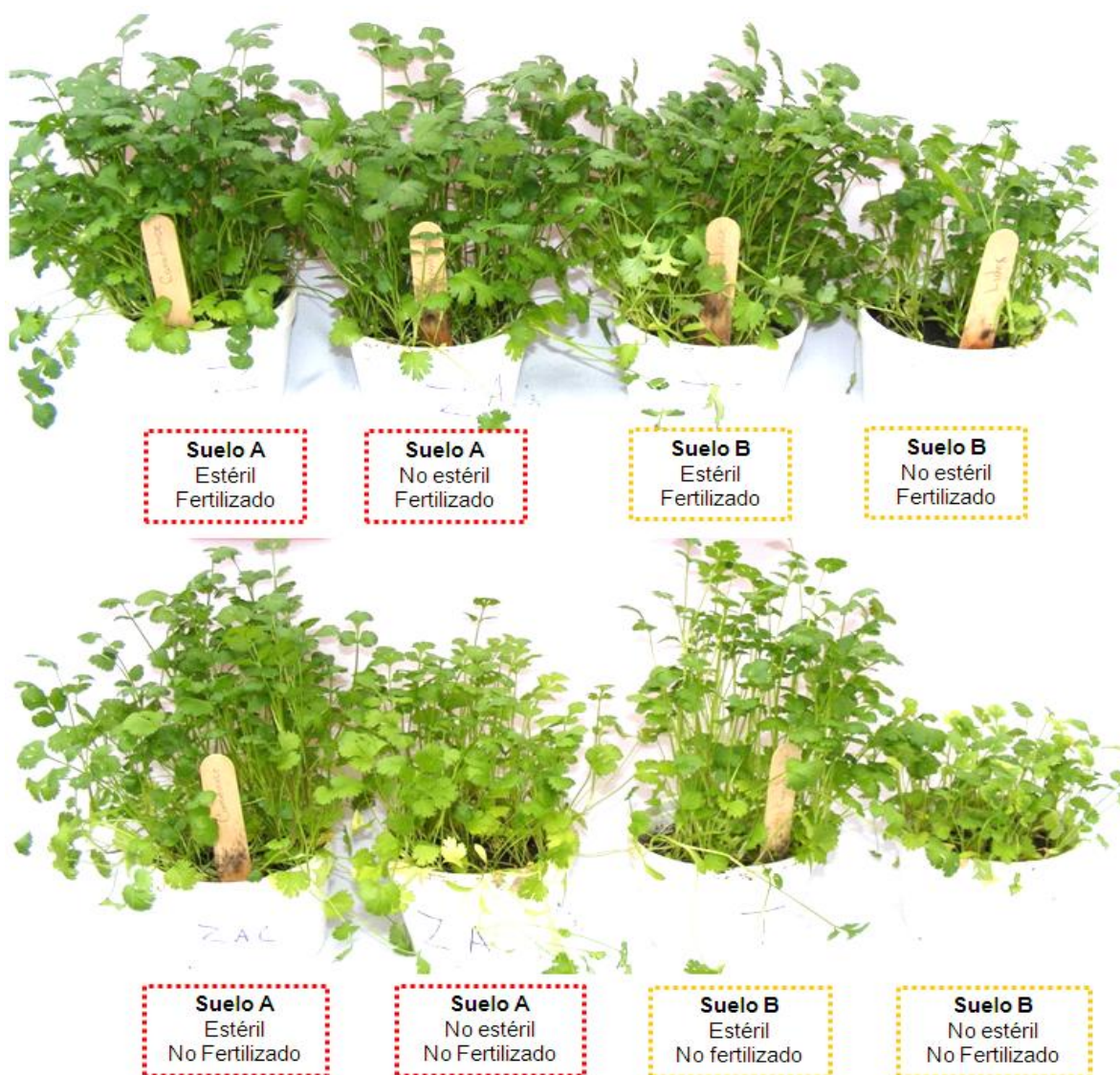


Figura 25. Plantas a los 52 días después de la siembra, con los respectivos tratamientos. Suelo A: San Salvador el seco y Suelo B: Tehuacán.

4.2.3. Ensayo de fitotoxicidad por Linuron

Los síntomas observados, como daño por fitotoxicidad de Linuron en las plantas fueron distintos según la etapa de aplicación, es decir, pre o post emergencia al cultivo y todos en la dosis alta. Pero ninguno de ellos coincidió con los provocados por la enfermedad en estudio (Fig. 26).

En pre emergencia al cultivo se observó que el herbicida inhibió la germinación de las plantas (Fig. 26), en todos los tratamientos de dosis alta (T1 al T7). El único

tratamiento que presento cierta tolerancia al herbicida fue el tratamiento T3, es decir la variedad Sun Master. Los daños por fitotoxicidad se fueron debidos a que Linuron basa su selectividad al cultivo en posición y la dosis aplicada fue muy alta 2.0 kg de producto por hectárea y que no logro lixiviarse por completo causando los daños observados en el cultivo. Los síntomas por fitotoxicidad de Linuron coinciden con los reportados por Ruíz, (2006), para otras especies vegetales.

En post emergencia al cultivo, los síntomas de fitotoxicidad al herbicida fueron observados como la muerte de la planta, debido a la necrosis de las hojas (Fig. 26). Todos los tratamientos en dosis alta fueron altamente sensibles (T1 al T7) e incluso el criollo se mostro sensible en la dosis baja (T12).

El testigo y todos los demás tratamientos en dosis bajas no mostraron ningún tipo de síntomas.



Figura 26. Síntomas de fitotoxicidad de Linuron. (a) Síntoma de fitotoxicidad en pre emergencia, (b) testigo en pre emergencia. (c) síntoma de fitotoxicidad en post emergencia, (d) testigo en pos emergencia.

V. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

- ⇒ La enfermedad se presenta con mayor incidencia y mayor severidad en la época cálido-seca.
- ⇒ Los municipios con presencia de la enfermedad comparten características climáticas.
- ⇒ La enfermedad ataca a todas las variedades sembradas (según el testimonio de los productores).
- ⇒ La enfermedad se distribuye en manchones y se presente con un patrón de invasión de las orillas hacia el centro de la parcela.
- ⇒ El o los patógenos que provocan los síntomas no se transmiten por semilla.
- ⇒ El o los patógenos que provocan los síntomas no se encuentran en el suelo, a excepción de un patógeno que provoco achaparramiento en las plantas.
- ⇒ El herbicida más usado en la región (Linuron), no es el causante de la enfermedad en estudio.
- ⇒ La enfermedad no es resultado de la deficiencia de los macro elementos, NPK.

Capítulo II. Insectos asociados al “amarillamiento o fuego” del cilantro



De las 383 especies de animales citadas como vectores de virosis vegetales, el 94%
son artrópodos (Harris, 1990).

CAPITULO 2. Insectos asociados al “amarillamiento o fuego del cilantro”.

I. INTRODUCCIÓN

De los insectos, los organismos más importantes como transmisores de patógenos son los áfidos, ya que son potenciales vectores virus fitopatógenos. En importancia, les siguen las chicharritas que son capaces de transmitir tanto virus como algunos fitoplasmas en diferente especies. Los psílidos han recobrado bastante importancia en estos últimos años debido a su capacidad para transmitir bacterias vasculares de gran importancia agrícola. Los trips con menores capacidades de transmisión, pero no menos importantes, son capaces de transmitir algunos tospovirus y finalmente las moscas blancas son muy conocidas como transmisores de virus de Geminivirus.

En cultivos de la misma familia del cilantro, se ha reportado a una amplia variedad de insectos con potencia de transmisión de patógenos; sin embargo, en el caso del cilantro, solo se mencionan áfidos y trips; Urias, et. al., (1992), reportó *Caveriella aegopodi*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*, mientras que, Blackman and Eastop, (2000), reportan *Aphis gossypii*, *Brachycaudis helichrsi*, *Hyadaphis coriandri*, *H. foeniculi*, *Myzus ornatus* y *Semiaphis heraclei*. Araujo; (1986); Diederichsen, (1996) solo menciona a *Myzus persicae* y *Hyadaphis coriandri* en cilantro. En el caso de trips en cilantro las especies *Thrips palmi* y *T. tabaci* (FDA, 1995).

Se ha determinado que los insectos chupadores, inyectan toxinas al alimentarse de las plantas, provocando toxemias que se manifiestan como clorosis y necrosis (Urias et al, 1992), síntomas relacionados con algunos de los manifestados por el “amarillamiento o fuego del cilantro”.

Por lo anterior, fue necesario determinar, si hay insectos asociados al cilantro, que están provocando toxemia en plantas o bien con potencial de transmisión de patógenos, en parcelas con la enfermedad, ya que se comprobó que la enfermedad no se trasmite por semilla, por suelo y tampoco se trasmite mecánicamente.

II. OBJETIVOS

- ⇒ Identificar los posibles vectores de la enfermedad, para determinar que y/o cuales patógenos pueden estar involucrados.
- ⇒ Realizar pruebas de transmisibilidad del agente causal con los posibles vectores, para determinar que insectos están involucrados con la transmisión de la enfermedad y cuál(es) es(son) el (los) posible patógeno(s) o bien si estos provocan algún tipo de toxemia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Identificación de insectos

Para identificar los insectos se utilizaron claves dicotómicas propuestas por Holman, 1972, Urias *et al.*, (1992) y Blackman y Eastop, (2000), Quintanilla, (1980), Hammon, (2001), Soto y Retana, (2003) y CSIR, (2009), Borrór, (1981), Borrór *et al.*, (1981) y Bautista, (2006), basándose en las características morfológicas.

Para identificar los insectos de mayor tamaño, bastó con observar al estereoscopio; para áfidos se hicieron montajes en el Laboratorio de Entomología y Acarología de la Dirección General de Sanidad Vegetal, perteneciente al CNDRF del SENASICA.

El procedimiento para los montajes que se realizaron se describe a continuación:

Montajes temporales. Para este tipo de montajes se usó, KOH al 40%, agua destilada, clora fenol, y líquido de Hoyer. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: Se seleccionaron los áfidos en estado adulto, alados o ápteros, se picó el abdomen de los pulgones en los laterales, haciendo de 4 a 5 orificios, se pusieron a remojar en KOH al 40% durante 4 a 5 minutos en baño maría, posteriormente se lavaron 2 veces en agua destilada, con periodos de 20 minutos cada lavada, a continuación se colocaron en Clora fenol durante 1 hora, en la oscuridad, después ya en el portaobjetos, se colocó una gota de líquido de Hoyer en el cual se sumergió al pulgón con el estilete hacia abajo, se extendieron las alas, las antenas, las patas y los sunficulos, finalmente se colocó el cubreobjetos evitando hacer burbujas y se dejó

secar durante varios días en la estufa de incubación a 35°C para poderse sellar con barniz.

Montajes permanentes. Las variantes para la elaboración de este tipo de montajes, son el uso de aceite de clavo y bálsamo de Canadá en lugar del líquido de Hoyer. En cuanto al procedimiento este es el mismo, lo único que varían son los tiempos de tratado, en KOH 2 horas a temperatura ambiente, y en el caso del Clora fenol se dejaron durante 24 a 48 hrs en la oscuridad. Antes de colocarse en el portaobjetos se tratan con Aceite de Clavo de 5 a 7 minutos y, finalmente se montan sobre Bálsamo de Canadá en lugar de líquido de Hoyer.

Se elaboraron montajes para los diferentes sitios de colecta, pero solo se montaron de 2 a 3 ejemplares por especie. Una vez fijados, se procedió a tomarles fotografías en diferentes escalas y a las partes del cuerpo más importantes para su identificación como son: cabeza, antenas, cauda, sunficulos, y alas.

3.2. Pruebas de transmisibilidad

Tomando como prioridad las abundancia de afidos en los sitios de muestreo, se planteo hacer las pruebas de transmisión con este grupo de insectos, además de tomar en cuenta las pruebas de diagnostico que se llevaron a la par en las cuales se dedujo que solo los pulgones tenían importancia al sospecharse de un virus.

El tipo de transmisión a probar fue del tipo persistente, debido a que las pruebas iniciales, indicaron que el patógeno no se trasmitía mecánicamente, el procedimiento utilizado, fue el propuesto por Pinto, (1985) para virus persistentes, y es el siguiente:

A afidos sobrevivientes de la colecta se les dio un periodo de ayuno de 3 horas, el periodo de adquisición sobre plantas enfermas fue de 2 dias, y el periodo de inoculación fue de 2 dias, sobre plantas sanas de 1 mes de edad. Las plantas inoculadas se observaron durante los 25 días posteriores a la inoculación, para determinar el periodo de incubación del virus. Se repitió el ensayo de las plantas que dieron síntomas pero esta vez se separaron los afidos de diferentes especies en diferentes plantas. Se tomaron ejemplares de afidos de aquellas plantas que dieron síntomas y se conservaron en alcohol al 70% para su posterior utilización.

Se utilizaron testigos de referencia, los cuales se les colocaron áfidos no infectivos, usando el procedimiento anterior, pero procedentes de colonias generadas a partir de áfidos en el primer instar, que aún no se alimentaban de plantas infectadas (colonias sanas).

3.3. Posibles virus transmitidos por los insectos encontrados

En base a los insectos identificados y los virus que atacan a umbelíferas, se realizó un cuadro de los virus probables.

3.4. Pruebas moleculares

Para determinar si se encontraban portando el patógeno en cuestión se extrajo el ARN y se hizo RT-PCR (Capítulo III).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación

Al hacer la separación de los insectos, se encontraron trips, catarinas, moscas de diferentes tipos, áfidos, chicharritas, avispas y psílidos; estos resultados conciden con lo reportado por Urias, et. al., (1992), Blackman and Eastop, (2000), Araujo; (1986); Diederichsen, (1996) y (FDA, 1995); sin embargo, no se tienen reportes de psílidos sobre cilantro.

Los trips presentes en cilantro se identificaron como *Frankliniella occidentalis*, en base a las características mencionadas por Soto y Retana, (2003); Ctenidium en el VIII segmento abdominal posterior al espiráculo; con 2 hileras de setas continuas en la ala anterior; seta poster marginal presente en la mayoría de las especies; habitualmente con 8 segmentos en la antena; generalmente 2 pares de setas anteroangulares mayores (excepto el grupo minuta, algunas especies) (Fig. 27). Los municipios donde se encontraron trips fueron: Palmar de Bravo, Texmelucan y San Matías Tlalancaleca. Esta especie de trips ya había sido reportada por FDA (1995), en cilantro en otros países; sin embargo en México solo se había reportado a Trips tabaco y T. palmi por CESAVER (2009).

El Psilido presente en cilantro en los municipios de Texmelucan, San Matías Tlalancaleca, Zacatepec y Quecholac, fue *Bactericera cockerelli* Sulk, en base a las características descritas por Bautista, (2006) adultos de color café con una banda blanca en la cabeza, presentan un órgano sensitivo en el cuarto segmento, cuando están en reposo las alas se disponen en forma de tejado sobre el cuerpo, en la base del abdomen muestra una franja transversal y al final de este abdomen una “V” invertida (Fig. 28). No se ha reportado a este psilido en cilantro, pero Munyaneza et al., (2010), menciono su presencia en zanahoria, el cual es pariente cercano del cultivo.

De las chicharritas encontradas se identifico a *Empoasca* sp. según las características descritas por Bautista, (2006), adulto que mide aproximadamente dos o tres milímetros de longitud, color verde claro, su cabeza y protórax es color amarillento, en los cuales presenta machas blanquecinas (seis en el protórax), además en las tibias posteriores posee dos pares de espinas. También se identificó a *Spangbergiella* sp., *Draeculacephala* sp. y *Oncometopia* sp. (Cuadro 12). En base a las características descritas por Borrór et al., (1981), venación distintiva al frente teniendo sólo un claval de rayas rojas o anaranjadas que normalmente se colocan en un modelo distintivo en la cabeza y pronoto, la cabeza de la hembra siempre más larga que ancha, para el caso de *Spangbergiella* sp. En el caso de *Draeculacephala* sp. se describe como una especie color amarillo y verde, sin marcas distintivas, longitud macho de 6 mm., hembra 7,5-8 mm verteo producido, ápice romo, más largo que el ancho basal y un poco más largo que el pronoto, parte de vertex, anterior del pronoto y escutelo amarillo, parte posterior del pronoto y los élitros de color verde oscuro. Vértice ligeramente marcado con estrechas líneas de color marrón. *Oncometopia* sp, identificada en base a comparación de imágenes, con los esquemas del mismo autor. No se habían reportados estas especies en cilantro, debido a que los estudios encuan to a plagas son muy escasos. *Empoasca* sp fue la chicharrita con mayor frecuencia de aparición encontrándose presente en todos los sitios de muestreo excepto Zacatepec, las demás especies solo se hallaron en los municipios de Texmelucan y San Matías Tlalancaleca (Fig. 29).

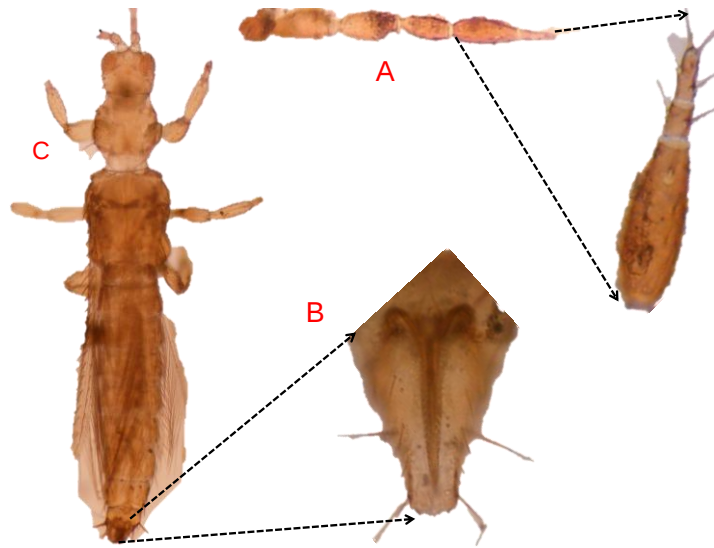


Figura 27.Trips (*Frankliniella occidentalis*.) encontrados en cilantro. A) antena con 8 segmentos, B) aparato reproductor, y c) cuerpo completo.

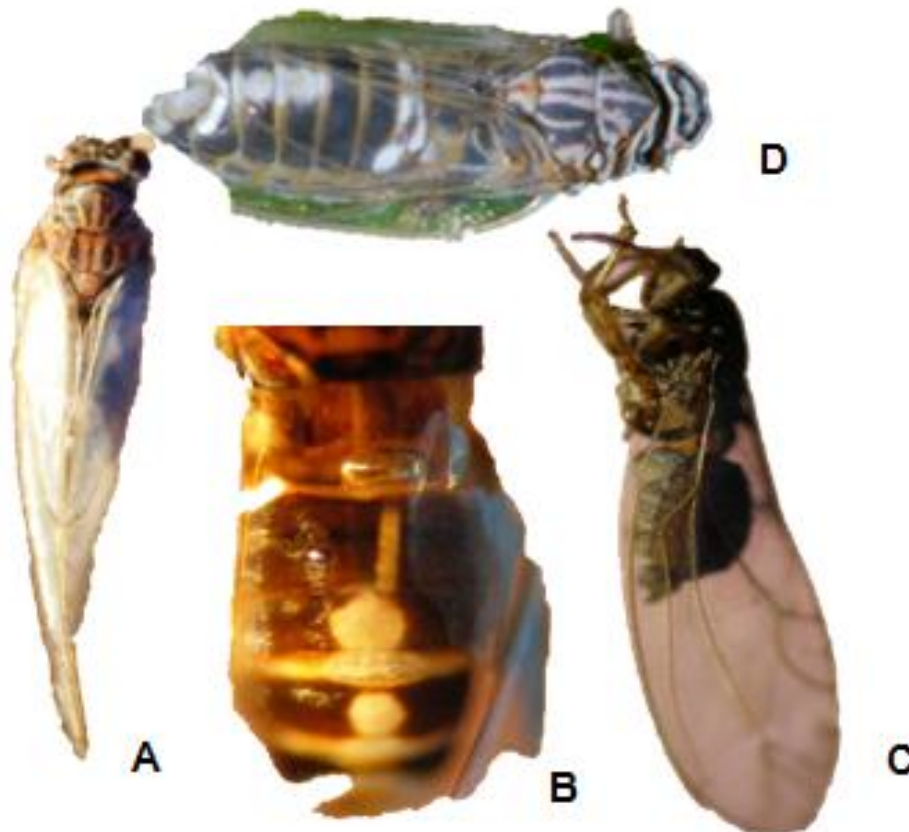


Figura 28. Psilido *Bactericera cockerelli* (paratrioza) colectado en cilantro. A) Cuerpo completo, B) manchas del abdomen, C) Vista lateral, y D) En la base del abdomen muestra una franja transversal y al final de este abdomen una “V” invertida.



Figura 29. *Empoasca* sp. la chicharrita presente en la mayoría de los municipios visitados.

Cuadro 12. Chicharritas colectadas en cilantro.

<i>Spangbergiella</i> sp.	<i>Empoasca</i> sp.	<i>Draeculacephala</i> sp.	<i>Oncometopia</i> sp.
			
			

En el caso de los afidos se identificaron 10 especies; sin embargo, solo 6 de ellas son las que más se repiten en los distintos municipios muestreados, las más frecuentes *Myzus persicae* (Fig. 30) *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Fig. 31) y *Macrosiphum euphorbiae* (Fig. 32), como se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Pulgones identificados en los distintos sitios de muestreo.

No	Pulgones	Sitio de colecta							Frecuencia
		1	2	3	4	5	6	7	
1	<i>Myzus persicae</i>	X	X	X	X	X	X	X	7
2	<i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i>	X	X	X	X	X	X	X	7
3	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	X		X	X	X	X	X	6
4	<i>Hyadaphis coriandri</i>	X		X		X			3
5	<i>Therioaphis trifolii</i>	X			X	X			3
6	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	X			X			X	3
7	<i>Aphis craccivora</i>				X		X		2
8	<i>Acyrtosiphon sp.</i>		X	X					2
9	<i>Semiaphis heraclei</i>	X							1
10	<i>Brevicoryne brassicae</i>	X							1

Sitios de colecta: **1.-** San Matías Tlalancaleca, **2.-** Nazareno, Palmar de Bravo, **3.-** Texmelucan, **4.-** Froylan C. Manjarrez, Quecholac, **5.-** La joya, Quecholac, **6.-** La ventana, Zacatepec y **7.-** Tehuacán.



Figura 30. *Myzus persicae*, alado colectado en cilantro. A) Cuerpo completo; B) Antenas con el proceso terminal mucho más largo que la base del último segmento antenal, C) Sifúnculos ligeramente engrosados en la mitad apical, D) Cauda y E) Tubérculos antenales bien desarrollados y convergiendo internamente. Bautista, (2006).



Figura 31. *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, áptero colectado en raíces de cilantro. A) Cuerpo completo, B) Cabeza, C) Antenas casi de la mitad de longitud del cuerpo y 8 veces tan largas como el sifúnculo, solo 5 segmentos antenales (característica principal), D) Cauda más clara en ejemplares jóvenes y oscura en adultos y, E) Sifúnculo de 1.7-1.8 veces la longitud de la cauda. Tanaka, (1961).

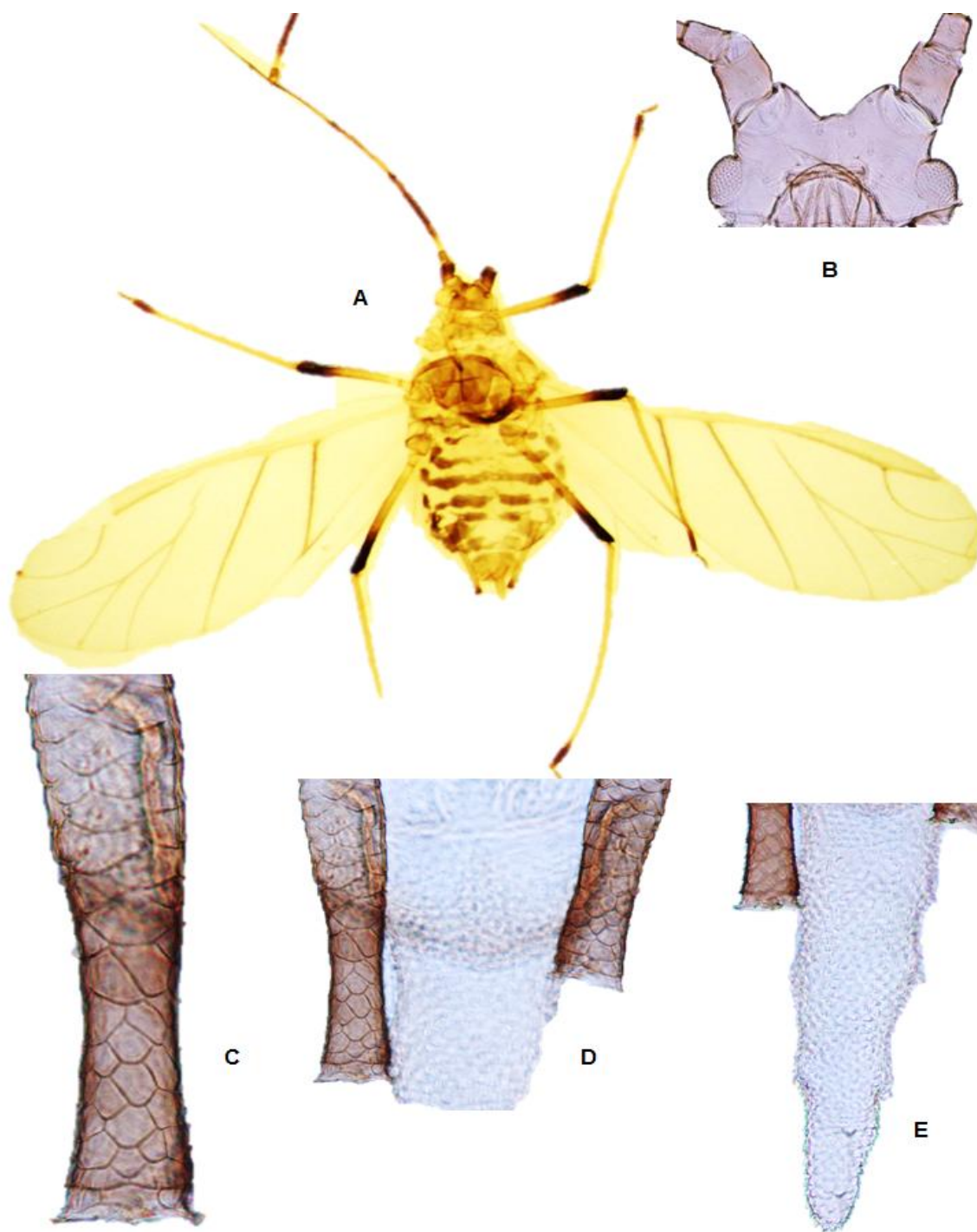


Figura 32. *Macrosiphum euphorbiae*. Adulto alado. Colectado en cilantro. A) Cuerpo completo con ausencia de pigmentación dorsal abdominal, posee antenas generalmente más largas que el cuerpo B) Cabeza con frente acanalada y con tubérculos antenales paralelos, en forma de “U”, o divergentes, en forma de “V” C) Sifúnculos cilíndricos rectos y con reticulacion poligonal apical y reborde poco desarrollado, D) Cauda y sifúnculos y, E) Cauda. Urias *et al*, (1992).

De los 10 pulgones colectados, solo se han reportado en cilantro a *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* por Urias, et al., (1992), *Hyadaphis coriandri*, y *Semiaphis heraclei*, por Blackman y Eastop, (2000); mientras que *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, *Therioaphis trifolii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon* sp. y *Brevicoryne brassicae*, aún no han sido reportados para este cultivo. La presencia de estas últimas especies en cilantro, pudo deberse a: 1) pudieron haber sido acarreadas por otros factores, como el viento, o los hábitos de migración que expresan al trasladarse; 2) son especies que se vieron obligadas a cambiar de plantas hospederas debido a la escases de sus plantas preferenciales, o bien 3) debido a sus hábitos alimenticios para identificar plantas preferenciales, ya que, como lo menciona Astier, et al., (2006), los áfidos no pueden identificar las plantas de su interés desde el vuelo, sino que tienen que probar durante varios segundos a las plantas que encuentren a su paso y en base a esto decidir si permanecen o visitan a otras plantas, además de ser atraídos por el color de la tierra o los colores amarillos. El segundo punto se refuerza para algunas especies al observar que se encontraron repetitivamente sobre el cultivo a pesar de tratarse de lugares de colecta distintos, como es el caso de *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, que fue encontrado en todos los sitios de muestreo y en las raíces de las plantas. Según Blackman y Eastop, (2000), este pulgón tiene como hospederos primarios plantas del genero *Prunus*, y como secundarios, numerosas especies de gramíneas, ciperáceas y en dicotiledóneas; solo se ha reportado atacando tomate, pero nunca en cilantro, lo mismo que *R. maidis*. En el caso de *B. brassicae* es muy claro que no se encontraba atacando al cultivo ya que en ambos casos donde se encontró se encontraban cultivos de brassicaceas a los alrededores así como *Acyrtosiphon* sp. que se reporta sobre leguminosas y sobre cebolla (Blackman y Eastop, 2000) y de igual manera había estos cultivos en parcelas vecinas. Para el caso de *Therioaphis trifolii* es difícil decir si se encontraba atacando al cultivo o no ya que se encontró en 3 de los 7 sitios de muestreo.

4.2. Pruebas de transmisibilidad

La identificación de los pulgones fue crucial, ya que al hacer los ensayos de transmisión de la enfermedad, se observó que estaban involucradas diferentes especies de pulgones, que variaban los síntomas de una planta a otra dependiendo la especie que se colocara, y que el tiempo de incubación para la aparición de los síntomas era distinto.

4.3. Sintomatología reproducida

a) Necrosis de nervaduras

El síntoma se inició como una clorosis de nervaduras (Fig. 33 A y B) y al avanzar se presentó necrosis (Fig. 33 C).

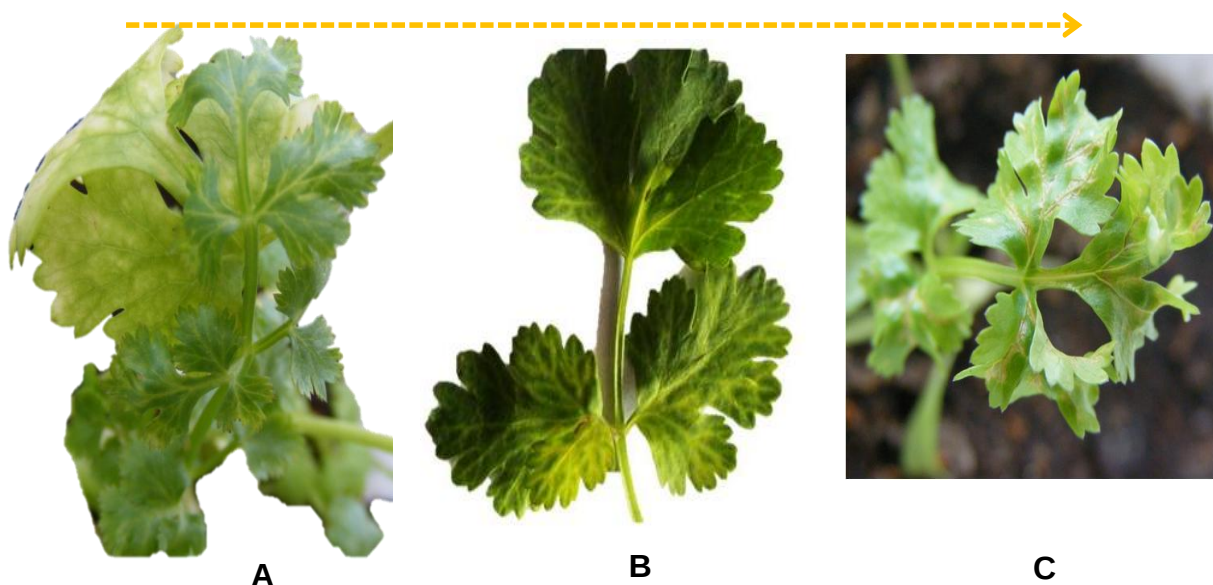


Figura 33. Síntomas de necrosis de nervaduras en cilantro, provocado por el patógeno transmitido por áfidos. A) y B) clorosis en nervaduras y, C) necrosis de las nervaduras.

b) Nervaduras amarillas

Este síntoma se caracterizó por presentar manchas amarillentas a lo largo de las nervaduras (Fig. 34 A-C), pero nunca llegan a necrosarse, solo se expanden hasta cubrir la hoja y tornarla clorótica (Fig. 34 D y E).

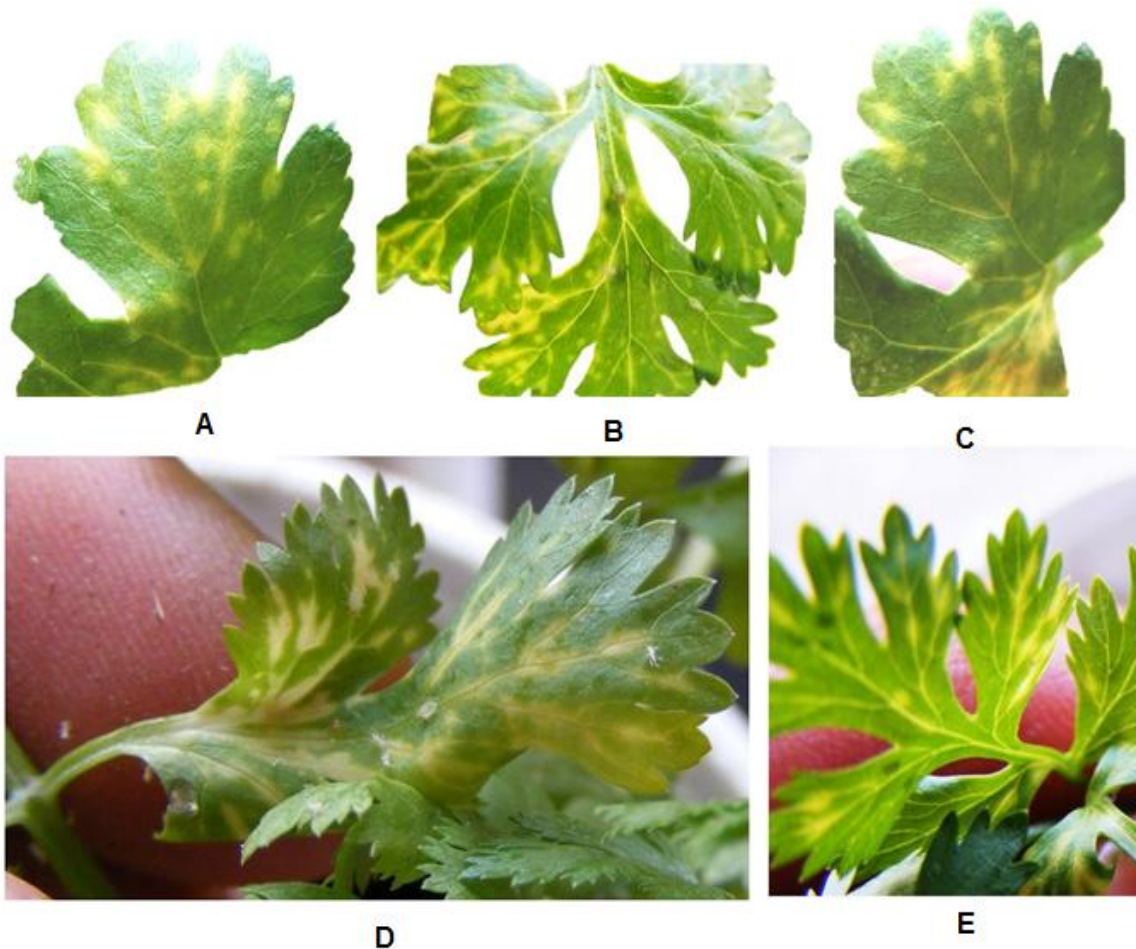


Figura 34. Amarillamiento de nervaduras en cilantro provocada por patógeno transmitido por los áfidos. A-C etapas iniciales del síntoma; D y E síntomas severo (note el avance hacia la totalidad de la hoja).

c) Mosaicos, moteados, arrugamientos y enrojecimientos.

Estos síntomas se mezclan en la misma planta, ocasionan clorosis severa y al avanzar enrojecimiento de las hojas, se empezaron a observar como mosaicos y moteados internervales pero estas manchas siguen creciendo hasta cubrir la hoja (Fig. 35 y 36).

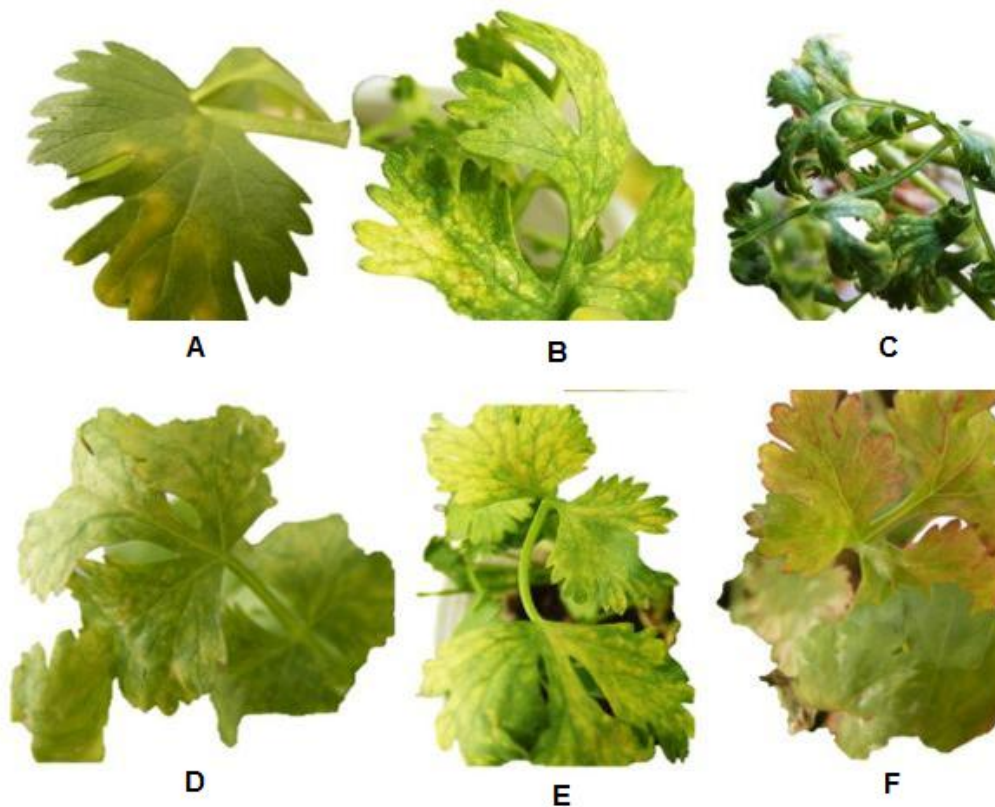


Figura 35. Síntomas de moteados, y enrojecimientos, reproducidos al hacer transmisión con afidos A) etapas iniciales de moteados, B) motedo avanzado, C) moteado y arrugamiento en hojas, D) mosaicos avanzados, E) mosaicos cubriendo la totalidad de la hoja, y F) enrojecimiento cubriendo la totalidad de la hoja.

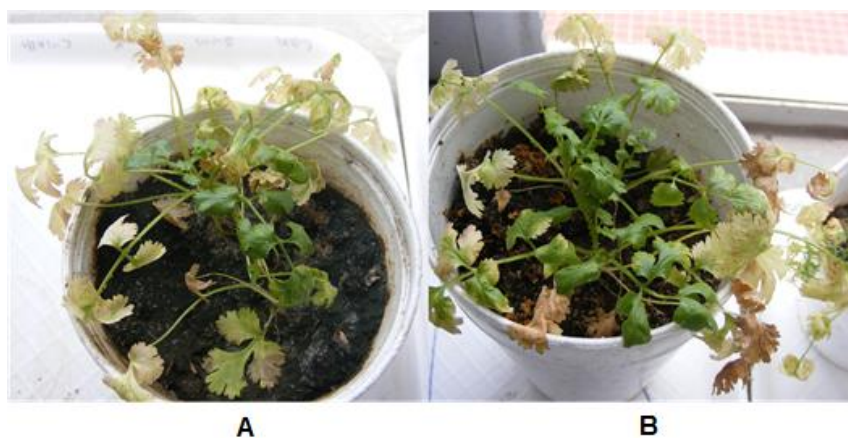


Figura 36. Plantas con síntomas de achaparramientos, moteados y enrojecimientos (A y B), reproducidos al hacer transmisión por afidos.

d) Testigo

El testigo a pesar de poseer pulgones durante el mismo tiempo que las plantas con síntomas no presento ningún tipo de síntoma, más que en algunos casos, enrollamiento de las hojas (Fig. 37 y 38).

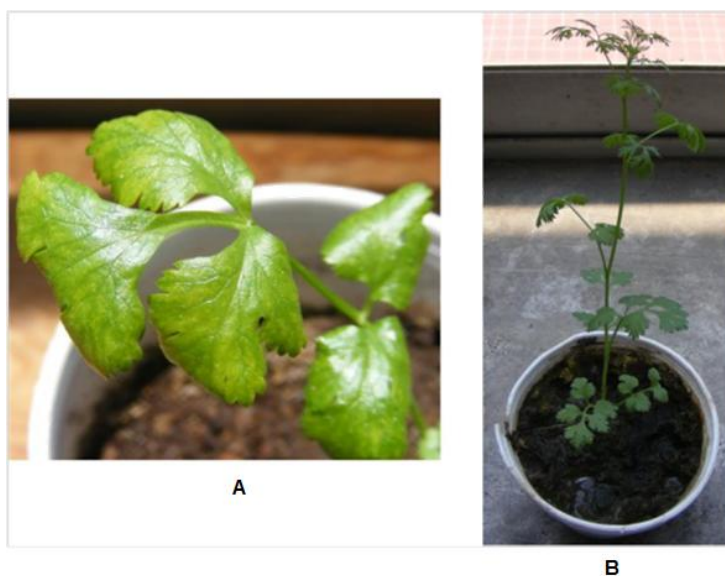


Figura 37. Plantas utilizadas como testigos, el máximo síntoma presentado al colocar afidos, fue un ligero amarillamiento de la hoja y enrollamiento.

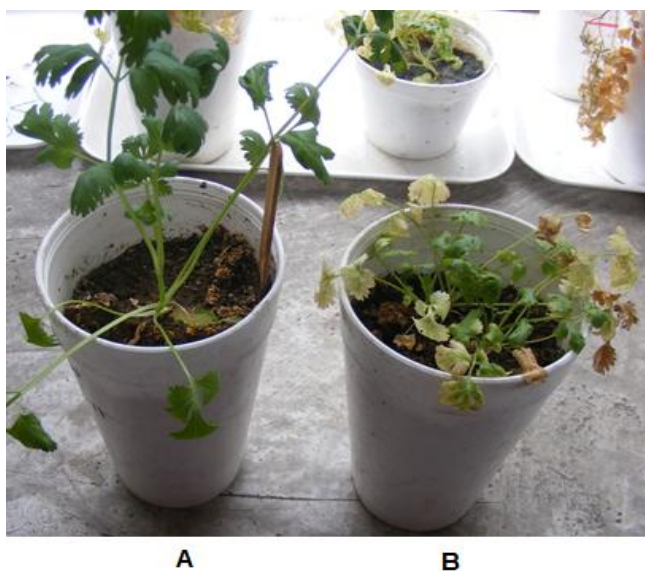


Figura 38. Comparación del testigo (A) con los síntomas de una planta infectada (B) note el achaparramiento y coloración de hojas. Plantas con 2 meses de edad, inoculada con *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*.

En las colectas se encontró otro síntoma que consiste en manchas cloróticas, el cual se presume es transmitidos por *Hyadaphis coriandri* (Koike, 2006), este síntoma no daña a la calidad comercial de la planta (Fig. 39). Al hacer las pruebas de transmisión no se logro transmitir con *Myzus persicae*, ni *Macrosiphum euphorbiae*.



Figura 39. Síntoma de Manchas cloróticas que no logro trasmitirse con *Myzus persicae*, ni *Macrosiphum euphorbiae*.

4.4. Periodos de incubación

Los periodos para la aparición de síntomas variaron en rangos de 9 a 15 días de incubación, presentándose más rápidamente la necrosis de nervaduras, seguida de nervaduras amarillentas y finalmente por mosaicos, moteados y enrojecimientos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Periodos de incubación presentados para los diferentes síntomas.

Síntoma	Liberación de pulgones	Aparición de síntomas	Periodo de incubación (días)
Necrosis de nervaduras	30-03-11	07-04-11	9
	06-04-11	13-04-11	8
Nervaduras amarillas	26-04-11	06-05-11	12
	10-05-11	23-05-11	13
	14-05-11	25-05-11	12
	26-05-11	06-06-11	12
	30-05-11	06-06-11	12
Mosaicos, moteados y enrollamientos	30-03-11	12-04-11	14
	11-05-11	26-05-11	15

4.5. Afidos transmisores

Solo *Macrosiphun euphorbiae* y *Myzus persicae* sobrevivieron a las condiciones ambientales del invernadero. Las pruebas revelaron lo siguiente:

Macrosiphun euphorbiae: al colocar este áfido sobre una planta con síntomas de necrosis venal y luego sobre plantas sanas se reprodujo el síntoma en diferentes ensayos, de igual manera al hacerlo sobre plantas con nervaduras amarillas (Fig. 34 y 36). Por otro lado, al colocar este áfido junto con *Myzus persicae* sobre plantas con síntomas de mosaicos, moteados y enrollamientos y luego colocarlos sobre plantas sanas, se reprodujeron los síntomas con mayor intensidad, provocando mayor severidad en daños (Fig. 38)

Myzus persicae: al colocar este pulgón sobre plantas con necrosis de nervaduras y por separado sobre plantas con nervaduras amarillas y posteriormente sobre plantas sanas, se reprodujo el síntoma de necrosis pero no el de nervaduras amarillas; sin embargo, al colocarlo sobre plantas con mosaicos, moteados y enrollamientos, y luego en plantas sanas, se reprodujeron los mismos síntomas, pero al colocarse junto con *Macrosiphun euphorbiae*, los síntomas fueron más marcados (Fig. 38).

Por otro lado, se intentaron hacer ensayos con *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Fig. 40); sin embargo, en todos los casos se murieron los pulgones. La importancia de este pulgón radica en que se encontró en todos los sitios de muestreo, en la raíz de las plantas, las cuales tenían síntomas de mosaicos, moteados, clorosis y hojas moradas. Se cree que no se adaptó a las condiciones del ensayo debido a que como lo menciona Catindig et al., (2009), este pulgón requiere baja humedad y suelos bien drenados. Se observó que si este pulgón se encuentra expuesto a altas humedades es atacado por un hongo entomopatógeno de manera natural; además Rawlings, (2003) y Tsai y Liu (1998), mencionan que el promedio de temperatura para que la hembra tenga mayor longevidad es 10 ° C (29,73 ± 1,19 días), y la duración más

corta se produce a los 30 ° C ($9,42 \pm 0,61$ días), lo cual no se logro en el invernadero de virus, ya que las temperaturas sobrepasaron durante el dia los 35° C y de noche llegaron a los 5° C en varias ocasiones.

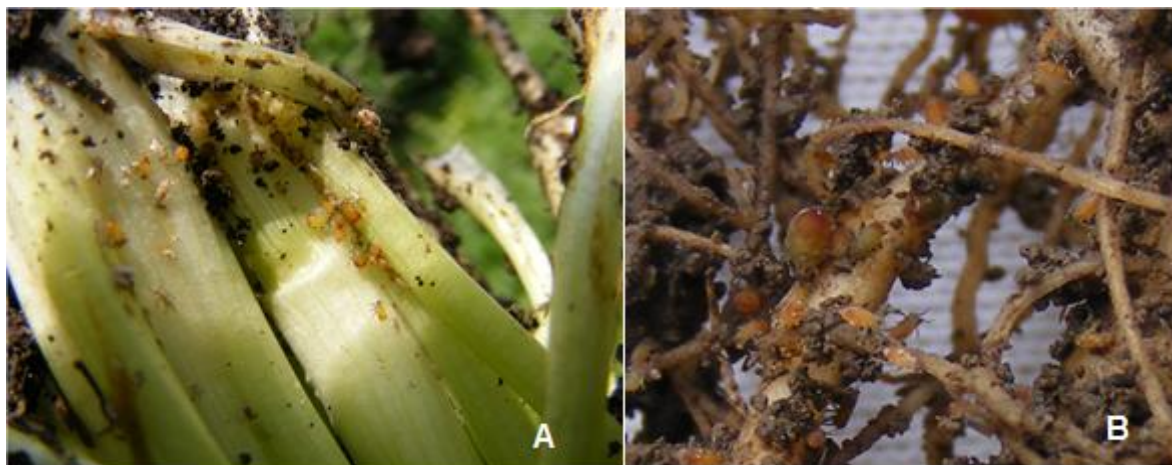


Figura 40. Áfidos de la especie *Rhopalosiphun rufiabdominalis*, encontrados en cuello (A) y raíces (B) de plantas enfermas con “amarillamiento o fuego”.

4.6. Posibles virus relacionados con la enfermedad en base a vectores encontrados

Diversos autores (cuadro 15) reportan a 16 especies de virus atacando Umbelíferas, y 15 de ellos, podrían estar siendo transmitidos (*Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*).

Con la prueba de transmisión mecánica realizada para virus (ver capítulo 3) en la cual se comprobó que la enfermedad (amarillamiento o fuego) no es transmisible mecánicamente, se pueden descartar a todos aquellos virus que se transmiten de manera no persistentes.

Por otro lado, el ICTV, (2011), reportó al *Tomato spot wilt virus* (TSWV) y el *Celery yellow spot virus* (CeYSV), como no infectivos para cilantro. El que el único *Tospovirus* reportado en plantas Umbelíferas (TSWV), no ataca a cilantro, por lo cual se descarto a los trips como transmisores de algún agente patógeno aislado del “amarillamiento o fuego”, esto aunado a no haberse encontrado en todas las parcelas colectadas, con presencia de la enfermedad.

Cuadro 15. Virus reportados en umbelíferas, transmitidos por los áfidos, sus agentes y mecanismos de transmisión.

Agentes de transmisión	Virus	Familia	Fuente	Se transmite mecánicamente	Tipo de transmisión
<i>Myzus persicae</i> <i>Cavariella aegopodii</i>	Carrot thin leaf virus (CTLV)	Potyviridae	b, c, d, e	Si	NP
<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis fabae</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus certus</i> , <i>Myzus humuli</i> , <i>Rhopalosiphum insertum</i>	Carrot virus Y (CVY)	Potyviridae	E	Si	NP
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Cavariella aegopodii</i> , <i>Myzus persicae</i>	Carrot mosaic virus (CtMV).	Potyvirus	a, c, e	Si	NP
<i>Aphis apigraveolens</i> , <i>A. api</i> , <i>A. fabae</i> , <i>A. gossypii</i> , <i>A. middletonii</i> , <i>Cavariella capreae</i> , <i>Myzus persicae</i> , y otras 13 especies.	Celery mosaic virus (CeMV)	Potyvirus	b, d, e	Si	NP
<i>Hyadaphis foeniculi</i>	Celery yellow spot virus (CeYSV)	Luteovirus	a, d, c	No	P
<i>Myzus persicae</i>	Celery yellow mosaic virus (CeYMV)	Potyvirus	e	Si	NP
<i>Cavariella aegopodii</i> , <i>C. theobaldi</i> , <i>Myzus persicae</i>	Parsnip mosaic virus (ParMV)	Potyvirus: Potyviridae	p	Si	NP
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphis spiraeicola</i> , <i>Myzus persicae</i>	Parsley green mottle virus	Potyvirus	e	Si	NP
<i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis gossypii</i>	Arracacha Y virus (AVY)	Potyvirus: Potyviridae	e	Si	NP
<i>Hydaphis foeniculi</i> , <i>Myzus persicae</i>	Coriander feathery red vein virus (CFRVV)	<i>Rhabdoviridae</i>	s	Si	P
<i>Hyadaphis coriandri</i> , y <i>H. foeniculi</i> , <i>semilla</i>	Cilantro yellow blotch	<i>Closterovirus</i> ?	T, x	No	SP
<i>Myzus persicae</i>	Primula mosaic virus (PrMV)	<i>Potyviridae</i>	u	Si	NP
<i>Aulacorthum solani</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus persicae</i>	Clover yellow vein virus (CIYVV)	<i>Potivirus</i>	v	Si	NP

Agentes de transmisión	Virus	Familia	Fuente	Se transmite mecánicamente	Tipo de transmisión
Semilla, <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphis craccivora</i> and <i>Myzus persicae</i> , y más de 60 especies.	Cucumber mosaic virus (CMV)	Cucumovirus: Bromoviridae	b, c, d, e	Si	P
<i>Myzus persicae</i> y 13 pulgones más. Injerto, semilla y polen.	Alfalfa mosaic virus (AMV)	Alfavirus: Bromoviridae	b, e	Si	NP
<i>Aphis craccivora</i> , <i>A. gossypii</i> , <i>Acyrtosiphon</i> (<i>Aulacorthum</i>) <i>solani</i> , <i>Brachycaudus helichrysi</i> , <i>Brevicoryne brassicae</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus</i> (<i>Sciamyzus</i>) <i>ascalonicus</i> , <i>M. ornatus</i> , <i>M. persicae</i> , <i>Myzus</i> (<i>Phorodon</i>) <i>humuli</i> .	Beet western yellows virus (BWYV)	Polerovirus	r	No	P
<i>Thrips tabaci</i> , <i>T. setosus</i> , <i>T. parvi</i> , <i>Frankliniella schultzei</i> , <i>F. occidentalis</i> , <i>F. fusca</i> and <i>Scirtothrips dorsalis</i> , injerto	Tomato spot wilt virus (TSWV)	Tospovirus	d, e	Si	P
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphis craccivora</i> , <i>A. faba</i> , <i>A. nasturtii</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>M. solanifolii</i> , <i>M. persicae</i>	Bean wilt virus (BWV)	Fabavirus	c, p	Si	NP

P: persistente, NP: no persistente S: semipersistente

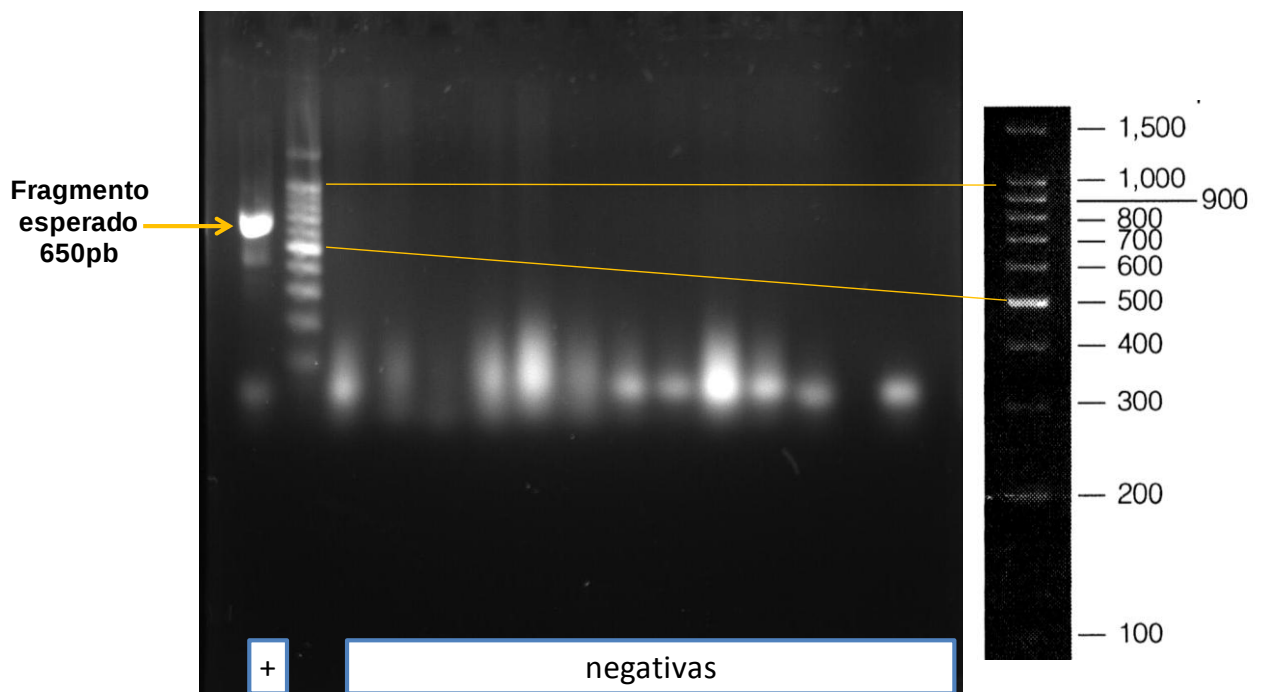
Autores citados: a, Smith, (1972); b, Sutic *et al.*, (1999); c, Font *et al.*, (1999); d, Rubatzky, *et al.*, (1999); e, Davis and Raid, (2002); p, Brown and Hull, (1973); q, Duffus, (1965); r, Casper,(1988); t, Koike,(2006); u, Edwardson and Chrystie,(1991); v, Abu-Samah and Randles,(1983) y x, Observaciones propias.

Por lo que se sospecho de miembros de la familia *Luteoviridae*, debido a que de los virus reportados, solo los miembros de esta familia se transmiten de manera persistente por áfidos.

5. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

- ⇒ Se identificó a los trips; *Frankliniella occidentalis*, chicharritas; *Empoasca* sp., *Spangbergiella* sp., *Draeculacephala* sp. y *Oncometopia* sp. psíidos; *Bactericera cockerelli*. y a 7 especies de pulgones *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Hyadaphis coriandri*, *Therioaphis trifolii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon* sp., *Semiaphis heraclei*, *Brevicoryne brassicae*.
- ⇒ Al hacer la integración de la información y las especies de insectos encontradas, se determinó que los vectores involucrados con la enfermedad son solo los pulgones *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, y *Macrosiphum euphorbiae*.
- ⇒ Se encontró que al menos uno de los patógenos involucrados se transmite de manera persistente por los pulgones.
- ⇒ Se reprodujeron todos los síntomas del “amarillamiento o fuego” al hacer las pruebas de transmisión por *Myzus persicae*, y *Macrosiphum euphorbiae*; sin embargo, el síntoma de nervaduras amarillas solo se transmitió por *M. euphorbiae*, mientras que el síntoma de enrojecimientos solo por *Myzus persicae*.
- ⇒ Tanto *Myzus persicae* como *Macrosiphum euphorbiae* fueron incapaces de transmitir el agente causal del síntoma de manchas cloróticas.

Capítulo III. Patógenos vasculares involucrados con la enfermedad



Son 34 los virus reportados en umbelíferas, y 30 los reportados en cilantro (ICTV, 2011)

CAPITULO 3. Patógenos vasculares involucrados con la enfermedad

I. INTRODUCCIÓN

En general se le considera patógenos vasculares a virus, viroides, virus satélites, bacterias limitadas a floema, espiroplasmas y fitoplasmas. Los cuales provocan síntomas que van desde clorosis, achaparramientos, deformaciones, coloraciones rojizas, mosaicos, moteados, necrosis, entre otros.

El cilantro se reporta susceptible a 30 virus de diferentes géneros (ICTV, 2011). En relación a fitoplasmas, no existen reportes de este tipo de patógenos atacando al cultivo; pero Rubatzky, et al. (1999) mencionó al Stolbur y BLTVA infectando a plantas de la familia Umbeliferae a la cual pertenece al cilantro. En el caso de bacterias limitadas a floema, tampoco se tienen reportes en cilantro, sin embargo, reciente Munyaneza et al., (2010) indico la existencia de psilidos transmitiendo *Candidatus. Liberibacter solanacearum*, a plantas de zanahoria (especie emparentada con el cilantro).

La presencia de especies de áfidos (cuadro 13) y del psilido (*Bactericera cockerelli*) en las parcelas con problemas y el que *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* logaran, después de la prueba de transmisión, ocasionar síntomas relacionados a la enfermedad, justifica el realizar pruebas de diagnostico para determinar que virus están presentes en plantas con “Amarillamiento o fuego del cilantro” y si existen bacterias limitadas a floema asociadas a la enfermedad.

II. OBJETIVOS

- ⇒ Determinar mediante transmisión mecánica y PCR la presencia o ausencia de virus en plantas con “Amarillamiento o Fuego del Cilantro”, para encaminar estrategias de control.
- ⇒ Determinar mediante PCR la presencia o ausencia de bacterias limitadas a floema en plantas enfermas, para deslindar la transmisión por psilidos presentes en parcelas con problemas.

⇒ Corroborar mediante PCR que los áfidos utilizados como vectores, se encuentran transmitiendo virus, para poder determinar medidas de control.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Pruebas de diagnostico

Para el diagnostico de virus se usó, inoculación mecánica, transmisión por vectores (capítulo 2) y PCR en punto final, para bacterias limitadas a floema diagnóstico molecular usando PCR punto final.

3.1.1. Inoculación mecánica

La transmisión mecánica se realizó utilizando una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, en la cual se maceraron las hojas con los diferentes síntomas en un mortero; se procedió a colocar Carborundum en las hojas y con un cotonete se tomó savia y se frotó sobre dos de las hojas de las plantas indicadoras (*S. lycopersicum*, *C. annuum*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. bentamiana*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *D. stramonium*, *C. quinoa* y *C. amaranticolor*).

Se realizaron 4 ensayos de inoculación mecánica con savia extraída de; 1) Plantas con síntomas de achaparramiento y enrojecimiento en hojas, colectadas en el municipio de Quecholac; 2) plantas con síntomas de clorosis venal y mosaico en hojas, colectadas en Tehuacán y San Salvador el Seco; 3) plantas con síntomas de amarillamiento y achaparramiento, colectadas en Palmar de bravo y Quecholac; y 4) plantas con manchas cloróticas, colectadas en San Matías Tlalancaleca.

3.1.1.1. Determinación de los posibles virus a nivel de grupo

Una vez que se obtuvieron los resultados de la transmisión mecánica, se pudieron determinar los posibles virus presentes a nivel de grupo (persistentes y no persistentes) y, en base a ellos hacer las pruebas moleculares para virus; para lo cual, se utilizó información existente sobre virus que se presentan en cilantro, y que no son los transmitidos mecánicamente.

3.3.2. Pruebas moleculares

3.3.2.1. Extracción de ácidos nucleicos totales de plantas

La extracción de los ácidos nucleicos de plantas se realizó para las 4 diferentes colectas. Se utilizaron muestras de plantas y de ácidos vectores, mediante el protocolo comercial; Plant RNA Purification Concert®, tal y como se enlista en seguida:

- 1) Se pesaron 0.1 gr de material vegetal, y se maceró en un mortero previamente congelado a -70°C hasta obtener polvo y se colocó en un microtubo de 1mL.
- 2) Al macerado se le agregaron 500 µL de solución de lisis (Plant RNA Purification), especializada para la purificación de ARN.
- 3) Se centrifugó a 13000 rpm durante dos minutos
- 4) Se recuperó el sobrenadante, se le agregaron 100 µL de cloruro de sodio 5 M y se agitó por inversión.
- 5) Se le agregaron 300 µL de cloroformo y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea.
- 6) Se centrifugó por 10 minutos a 13,000 RPM, para lograr la separación de los diferentes componentes en base a su polaridad.
- 7) Se recuperó la fase superior y se transfirió a otro tubo.
- 8) Se les agregaron 400 µL de isopropanol para su precipitación y se agitó por inversión.
- 9) Se colocaron en el congelador 10 minutos.
- 10) Se centrifugó a 13,000 RPM durante 10 minutos para la obtención de una pastilla.
- 11) Se tiró el sobrenadante y los excesos se escurrieron.
- 12) Se agregó un 1 mL de etanol frío al 70% y se dio un pulso de vortex.
- 13) Se centrifugó 5 min a 10 000 rpm.
- 14) Se pusieron a secar 15 min.
- 15) Se agregaron 100 microlitros de agua libre de nucleasas y se giró el tubo para disolver el ARN de las paredes.

3.3.2.2. Determinación de la integridad de los ácidos nucleicos

La integridad se determinó mediante electroforesis; para lo cual, se preparó un gel con agarosa al 0.8%. (0.24 gr. en 30 mL de TAE 1X). Se agregaron 3 µL de bromuro de etidio. Se colocaron 10 µL de las muestras: extractos extraídos más buffer de carga (Loading buffer) en una proporción 1:3. Se programó la cámara a 90 volts por 30 min y finalmente se visualizó el gel usando Bio Doc-IT Imaging System (UVP Inc. CA).

3.3.2.3. Reacción en Cadena de Polimerasa punto final (PCR)

Se realizaron PCR's para virus de la familia Luteoviridae y para bacterias limitadas a floema (*Xylella fastidiosa*, y *Candidatus Liberibacter solanacearum*). Los primers usados para Luteovirus fueron: PLF: 5'-ACD GAY TGY TCY GGT TTY GAC TGG-3' y PLR: 5'-TCT GAW ARA SWC GGC CCG AAS GTGA-3'; para *Candidatus Liberibacter solanacearum*: LsoF: 5'-GTC GAG CGC TTA TTT TTA ATA GGA-3' y OI2c: 5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3' y para *Xylella fastidiosa*: RST31: 5'-GCG TTA ATT TTC GAA GTG ATT CGA TTG-3' y RST33: 5'-CAC CAT TCG TAT CCC GGT G-3'

Para el caso de los virus, se realizó un primer RT-PCR con una sola muestra (CL2), en el cual amplificó el fragmento esperado para luego usarse como positivo en los siguientes RT-PCR; Sin embargo, al amplificar una banda tenue se decidió hacer un gradiente de temperatura, para así determinar la temperatura de anillamiento del protocolo.

El procedimiento para el RT-PCR fue el siguiente:

- ⇒ Se prepara la mezcla de reacción en un tubo de centrifuga o uno de PCR según el número de muestras.
- ⇒ Se colocaron 3 de µL de RNA y agua para el testigo (-) esto en cada tubo de PCR para incubar a 72 °C por 5 minutos, con el propósito de desenredar los RNA y pudieran acoplarse los primers.
- ⇒ Una vez incubados detuvo la reacción y se les colocaron 47 µL de la mezcla de reacción en cada tubo de PCR.

- ⇒ Se colocaron en el termociclador y se llevo a cabo la reacción según el programa de corrida.
- ⇒ La PCR se realizó con Buffer 1X, MgCl 1.5 mM, dntps 200μM, primer PLR y PLF a 10 picom/μl, 2 U/ μlTaq polimerasa, la reacción se completó con agua libre de nucleasas a 50 μl.

El procedimiento para PCR convencional fue el mismo con la variante de no llevarse a cabo la fase de incubación de las muestras (para la creación de cDNA) y el uso de diferentes primers. La concentración de reactivos utilizados fue la misma. El volumen de reacción fue de 50 μl.

Los programas de corrida usados fueron los siguientes:

Para la RT-PCR de Luteovirus, el programa térmico consistió de 1 ciclo a 70°C, 5min; 1 ciclo a 42°C, 60 min; 1 ciclo a 95 °C, 3min; 39 ciclos a 95 °C, 0.5 min; 39 ciclos a 50 °C, 0.5 min; 39 ciclos a 72 °C, 1.12 min; y 1 ciclo a 72 °C, 5 min, con una duración de 3.2 horas.

Para PCR de *X. fastidiosa* el programa térmico consistió de 1 ciclo a 95 °C, 3 min; 39 ciclos a 95 °C, 0.5 min; 39 ciclos a 60.2 °C, 0.5 min; 39 ciclos a 72 °C, 0.8 min; y 1 ciclo a 72 °C, 5 min, con una duración de 1.59 horas.

Para PCR de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, el programa térmico consistió de 1 ciclo a 95 °C, 3 min; 39 ciclos a 95 °C, 0.3 min; 39 ciclos a 63.9 °C, 0.3 min; 39 ciclos a 72 °C, 1.12 min; y 1 ciclo a 72 °C, 5 min, con una duración de 2.06 horas.

Los fragmentos esperados fueron de 1050 pb para virus, 750pb para *X. fastidiosa* y 1163 pb para *C. L. solanacearum*.

3.3.3. Secuenciacion y determinación de los posibles virus presentes

Los fragmentos que se amplificaron por PCR para Luteovirus, se secuenciaron en el area de Sanidad de Semillas del Instituto de Genetica del Colegio de Posgraduados en Montecillos Edo. De México. Por otro lado para determinar el resto de los posibles virus involucrados en la enfermedad del “amarillamiento o fuego del cilantro”, se

procedió a realizar un cuadro en el cual se señaló, que virus se transmitieron mecánicamente y cuales fueron aquellos posiblemente transmitidos por los afidos colectados e identificados en las muestras. De esta manera se pudieron descartar muchos de ellos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas de diagnostico

4.1.1. Inoculación mecánica

De las 4 pruebas de transmisión mecánica solo una de ellas dio positiva en cilantro y *N. clevelandi* (Fig. 41) a partir de una planta con síntomas de enrojecimiento en hojas, colectada en Quecholac (Cuadro 16). Los síntomas que se presentaron fueron moteados en hoja; sin embargo, plantas con el mismo síntoma, provenientes de otro sitio de colecta dieron negativo a transmisión mecánica, por lo cual se dedujo que en el primer caso se encontraba presente algún virus no relacionado con la enfermedad en estudio. Para los demás síntomas, todas las pruebas dieron negativas en las dos repeticiones.

Cuadro 16. Resultados de la prueba de inoculación mecánica de diferentes colectas de plantas con síntomas de “amarillamiento o fuego del cilantro”.

Origen de las muestras	Síntomas en plantas colectadas	Resultados de la prueba	Síntomas en plantas diferenciales
Quecholac	achaparramiento y enrojecimiento en hojas	Positiva	Cilantro: moteado en hojas (Fig. 41) <i>N. clevelandi</i> : moteado en hojas (Fig. 41)
Tehuacán y San Salvador el Seco	clorosis venal y mosaico en hojas	Negativa	Ninguno
Palmar de bravo y Quecholac	amarillamiento , enrojecimiento y achaparramiento	Negativa	Ninguno
San Matías Tlalancaleca	manchas cloróticas	Negativa	Ninguno

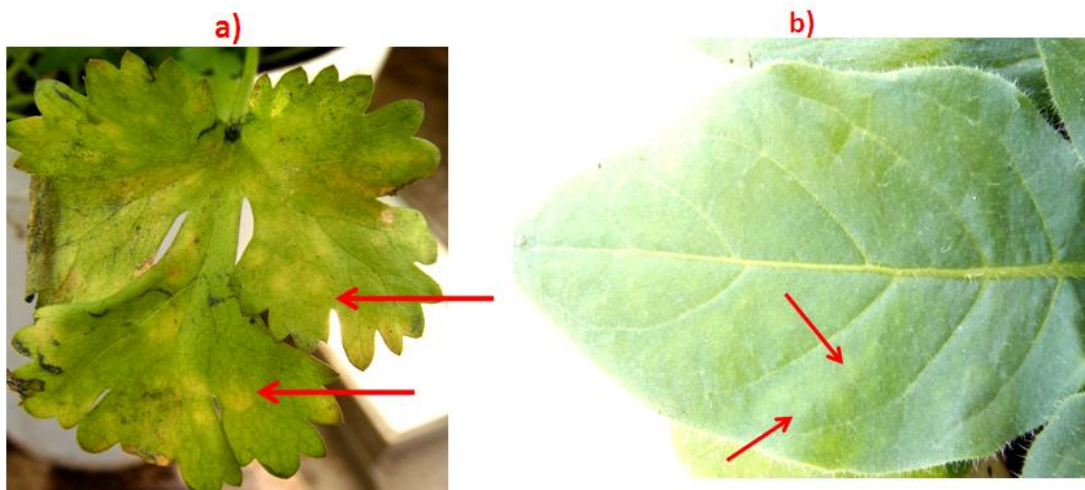


Figura 41. Síntomas en plantas del primer ensayo de inoculación mecánica. a) Moteado en hojas de cilantro inoculado mecánicamente, b) moteado en hojas de *N. clevelandii* inoculada mecánicamente.

4.3. Determinación de posibles virus a nivel de grupo

De la búsqueda resultante se encontró que son 30 los virus que atacan al cilantro de acuerdo con varios autores (cuadro 17) de los cuales 23 se transmiten por inoculación mecánica (Cuadro 17) y son abundantemente de los géneros potyvirus y nepovirus, y son solo 7 aquellos que no se transmiten mecánicamente (Cuadro 18). Tomando en cuenta estos hallazgos (Cuadro 17 y 18), y las pruebas de inoculación realizadas, se pudo intuir que los virus involucrados con la enfermedad son virus que se transmiten por áfidos de manera persistente y se pudieron descartar al primer grupo de virus que se transmiten mecánicamente, esto con base Astier et al., (2006), quien menciona que los virus circulativos están más frecuentemente ligados al floema, y no se transmiten mecánicamente; sin embargo, tomando en cuenta que existen virus que pudieron no transmitirse o no generar síntomas en las plantas diferenciales, ya sea por una inoculación fallida o por las condiciones ambientales posteriores a la inoculación, como lo reporta, Urias y Vlenzuela, (1992), quienes señalan que en muchos casos la sintomatología nos es proporcional al daño causado, como en el caso del *Potato X virus*, el cual llega a ocasionar disminuciones en la producción hasta de un 10% en plantas de papa, que nos manifiestan

síntomas, a la hora de definir el o los posibles virus relacionado(s) se tomo en cuenta, a lo vectores encontrados e identificados (ver el capítulo 2).

Cuadro 17. Virus que se transmiten mecánicamente, reportados en cilantro.

No	Virus	Grupo	Fuente
1	<i>Carrot mottle mimic virus</i>	Umbravirus	f
2	<i>Carrot mottle virus</i>	Umbravirus	a, b, c, d, e
3	<i>Carrot thin leaf virus</i>	Potyvirus	b, c, d, e
4	<i>Carrot yellow leaf virus</i>	Closterovirus	c, e, i
5	<i>Celery latent virus</i>	Potyvirus	b, d, e
6	<i>Celery mosaic virus</i>	Potyvirus	b, d, e
7	<i>Celery yellow mosaic virus</i>	Potyvirus	e
8	<i>Coriander feathery red vein virus</i>	Nucleorhabdovirus	s
9	<i>Parsnip leaf curl virus</i>	?	e
10	<i>Parsnip mosaic virus</i>	Potyvirus	p
11	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>	Sequivirus	b,e
12	<i>Arracacha A virus</i>	Nepovirus	e
13	<i>Arracacha B virus</i>	Nepovirus	m
14	<i>Heracleun latent virus</i>	Trichovirus	i
15	<i>Primula mosaic virus</i>	Potyvirus	u
16	<i>Clover yellow vein virus</i>	Potyvirus	v
17	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	Alfamovirus	b,e
18	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Cucumovirus	b, c, d, e
19	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	Nepovirus	w
20	<i>Tobacco rattle virus</i>	Tobravirus	e
21	<i>Tomato black ring virus</i>	Nepovirus	d,e
22	<i>Tulip X virus</i>	Potexvirus	e
23	<i>Watermelon mosaic 2 virus</i>	Potyvirus	e

a, Smith, (1972); b, Sutic *et al.*, (1999); c, Font *et al.*, (1999); d, Rubatzky, *et al.*, (1999); e, Davis and Raid, (2002); f, Gibbs, (1991); i, Bem and Murant, (1979); m, Atkey and Brunt, (1982); p, Brown and Hull, (1973); s, Misari and Sylvester, (1983); u, Edwardson and Chrystie, (1991); v, Abu-Samah and Randles, (1983) y w, Allen *et al.*, (1970).

Cuadro 18. Virus reportados en cilantro que no se transmiten mecánicamente.

No	Virus	Taxón	Referencia
1	<i>Carrot red leaf virus</i>	Luteoviridae	a, b, c, d, e
2	<i>Celery ringspot virus</i>	?	b
3	<i>Coriander mottley yellow mosaic virus</i>	?	z
4	<i>Celery T virus</i>	Rhabdovirus	j
5	<i>Coriander yellow spot virus</i>	Closterovirus ?	t, x
6	<i>Anthriscus yellows virus</i>	Waikavirus	o
7	<i>Beet curly top virus</i>	Curtovirus	e

a, Smith, (1972); b, Sutic et al., (1999); c, Font et al., (1999); d, Rubatzky, et al., (1999); e, Davis and Raid, (2002); j, D'Agostino et al., (1992); o, Elnager and Murant, (1976); t, Koike, (2006); x, Observaciones propias y z, FDA, (1995).

Por otro lado, hay virus que atacan a otras plantas de la familia umbelífera y que pudieran estar provocando con la enfermedad, por lo cual, también se elaboro un cuadro con estos virus (Cuadro 19).

De los virus que atacan a otras plantas de la misma familia del cilantro se encontraron 14 (Cuadro 19), pero la característica que se buscó en este caso en específico, fue que no se transmitieran mecánicamente. Los géneros que se encontraron fueron muy variables, pero al tomar en cuenta los síntomas provocado por los distintos virus, se llegó a que la pruebas moleculares se deberían hacer para las familias Luteoviridae y Closteroviridae. Cabe destacar que la ICTVdb (The Universal Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses) menciona que el cilantro no es susceptible al *Celery yellow spot virus* y al *Tomato spot wilt virus*, dos virus de gran importancia en la familia umbelífera.

Cuadro 19. Virus reportados en umbelíferas que no se transmiten mecánicamente.

No	Virus	Taxón	Referencia
1	<i>Carrot red leaf virus</i> (CRLV)	Luteoviridae	a, b, c, d, e
2	<i>Carrot latent virus</i>	Rhabdovirus	b,c
3	<i>Carrot temperate virus 1</i> (CTeV-1)	Alphacryptovirus	g
4	<i>Carrot temperate virus 2</i> (CTeV-2)	Betacryptovirus	h
5	<i>Carrot temperate virus 3</i> (CTeV-3)	Alphacryptovirus	h
6	<i>Carrot temperate virus 4</i> (CTeV-4)	Alphacryptovirus	h
7	<i>Celery T virus</i>	Rhabdovirus	j
8	<i>Celery yellow spot virus</i> (CeYSV)	Luteovirus	a, d. c
9	<i>Parsley 5 virus</i> (PaV-5)	Potexvirus: <i>Flexiviridae</i>	b, e
10	<i>Parsley virus</i> (PaV)	<i>Rhabdoviridae</i>	b, l
11	<i>Anthriscus yellows virus</i> (AYV)	<i>Waikavirus</i>	o
12	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Curtovirus: <i>Geminiviridae</i>	e
13	<i>Beet pseudoyellows virus</i> (BPYV)	Crinivirus: <i>Closteroviridae</i>	q
14	<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	Polerovirus	r

a, Smith, (1972); b, Sutic *et al.*, (1999); c, Font *et al.*, (1999); d, Rubatzky, *et al.*, (1999); e, Davis and Raid, (2002); g, Boccardo *et al.*, (1987); h, Natsuaki *et al.*, (1990); j, D'Agostino *et al.*, (1992); l, Tomlinson and Webb, (1974); o, Elnager and Murant, (1976); q, Duffus, (1965) y r, Casper, (1988).

4.3. Extracción de ácidos nucleicos totales de plantas enfermas

En total se procesaron 25 muestras de plantas (Cuadro 20), 9 muestras de áfidos, y 6 muestras de plantas a las que se les habían transmitido la enfermedad por medio de áfidos (Cuadro 21).

Cuadro 20. Muestras de plantas de las cuales se extrajeron ácidos nucleicos para las pruebas moleculares.

No	Muestra	Síntomas	Origen
1	MD	Mosaico y achaparramiento	San salvador el seco
2	MDE	Achaparramiento, moteado, enrojecimiento	San salvador el seco
3	AMD	Achaparramiento, moteado, escoba de bruja	San salvador el

4	DE	Deformación y enrojecimiento	seco San salvador el seco
5	DM1	Achaparramiento y mosaico	Quecholac
6	CVA	Clorosis venal y achaparramiento	Quecholac
7	DAM	Achaparramiento, moteado, enrojecimiento	Quecholac
8	DMA	Achaparramiento, moteado y amarillamiento	Quecholac
9	EB	Escoba de bruja	Tehuacán
10	M1	Mosaico	Quecholac
11	M2	Mosaico	Texmelucan
12	M3	Mosaico	Tehuacán
13	MA	Manchas cloróticas	Quecholac
14	CL1	Clorosis venal	Quecholac
15	CL2	Clorosis venal	Palmar de bravo
16	DCV	Achaparramiento y clorosis venal	Tehuacán
17	DM2	Achaparramiento y mosaico	Texmelucan
18	Mo1	Manchas cloróticas	Quecholac
19	Mo2	Manchas cloróticas	Palmar de bravo
20	Cv1	Clorosis venal	Texmelucan
21	Cv2	Clorosis venal	Tehuacán
22	Cv2	Clorosis venal	Tehuacán
23	F1	Achaparramiento y deformación en hojas	Palmar de bravo
24	F2	Achaparramiento y deformación en hojas	Palmar de bravo
25	DME	Achaparramiento, mosaico y enrojecimiento	Tehuacán

Cuadro 21. Muestras de pulgones y de re aislados de plantas con síntomas.

No	Muestra	Descripción
1	I	Pulgones de planta con mosaicos
2	Ialc	Pulgones en alcohol de colecta en Quecholac
3	Ip1	Pulgones de planta con mosaico y amarillamiento
4	Ip2	Pulgones de planta con venas amarillas
5	Icl	Pulgones de planta con necrosis venal
6	Icli	Pulgones de planta con venas amarillas
7	Imo1	Pulgones de planta con venas amarillas
8	Imo2	Pulgones de planta con venas amarillas
9	CII1	Pulgones de plantas con necrosis venal
10	Dei	Planta con mosaico, moteado y amarillamiento
11	Cli3	Planta con venas amarillas
12	Moi	Planta con venas amarillas
13	Moi	Planta con venas amarillas
14	Tox1	Planta con mosaico, amarillamiento y enrojecimiento
15	Tox2	Planta con mosaico, amarillamiento y enrojecimiento

4.4. Determinación de la integridad del ADN y ARN

No todas las muestras extraídas sirvieron para hacer las pruebas moleculares, ya que hubo algunas de ellas de las cuales se degradaron los ácidos nucleicos. Esto se determinó, al realizar la electroforesis con cada una de ellas. Las muestras de plantas que presentaron degradación fueron 10 (MD, MDE, AMD, DE, DM1, CVA, DAM, EB, MA, y DCV), y se mostraron como un barrido total en el gel, por lo cual ya no se tomaron en cuenta; por otro lado las muestras que no presentaron degradación se muestran en la fig. 42, donde se señalan las muestras de plantas con síntomas de los sitios de colecta y las plantas de las cuales se hizo aislamiento, es decir plantas con transmisión de la enfermedad por medio de áfidos. Las extractos de áfidos se ilustran en la fig. 43; cabe destacar que estas presentaron degradación progresiva, es decir a medida que pasaron los días presentaron mayor degradación de los ácidos nucleicos, por lo cual se hicieron dos electroforesis en diferentes fechas la primera el día 06-06-11 y la segunda a los 20 días, y en la de la segunda fecha se aprecia claramente que los ARN se degradaron como la muestra IT. Debido a ello, se procuro hacer las pruebas moleculares y después hacer un gel con los ácidos nucleicos de las muestras para descartar falsos positivos al realizar PCR.

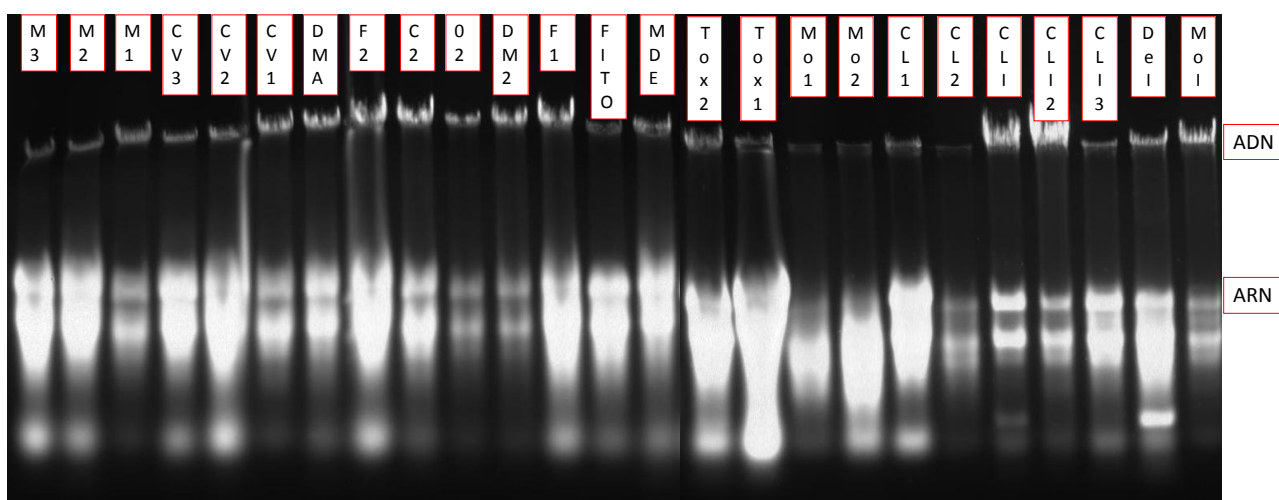


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando la integridad de los ácidos nucleicos de extractos obtenidos de las muestras de cilantro.

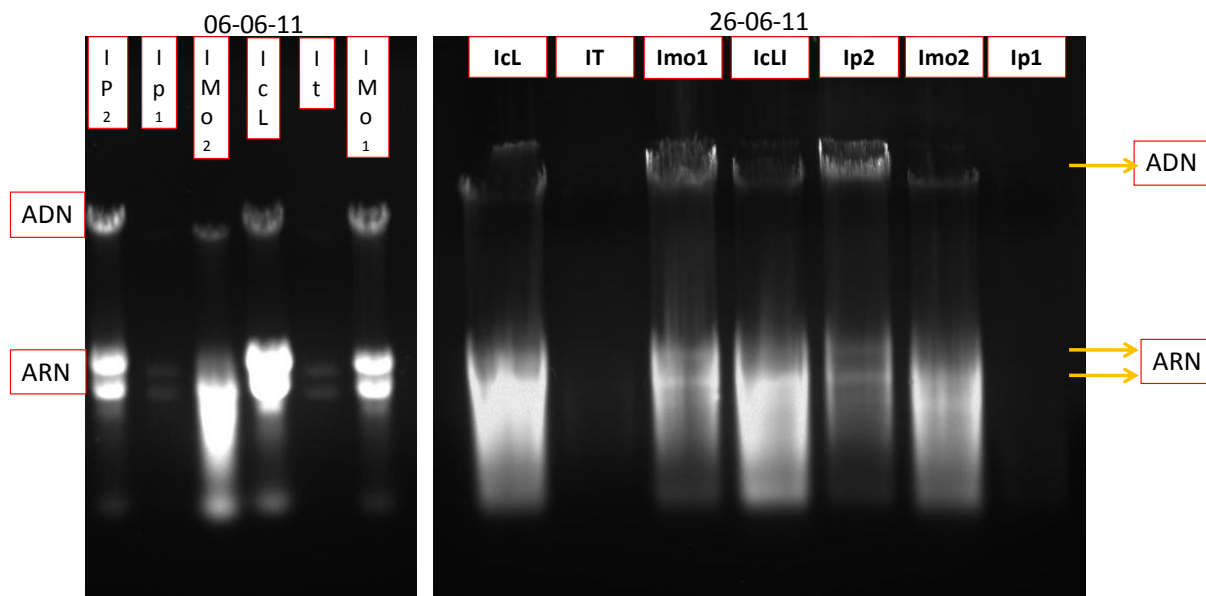


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mostrando la integridad de los ácidos nucleicos de extractos obtenidos a partir de muestras de áfidos usados como vectores de virus en cilantro. Note la degradación a los 20 días de la extracción (con fecha 26-06-11).

4.5. PCR punto final

En el caso de los virus el primer PCR se hizo con las muestras CL1 y CL2, es decir plantas con clorosis de nervaduras, y se logró amplificar un fragmento de 1050pb (Fig. 44), que era el deseado, en base a lo mencionado por Correa et al., (2005), en su caracterización de virus de esta familia utilizando los primers usados para este trabajo. Gracias a la amplificación del fragmento esperado, estas muestras pudieron tomarse como positivo para las pruebas posteriores. Además de este fragmento, se amplificó otro de aproximadamente 220 pb; esto se explica dado que los primers son de tipo degenerado, por lo cual pueden estar amplificando fragmentos inespecíficos, como se muestra en el primer grupo de muestras analizadas (muestra MDE), la cual dio negativa y amplificó este mismo fragmento de 220 pb (Fig. 46).

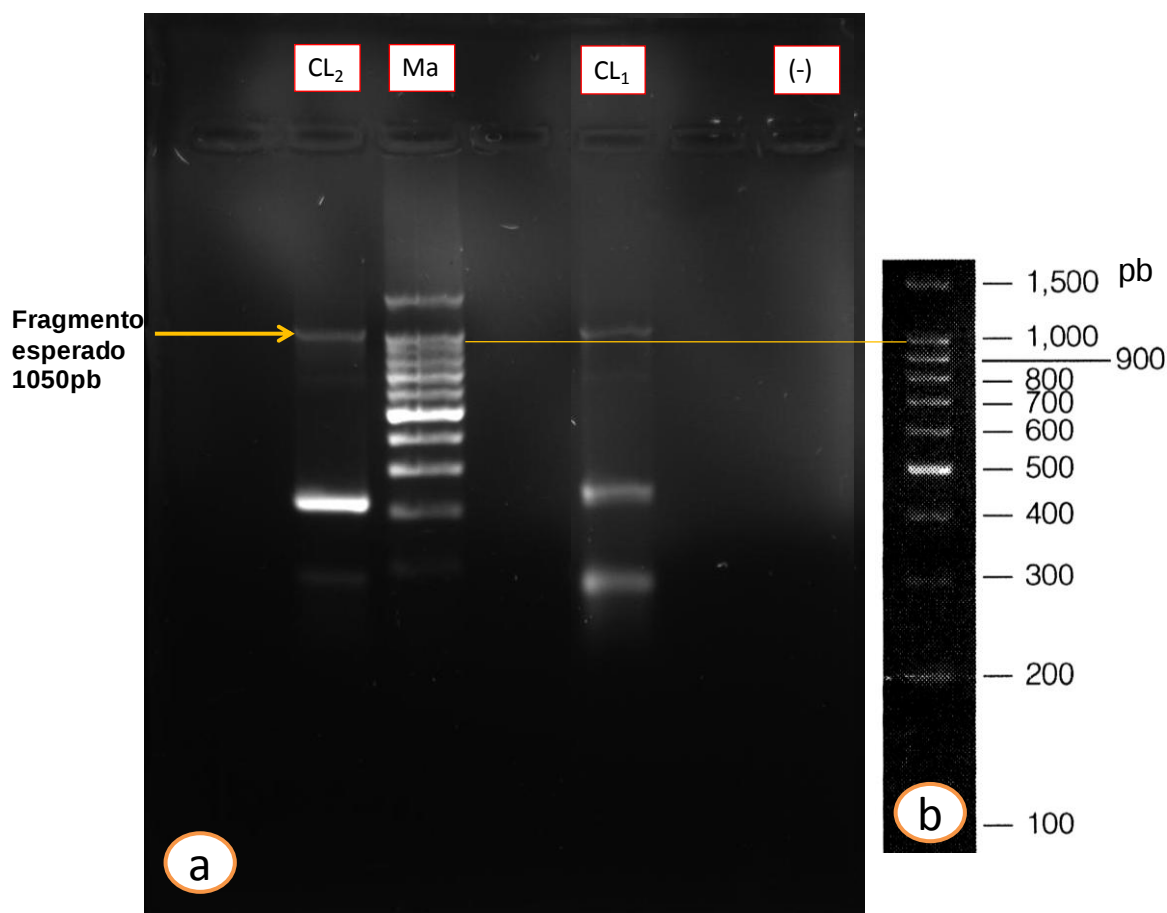


Figura 44. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos obtenidos de las muestras de cilantro CL₂ y CL₁ (clorosis de nervaduras). Ma (marcador de peso molecular). b) tabla guía del marcador de peso molecular.

El gradiente se realizó con un rango de temperatura de 50 a 65°C, tomando en cuenta lo mencionado por Promega, (2009), que mencionó que la *T_a* puede variar de -1 a -5 °C abajo de la *T_m* de los primers utilizados, en este caso fue de 65°C. Gracias al gradiente se logró determinar que 50°C era la mejor temperatura de anillamiento para este fragmento (Fig. 45) y que la banda no deseada de 220pb, se amplificaba más a 65°C y a medida que se disminuía la *T_a* esta se amplificó en menor medida.

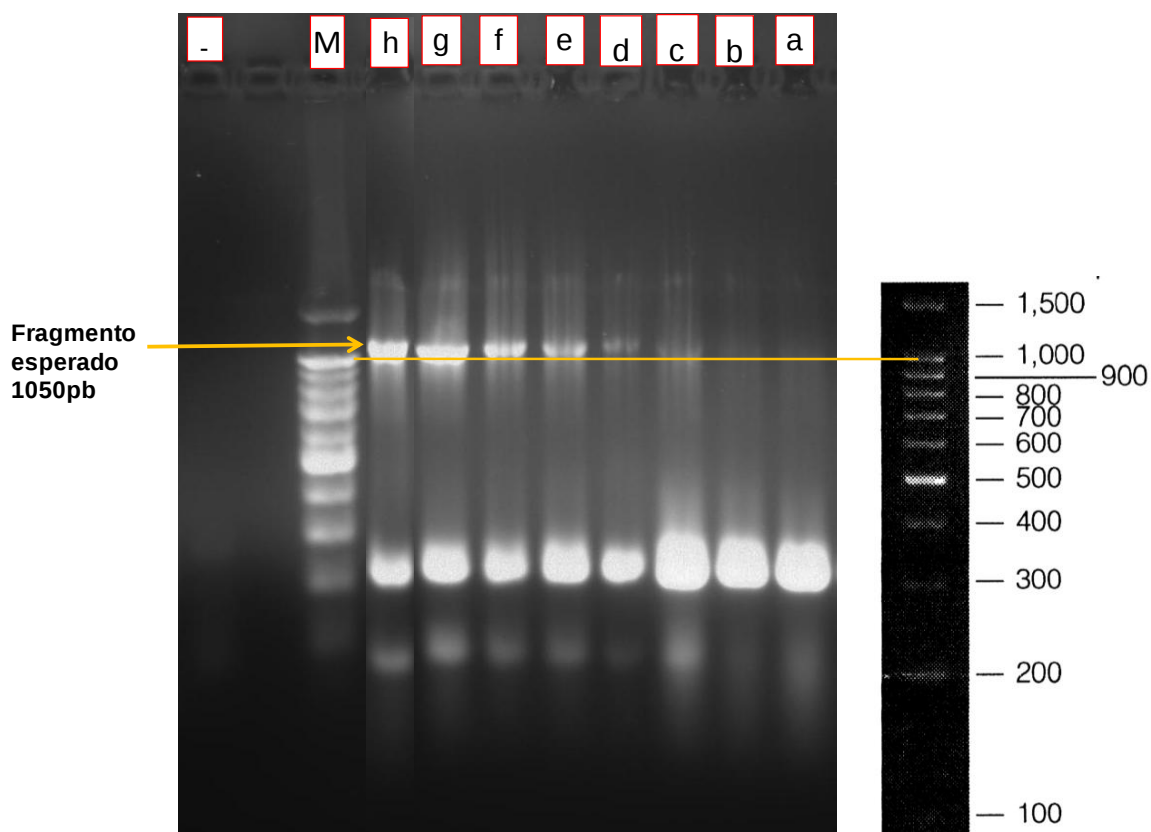


Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gradiente térmico, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos obtenido de muestras de cilantro. Carriles: a, 65°C; b, 62.84°C; c, 60.7°C; d, 58.56°C; e, 56.42°C; f, 54.28°C; g, 52.14°C; h, 50°C, M, marcador y -, un negativo.

Del primer grupo de muestras analizadas (7 muestras, Fig. 46) se observó que 6 de ellas dieron positivo para Luteoviridae, a pesar de ser de diferentes sitios de colecta, mientras que solo una de ellas MDE (moteado, achaparramiento y enrojecimiento) dio negativo.

Los resultados obtenidos de esta primera prueba indican que los síntomas de mosaicos, achaparramientos, moteados, clorosis en nervaduras y amarillamientos pueden ser provocados por virus de la Familia Luteoviridae, no así para los síntomas enrojecimientos y manchas cloróticas.

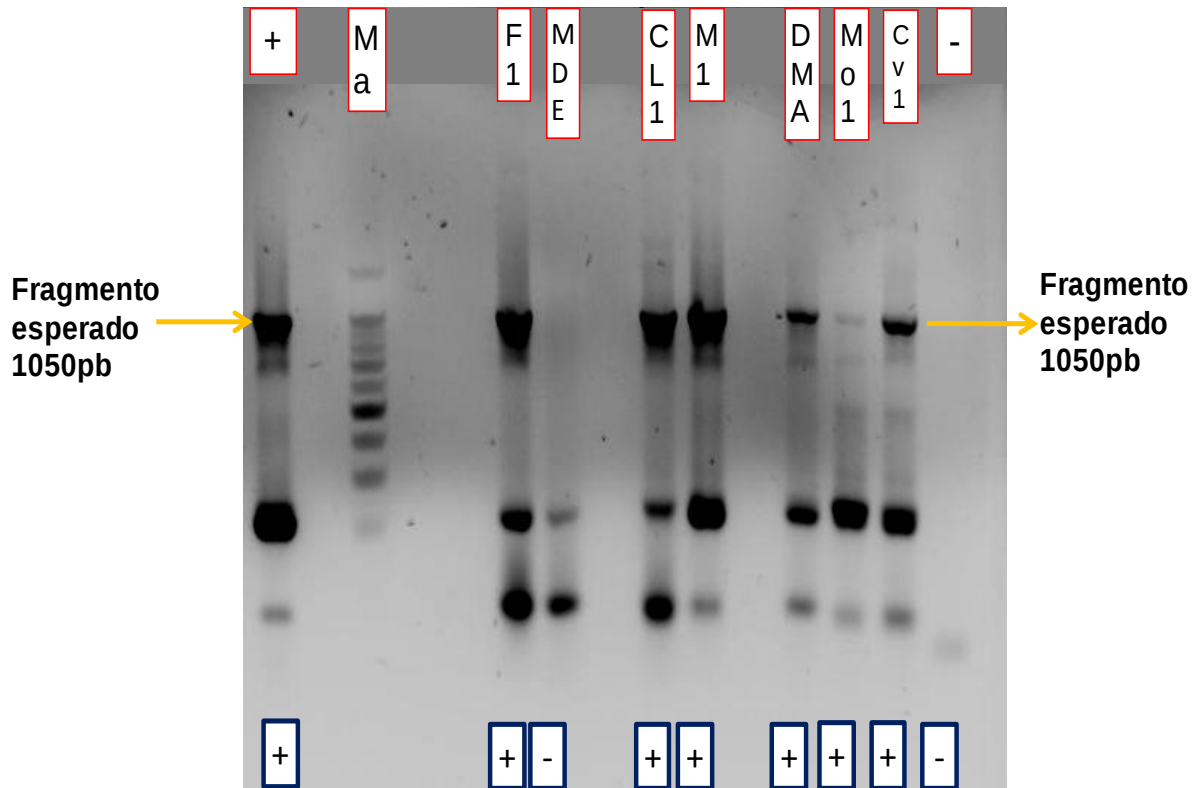


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de extractos crudos plantas con síntomas. La parte baja de la figura indica que muestras dieron positivo.

En el segundo grupo de muestras (Fig. 47); se corroboró que *Macrosiphum euphorbiae* tiene la capacidad de transmitir al síntoma de clorosis venal. En las muestras ICL1, IP1 y IP, no se amplificó ningún fragmento, debido a que el ARN se encontraba degradado (Fig. 43). Por otro lado, en las muestras con síntomas de venas amarillas y necrosis de nervaduras (CLI1, Mol) que se generaron al hacer la transmisión por *Macrosiphum euphorbiae* se amplificó el fragmento esperado para Luteoviridae (1050 pbs). No se contó con muestra de *Myzus persicae*, para realizar estas pruebas.

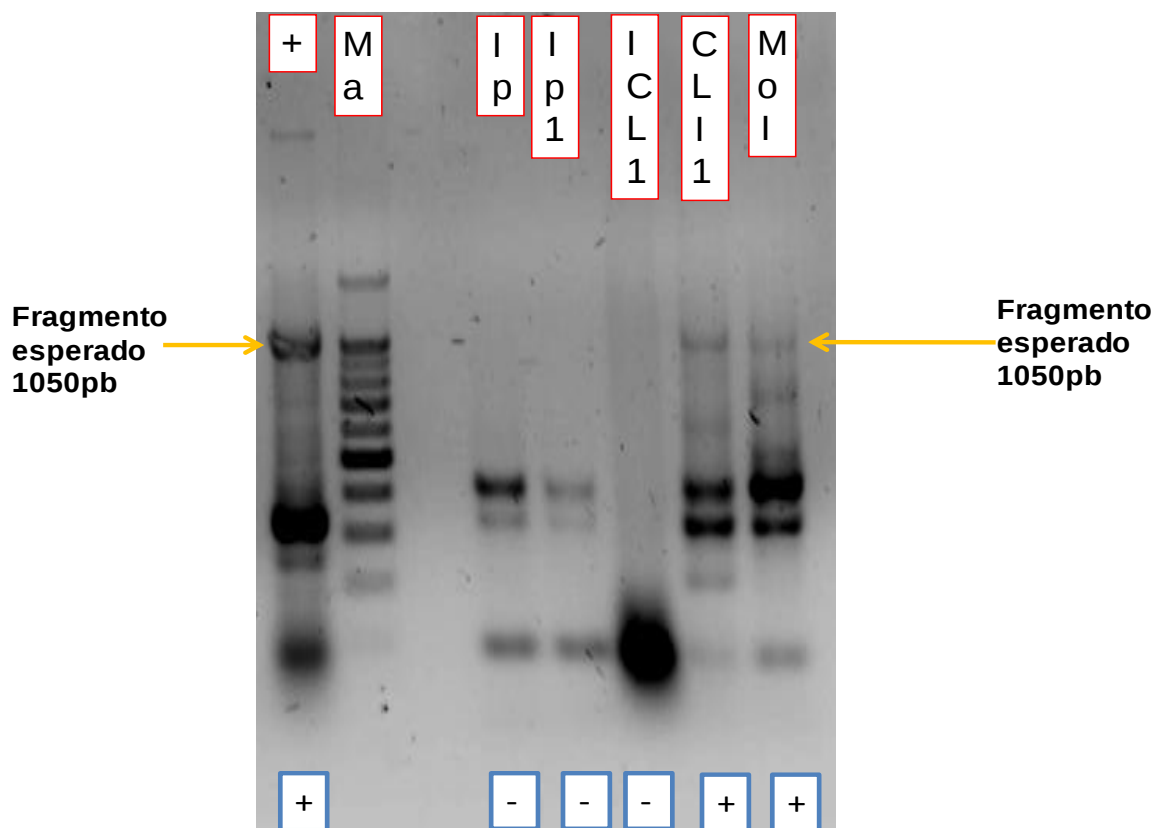


Figura 47. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR para Luteovirus del segundo grupo de muestras (extraídas de plantas con “Amarillamiento o fuego”). El + corresponde a la muestras CL1. La parte inferior de la figura muestra la interpretación de la prueba.

De las muestras analizadas para bacterias limitadas a floema, las pruebas dieron negativo a las tres especies más ampliamente conocidas a la fecha: *xylella fastidiosa* (Fig. 48) y *Candidatus liberibacter solanacearun* (Fig. 49), sin embargo, para esta última no se tuvo un control positivo.

Lo anterior, indicó que la enfermedad del “amarillamiento o fuego del cilantro”, no es provocada por este tipo de patógenos, esto aunado a que el posible vector *Bactericera cockerelli*, no se encontró en todos los sitios de muestreo con problemas de “amarillamiento o fuego del cilantro”.

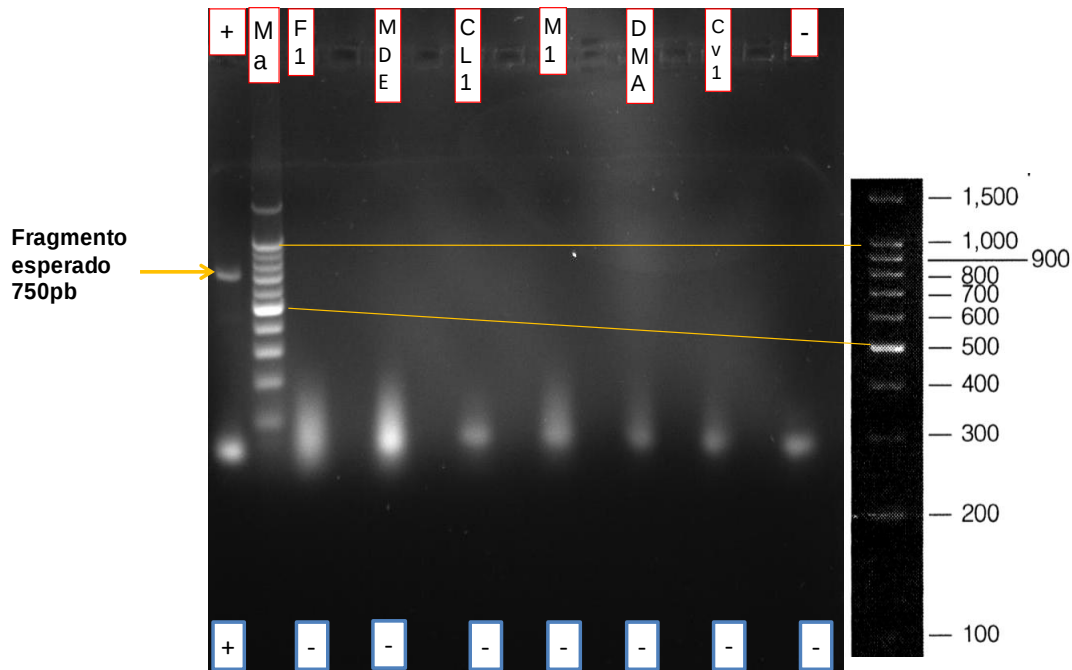


Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR a partir de muestras para *Xylella fastidiosa*. En la parte baja se indica la interpretación de la prueba.

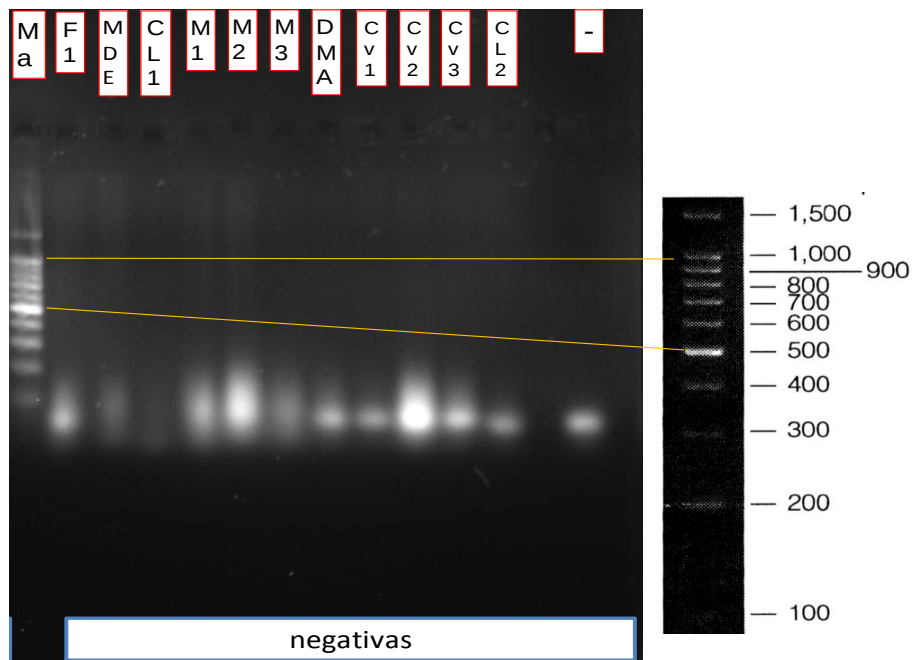


Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de gradiente térmico, mostrando los fragmentos amplificados por RT-PCR en 11 muestras probadas para *Candidatus liberibacter solanacearum*. La parte inferior de la figura indica la interpretación de la prueba.

4.6. Determinación de los posibles virus presentes

En base a todas las pruebas se puede decir que hay dos virus de los cuales se sospecha de manera más directa por ser de la familia Luteoviridae o por su vector como, es el caso de *Carrot red leaf virus* (CRLV) y *Beet western yellows virus* (BWYV), ya que ambos no se transmiten mecánicamente. El *Celery yellow spot virus* (CeYSV), es un *Luteovirus*; sin embargo, el cilantro se reporta como no susceptible a este virus según el ICTV (2011).

La secuenciación de los fragmentos de 1050pb amplificados para muestras con síntomas de mosaicos, achaparramientos, moteados, clorosis en nervaduras y amarillamientos, probadas para virus de la familia Luteoviridae, al analizarse en el Genbank, expresaron 100% de cobertura y 99% de identidad para el *Turnip yellow virus* (TuYV) lo mismo sucede al hacer el mapa de parentesco (Anexo 6) este virus fue reportado como sinónimo del *Beet western virus* (BWYV) por ICTV (2011). Debido a que, para muestras con síntomas de enrojecimientos no hubo amplificación de fragmentos para Luteovirus, se cree que pudieran estar involucrados otro tipos de virus además de ser transmitidos solo por *Myzus persicae*.

Hay otros virus para los cuales se podría tener sospechar por sus insectos vectores, sin embargo estos se transmiten mecánicamente. Algunos otros no se transmiten mecánicamente pero sus vectores o formas de transmisión no coinciden con lo encontrado en cilantro (Cuadro 22).

Cuadro 22. Virus de los que se sospecha y sus formas de transmisión.

Virus	Taxón	Transmisión	fuentes	M
<i>Carrot red leaf virus</i> (CRLV)	Luteoviridae	<i>Cavariella aegopodii</i>	a, b, c, d, e	no
<i>Carrot latent virus</i>	Rhabdovirus	<i>Semiaphis heraclei</i>	b, c	no
<i>Carrot temperate virus 1</i> (CTeV-1)	Alphacryptovirus	Semilla	g	No
<i>Carrot temperate virus 2</i> (CTeV-2)	Betacryptovirus	Injerto y semilla	h	no
<i>Carrot temperate virus 3</i> (CTeV-3)	Alphacryptovirus	Injerto y semilla	h	no
<i>Carrot temperate virus 4</i> (CTeV-4)	Alphacryptovirus	Semilla	h	no
<i>Celery T virus</i>	Rhabdovirus	<i>injerto</i>	j	no
<i>Celery yellow spot virus</i> (CeYSV)	Luteovirus	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	a, d. c	no
<i>Celery ringspot virus</i>			b	?
<i>Parsnip virus 3</i> (ParV-3)	<i>Flexiviridae</i>		k	?
<i>Parsley virus 5</i> (PaV-5)	Potexvirus: <i>Flexiviridae</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	b, e	no

Virus	Taxón	Transmisión	fuentes	M
<i>Parsley virus (PaV)</i>	<i>Rhabdoviridae</i>		b, l	no
<i>Anthriscus yellows virus (AYV)</i>	<i>Waikavirus</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	o	no
<i>Coriander yellow spot virus</i>	<i>Closterovirus ?</i>	<i>Hyadaphis coriandri</i> , y <i>H. foeniculi</i> , semilla	t, x	no
<i>Beet curly top virus (BCTV)</i>	Curtovirus: <i>Geminiviridae</i>	<i>Circulifer tenellus</i> , <i>C. opacipennis</i> , injerto,	e	no
<i>Beet pseudoyellows virus (BPYV)</i>	Crinivirus: <i>Closteroviridae</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	q	no

M: transmisión mecánica

a, Smith, (1972); b, Sutic *et al.*, (1999); c, Font *et al.*, (1999); d, Rubatzky, *et al.* (1999); e, Davis and Raid, (2002); g, Boccardo *et al.*, (1987); h, Natsuaki *et al.*, (1990); j, D'Agostino *et al.*, (1992); k, Garret and Tomlinson, (1966); l, Tomlinson and Webb, (1974); o, Elnager and Murrant, (1976); q, Duffus, (1965); r, Casper, (1988); t, Koike, (2006) y x, Observaciones propias.

V. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

- ⇒ Se amplificó por RT-PCR el fragmento reportado por Correa *et al.*, (2005) de 1050pb.
- ⇒ El fragmento fue amplificado de muestras con síntomas de mosaicos, achaparramientos, moteados, clorosis en nervaduras, y amarillamientos, pero no de los enrojecimientos y las manchas cloróticas.
- ⇒ El análisis de literatura indicó que podría tratarse de *Carrot red leaf virus* (CRLV) y/o *Beet western yellows virus* (BWYV).
- ⇒ La secuenciación del fragmento indicó que se trata de Turnip yellow virus con un 99% de cobertura y 98% de identidad.
- ⇒ El PCR para *Xylella fastidiosa*, y *Candidatus liberibacter solanacearum* resultó negativo.
- ⇒ Se sospecha que los pulgones del género *Myzus persicae* son los transmisores de otros virus que están ocasionando enrojecimientos en plantas de los cuales no se pudo determinar el agente causal.
- ⇒ No se pudo determinar el agente causal del síntoma de manchas cloróticas, pero Koike (2006) reportó que se puede tratar de un *Closterovirus*.

Capítulo IV. Hongos asociados a la enfermedad



81 de las 101 plantas de importancia económica sufren pérdidas asociadas con enfermedades provocadas por especies del género *Fusarium* (APS, 2011), uno de los hongos vasculares más importantes.

CAPITULO 4. Hongos asociados a la enfermedad

I. INTRODUCCION

Los hongos que afectan la raíz reportados en cilantro son del genero *Fusarium* Srivastava (1972); Diederichsen (1996) reportó a *F. oxysporum*; Barrales, García (2004) y Castro (2010) señalaron la presencia de *F. solani* en cilantro, mientras que McVicar *et al.* (2004); García (2007) menciona a *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*. Por su parte, Koike (2005), al igual que Kenneth (2008) y Singh (2009) se refieren a *Fusarium oxysporum f. sp. coriandrii* como forma especial del cilantro, siendo estos los primeros reportes. Otro hongo que se presenta es *Sclerotinia* (Blade, 1998). Todos pueden provocar síntomas de clorosis, o acortamiento de entrenudos (achaparramientos) de manera indirecta, debido a la obstrucción o daño de los haces vasculares de las plantas.

El cultivo del cilantro se desarrolla en sistemas abiertos y se encuentra expuesto al ataque de uno o más patógenos a la vez, es difícil saber, si los síntomas observados en una planta son el resultado de un patógeno en específico o de un complejo. Por ello es importante, hacer un diagnostico que nos apoye para determinar los posibles agentes causales de una enfermedad.

En base a lo anterior, se considera indispensable la detección de los hongos presentes en plantas con síntomas de “amarillamiento o fuego del cilantro”, ya que, pudieran estar interactuando con los virus e insectos presentes en plantas enfermas.

II. OBJETIVO

- ⇒ Aislar, purificar y realizar los postulados de Koch, para los hongos presentes en plantas con “amarillamiento o fuego del cilantro” para determinar los posibles hongos asociados con la enfermedad.
- ⇒ Identificar morfológica y molecularmente a los hongos fitopatogenos, para determinar las especies de hongos involucradas.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Colecta de material

Se realizó un muestreo dirigido sobre plantas con síntomas en municipios con presencia de la enfermedad en cuestión; San Martín Texmelucan, Quecholac, Palmar de Bravo, San Salvador el seco, y Tehuacán.

Plantas sin suelo, se colocaron en bolsas de plástico en una hielera, se transportaron al laboratorio donde se conservaron en el refrigerador, manteniéndolas a 4°C, hasta su proceso.

3.2. Aislamiento y purificación

De la raíz y cuello de la planta con, achaparramientos, amarillamientos, mosaicos, y clorosis venal; se lavó el tejido con agua destilada y se realizaron rodajas del cuello de la planta y la raíz, con una navaja estéril; se desinfectaron con hipoclorito al 1% durante un minuto, los excesos se eliminaron con agua destilada estéril, al colocarse por dos minutos en dos ocasiones; se colocaron en cámara húmeda, en cajas de Petri con papel filtro portaobjetos y agua destilada estéril; se colocaron por tres a cuatro días en incubadora a 30 °C; una vez que hubo crecimiento micelial sobre las rodajas se tomó y se colocó en medio de cultivo de papa dextrosa agar; transcurridos cuatro días se purificaron por medio de la técnica de punta de hifa.

3.3. Pruebas de patogenicidad

Se llevaron a cabo dos pruebas, una *in vitro* y la segunda en invernadero. Para descartar que los síntomas que se observaran fueran de hongos presentes en semilla, se hizo también una prueba de incidencia de hongos en ella de las siete de las variedades colectadas (Líder, Sun Master, American Pasific, Long Standing, Canadiense, Pakistan, Criollo 2).

3.4. Incidencia de hongos en semilla

Cien semillas de cada variedad se lavaron con agua destilada; se colocaron en vasos de precipitado de 50ml donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, los excesos se descartaron con dos lavados con agua destilada estéril por dos minutos; se colocaron 10 semillas en cámara húmeda, y se colocaron

en el congelador por 24h para matar al embrión de la semilla. Una vez transcurrido este lapso se colocaron a la luz y se observaron durante 10 días.

3.5. Prueba de patogenicidad *in vitro*

Los aislados se crecieron en PDA; una vez que el micelio cubrió medio de cultivo, se colocó una capa de suelo estéril y se sembraron 100 semillas de cada variedad (25 por caja), para cada aislado, es decir 400 semillas; se utilizó un testigo, donde solo se colocó el medio de cultivo, el suelo y la semilla; se humedecieron con agua destilada estéril; se incubaron a temperatura ambiente por 20 días, agregando humedad cuando hizo falta. La evaluación se realizó considerando porcentaje de incidencia de semilla ó plántulas afectadas.

3.6. Prueba de patogenicidad en invernadero

Se sembraron 400 semillas (50 por maceta) en suelo esterilizado a 15PSI; una vez germinadas se inocularon con una concentración esporas de 1×10^6 /ml; la inoculación se realizó a raíz desnuda cuando las plantas tuvieron al menos tres hojas verdaderas dejando las plantas en la solución por 30 min y se trasplantaron; se dejó un testigo tratado con agua destilada estéril; la evaluación se hizo 20 días después de la inoculación, considerando la presencia o ausencia de síntomas.

3.7. Re aislamiento

Se realizó para ambas pruebas de patogenicidad de la manera indicada para el aislamiento; una vez que se obtuvo el crecimiento puro, se realizaron montajes para comparar las estructuras, con las del hongo inoculado inicialmente.

3.8. Identificación morfológica y fisiológica

Dentro de las características morfológicas se tomaron en cuenta el tamaño, presencia de macro, microconidios y clamidosporas, así como las características de las fialides.

Para el aislamiento 2, se realizó la identificación fisiológica, debido a su parecido con dos especies, esta prueba consistió en la coloración de medio propuesta por *Nelson et al.* (1993), la cual conlleva a la identificación a nivel de especie, para esto se preparó medio pulpa de papa en tubos de ensayo, sembrándose por punta de hifa;

se incubaron a temperatura ambiente por ocho días, y se comparó la coloración generada con las de las tablas de autor.

3.9. Identificación molecular

La extracción de ADN, se llevo a cabo a partir de aislados puros crecidos en PDA, con el método de Plant RNA purification Conern® (ver procedimiento en el capítulo 4), debido a que este método extrae cantidades importantes de ácidos nucleicos de buena calidad (integridad). Para verificar la integridad de los extractos obtenidos, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Solo los ácidos nucleicos que tuvieron integridad adecuada se sometieron a la prueba de PCR, para amplificar una secuencia intergenica situada entre los genes 28 y 18s. Los primers utilizados fueron; ITS 4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' y ITS 5: 5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'. La PCR se realizó con Buffer 1X, MgCl 1.5 mM, dntps 200µM, 4 ITS 10 picom/µl, 5 ITS10 picom/µl, 2 U/ µlTaq polimerasa, la reacción se completó con agua libre de nucleasas a 50 µl.

El programa que se siguió fue: un 1 ciclo a 95°C, 5min; 30 ciclos a 95°C, 1min; 30 ciclos a 55 °C, 1min; 30 ciclos a 72 °C, 1min; y 1 ciclo final a 72 °C, 5min.

Los fragmentos amplificados por PCR, se separaron en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, para medir el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un marcador de peso de referencia de 100pb. Los fragmentos de DNA amplificados se limpiaron con el quit de limpieza de Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, de Promega, el procedimiento utilizado de muestra en el Anexo 2. La limpieza fue corroborada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las muestras se mandaron a secuencial al Laboratorio de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las secuencias obtenidas de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, se alinearon en el Genbank, mediante la herramienta BLAST, presente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Con el propósito de buscar la máxima homología en las secuencias del banco de información y se elaboró un mapa taxonómico (Anexo 3, 4 y 5).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Hongos aislados

En todos los aislamientos realizados hubo dos que se repitieron en todas las muestras de los diferentes sitios y tuvieron características similares de color y crecimiento a *Fusarium* spp Fig. 50. De acuerdo a lo descrito por Nelson *et al.* (1993). Aislado 1 y 2.

Un tercer aislado (aislado 3) se obtuvo de la prueba de hongos en semilla Fig. 50 y al igual que los dos anteriores compartió características del género *Fusarium*.



Figura 50. Aislamientos de hongos presentes en cilantro. a) aislado 1, b) aislado 2, y c) aislado 3.

4.2. Pruebas de patogenicidad

4.2.1. Incidencia de hongos en semilla

La incidencia de hongos obtenidos fue: *Alternaria* sp. con 27.1%, *Cladosporium* sp. 4.2 % y *Arthrobotrys* sp. 0.14% (Cuadro, 23) (Fig. 51) que solo se presentó en la variedad Long standig. Cerca del 70% de la semilla estuvo libre de hongos. Las variedades con mayor porcentaje de incidencia fueron Canadiense y Pakistán, y las de incidencia reducida fuerón; Sun master y A. pasific (3 y 8% respectivamente). La presencia de *Alternaria* spp. Con el porcentaje elevado lleva a problemas de germinación, como se demostró en el ensayo de transmisión de patógenos por semilla y suelo (vea capítulo 2), donde se encontraron porcentajes de germinación menores al 60%, para estas variedades. Ninguno de los hongos encontrados en semilla, generan síntomas en plantas, que se relacionen con los de los hongos de interés (*Fusarium spp*), ya que estos no se consideran hongos (Agrios, 2010) que afectan raíces y obstruyen los haces vasculares.

Cuadro 23. Incidencia de hongos en 7 variedades de cilantro, colectadas en el Estado de Puebla.

Variedad	% de Incidencia			
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Arthrobotrys</i> sp.	Sanas
Canadiense	46	8	0	52
Pakistán	67	2	0	31
A. pasific	8	0	0	92
Sun master		3	0	97
Long standing	32	5	1	62
Criollo	14	4	0	82
Líder	23	8	0	69
Promedio	27.14	4.28	0.14	69.28

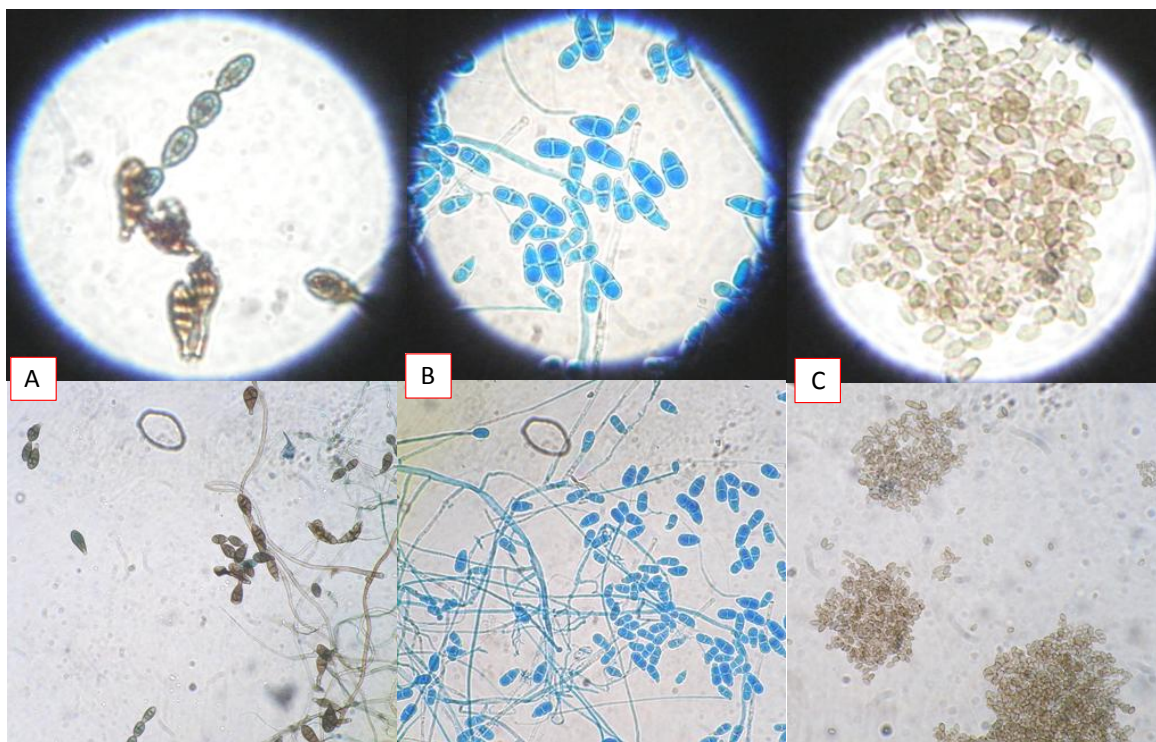


Figura 51. Osporas de hongos asociados a semilla de cilantro de las distintas variedades. A) *Alternaria* sp., B) *Arthrotrrys* sp., y C) *Cladosporium* sp.

4.2.2. Prueba de patogenicidad *in vitro*

Los tres aislados invadieron las plantulas, sin embargo aislados 1 y 3, (Fig. 52 y 54) son capaces de dañar en forma total a las plántulas en etapas tempranas, mientras que el aislado 2 afecta a las plántulas en etapas avanzadas (Fig. 53).

Los síntomas que ocasionaron los aislados 1 y 3 fueron ahogamiento en el cuello de la planta, amarillamiento y marchitez temprana, así como la colonización de la semilla antes de germinar. El aislado 2, provocó amarillamientos y un ahogamiento de plántula, una vez que esta estaba por emitir la primera hoja verdadera (Fig. 53)

Los aislados tuvieron comportamientos similares en las 7 variedades; comparado con sus testigos.

Sin embargo cerca del 30% de las plantas de la variedad canadiense presentaron problemas por *Alternaria* sp. que les impidió el desarrollo normal (ver cuadro 24).

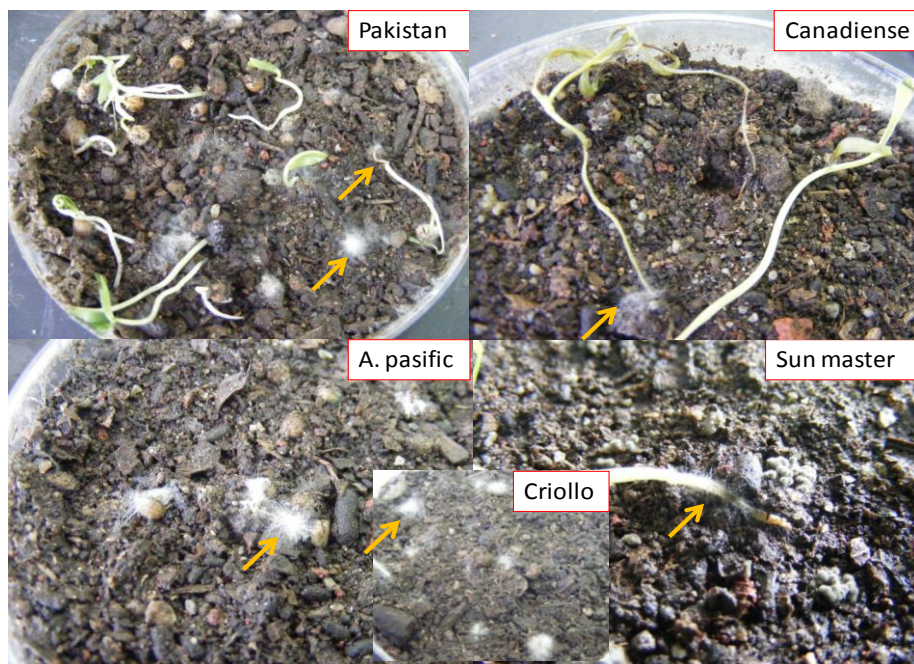


Figura 52. Plantas de cilantro atacadas por el aislado 1.

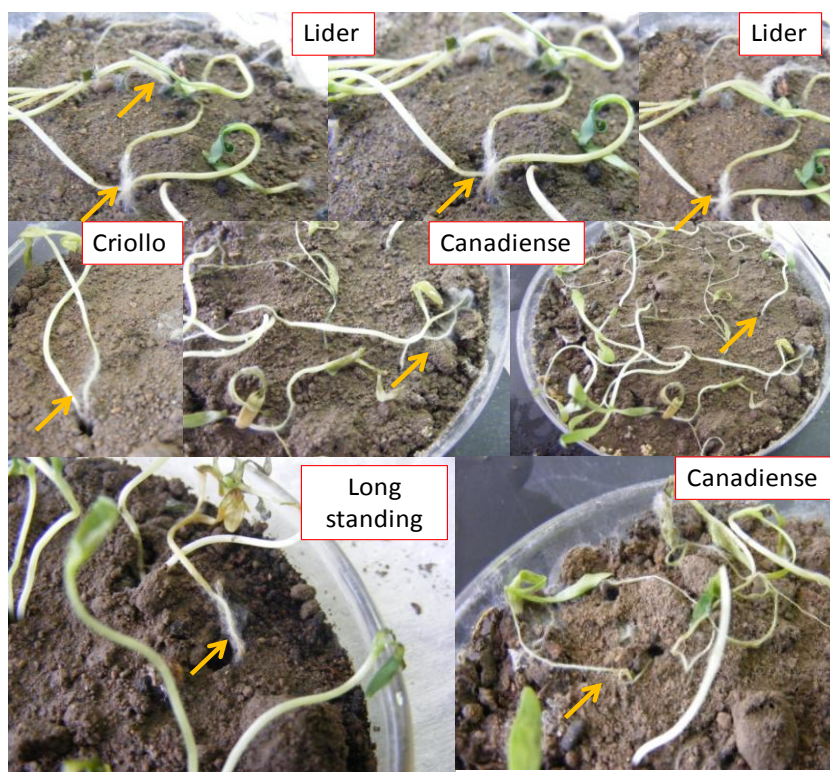


Figura 53. Plántulas de cilantro invadidas por el aislado 2.



Figura 54. Plantas de cilantro atacadas por el aislado 3.

4.2.3. Prueba de patogenicidad en invernadero

Los aislados 1 y 3 mostraron una agresividad mayor respecto a daños, el aislado 1, provoco amarillamiento de las hojas más viejas y hojas con menor tamaño y vigor, mientras que el aislado 2, solo ocasionó un ligero amarillamiento en hojas, el aislado 3, manifesto un amarillamiento marginal de las hojas jóvenes y un retraso en el crecimiento (fig. 55). El testigo presentó crecimiento y desarrollo normal (fig. 55).

Estos resultados sugieren que todos los aislados son fitopatógenos, sin embargo los aislados 1 y 3 expresan mayor severidad.



Figura 55. Síntomas provocados por las cepas inoculadas en el ensayo en invernadero. a) planta inoculada con aislado 2, b) planta inoculada con aislado 1, c) planta inoculada con aislado 3, y d) testigo.

4.3. Re aislamiento

Las figuras 56, 57 y 58 muestran los reaislamientos invitro de cada variedad y se puede apreciar que son fenotípicamente iguales al aislamiento inoculado. Lo mismo ocurrió con las pruebas de patogenicidad en invernadero que se muestran en la fig. 59. Esta prueba coincide con lo mencionado por Agrios (2010) para cumplir con los postulados de Koch de especies fitopatógenas.

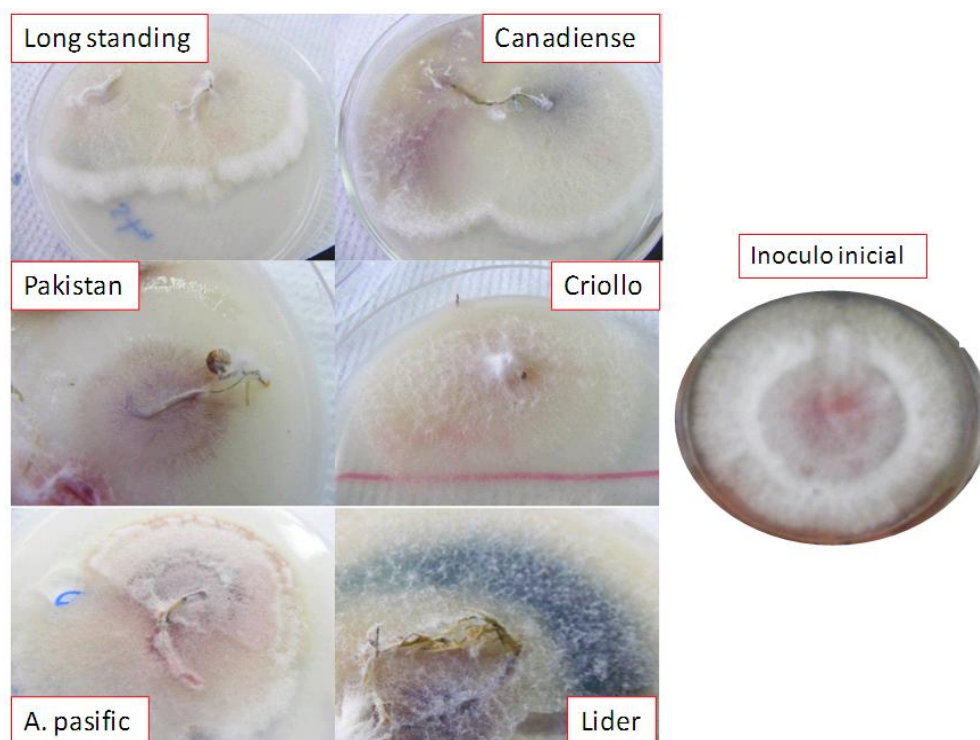


Figura 56. Re aislamiento del aislamiento 1, de algunas de las variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro comparadas con el inoculo inicial.



Figura 57. Re aislamiento del aislamiento 2 de algunas de las variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro, y su comparación con el inoculo inicial.

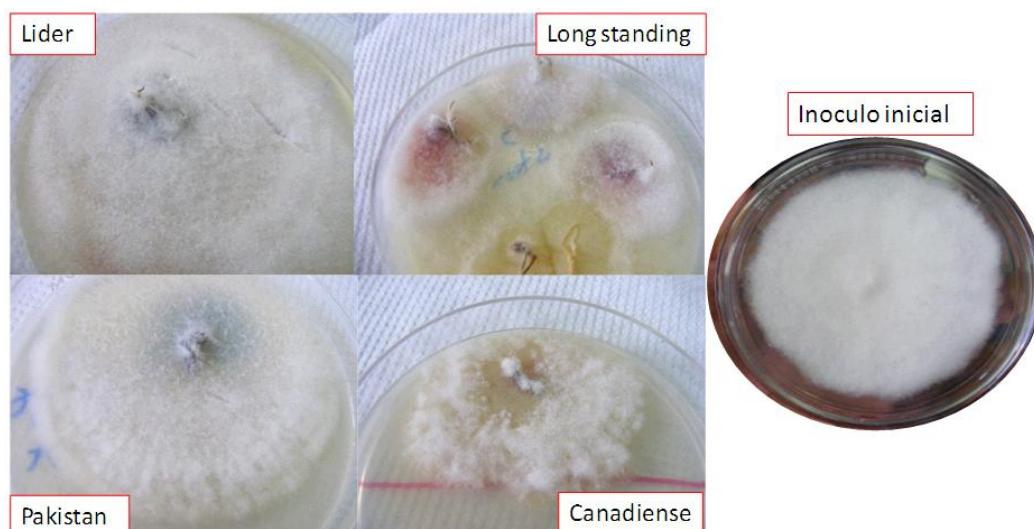


Figura 58. Re aislamiento del aislamiento 3, de algunas variedades utilizadas en el ensayo de patogenicidad in vitro, y su comparación con el inoculo inicial.

De las pruebas de patogenicidad bajo invernadero se re aislaron los aislamientos 1, 2, y 3, de las raíces de las plantas (fig. 59), el aislamiento 2, se encontró presente en la raíz de las plantas con clorosis leve.

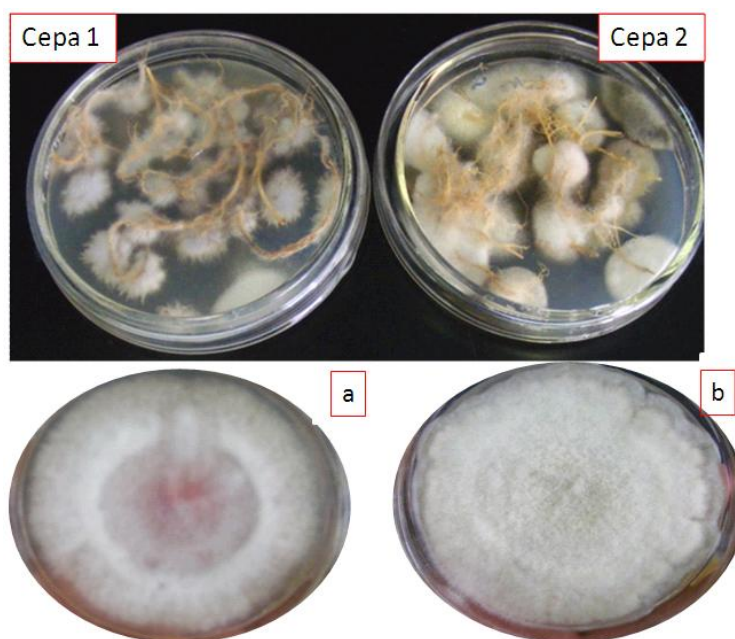


Figura 59. Re asilamiento de los aislamientos 1 y 2 de las plantas utilizadas en el ensayo de patogenicidad en macetas, a) inoculo inicial aislamiento 1, b) inoculo inicial aislamiento 2.

4.4. Identificación morfológica

El aislamiento 1 y 3 coinciden con las características reportadas para *Fusarium oxysporum*, por Booth, (1971) las cuales son de crecimiento mayor de 2.5 cm. de diámetro después de 4 días, microconidios generalmente abundantes, no formados en cadena, formados por fialides simples, elípticos a ovals, oval a fusiforme, alantoides, clamidosporas intercalar y/o terminal, oval a fusiforme, macroconidios falcados, clamidosporas ambos intercalar y terminal sobre ramas laterales cortas en micelio formados por conidióforos laterales cortos, es decir, generalmente fialides con ramas laterales, conidio fusiforme unilateralmente fusiforme a elipsoide, cultivos blancos a violetas o púrpuras, macroconidios equiláteramente falcados o puntiagudos (Fig. 60 y 62).

El aislamiento 2 coincide con las características de dos especies *Fusarium chlamydosporum* y *Fusarium equiseti* (Booth, 1971), cultivos rosa amarillento a beige llegando a ser beige intenso, celdas apicales de macroconidios frecuentemente elongadas en una extremidad acicular, conidios con pedicelos en la base de las celdas, macroconidios siempre formados de fialides simples, heterogéneos, algunos pueden semejarse con microconidios, macroconidios pueden ser variables en tamaño, además de presentar clamidosporas en cadena (fig. 61). Los tubos en medio de Pulpa de Papa (Nelson *et al.*, 1993) Fig. 63, indican que se trata de *Fusarium equiseti*, coincidiendo con lo señalado por McVicar *et al.* (2004); García (2007), quien ya había reportado a esta especie en el cultivo.

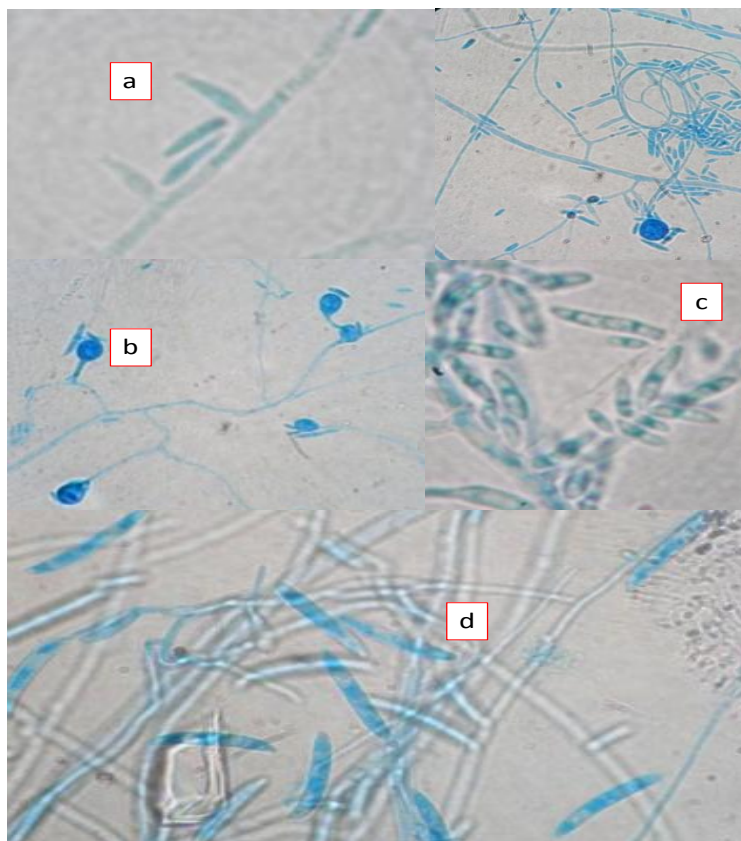


Figura 60. Estructuras del aislamiento 1; a) monofialides, b) clamidosporas, c) conidios bicelulares y d) macroconidios.

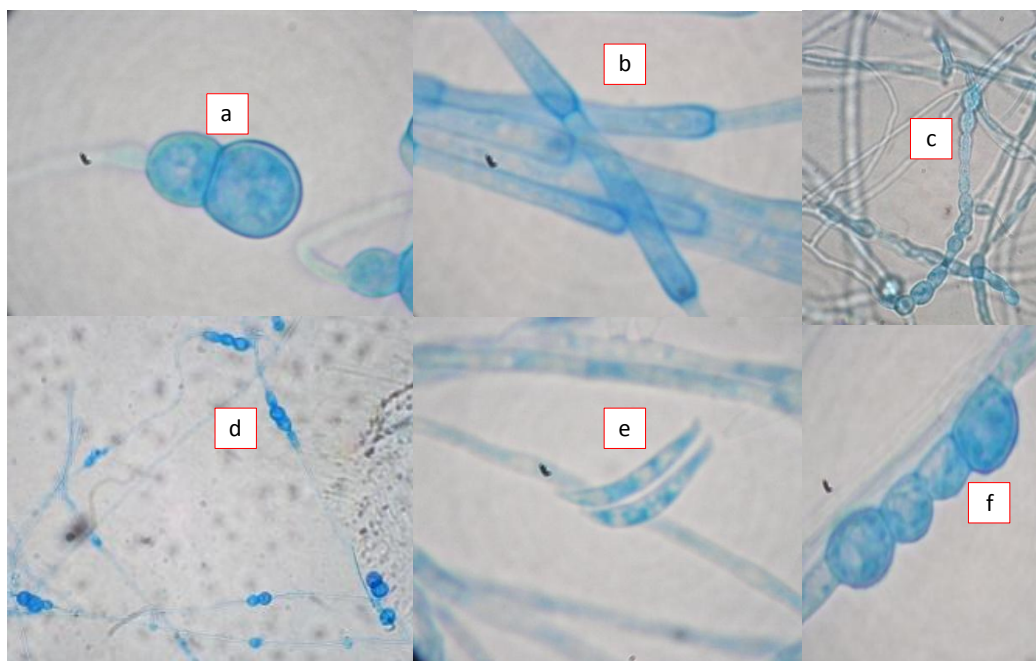


Figura 61. Estructura morfológicas del aislamiento 2; a), c), d), f) clamidosporas, b) micelio, e) macroconidios.

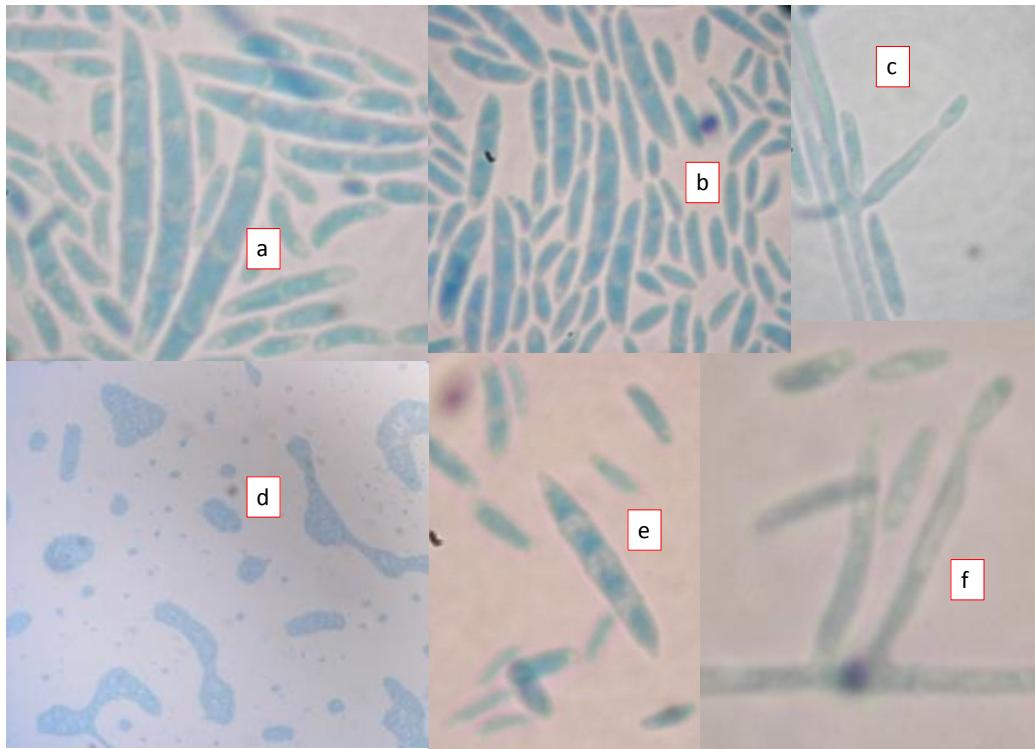


Figura 62. Estructuras morfológicas del aislamiento 3; a), e) macroconidios, b) conidios bocelilares, c), f) fialides, y d) vista general de conidios.



Figura 63. a) Siembra de la cepa 2, para la identificación a nivel de especie, mediante la prueba de coloración del medio, b) cepa 2 a los 10 días de ser sembrada.

4.5. Identificación por PCR

La integridad de los ácidos nucleicos después de la extracción, resultó viable para llevar a cabo el PCR (Fig. 64).

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 570 pb (Fig. 65), correspondiente a la región comprendida entre 28 y 5 s ribosomal, la cual es común, para todos los hongos de las tres cepas (1, 2, y 3) en estudio.

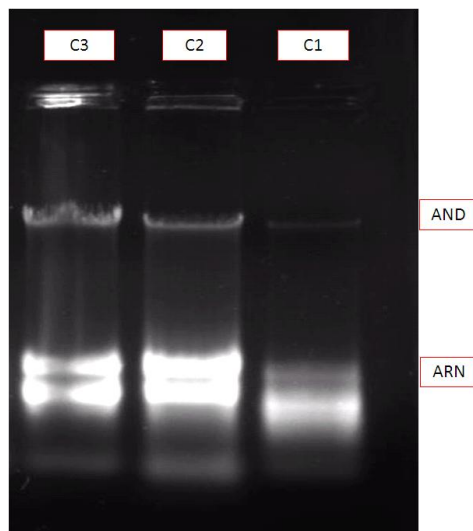


Figura 64. Gel de agarosa al 0.8%, en el que se observa la integridad de los ácidos nucleicos.

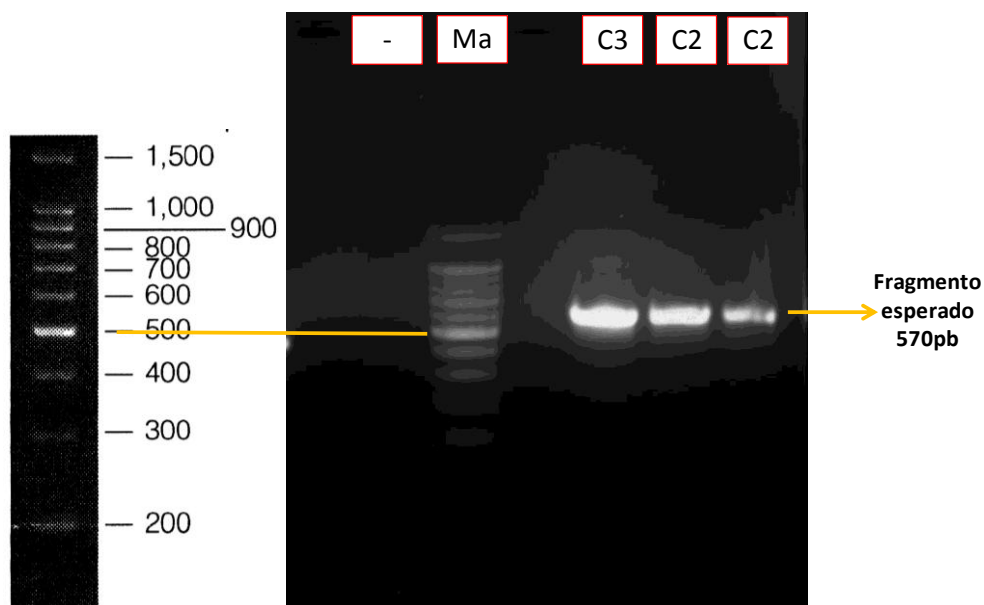


Figura 65. Gel de agarosa al 1.5%, donde se observa el fragmento amplificado resultante del PCR de los aislamientos, 1,2 y 3 aislados en cilantro.

Al alinear las secuencias obtenidas (ver Anexo 3) en el NCBI, se mostro alta homología con diferentes especies de *Fusarium* (Cuadro 24), lo cual indica que se trata de estas especies; aislamiento 1, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; aislamiento 2, *Fusarium equiseti*; aislamiento 3, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Cuadro 24. Comparación de las especies de hongos a las cuales se parecen los aislados 1, 2, y 3.

Cepa	Acceso	Especie de hongo con que está relacionado*	% de parentesco*	Pb usados
1	AY462580.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	100%	505
	FR852562.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i>	99%	
2	AY147368.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	501
	EU715615.1	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	99%	
3	AY462580.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	100%	508
	HQ658965.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	99%	

Pb= pares de bases

*Despues del análisis realizado por el NCBI

Aunque *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* es la forma especial con la que tienen parecido los aislamientos 1 y 3, se sabe que ambas son diferente en color y forma de crecimiento, además de generar síntomas distintos en plantas, el aislamiento 1 provoca clorosis general de la hoja, mientras que el aislamiento 3 provoca clorosis marginal y acortamiento de entrenudos (achaparramiento) de la planta. Srivastava (1972) citado por Diederichsen (1996), menciona que *Fusarium oxysporum* causa la marchitez, daños en el sistema radicular y el follaje, al no funcionar bien las raíces, el follaje se torna amarillento, marchito y si las plantas sobreviven al ataque suelen quedarse enanas. Smith et al., (2011) indican que *Fusarium oxysporum* ataca específicamente a cilantro pero no infecta a otras plantas umbelíferas. Koike (2005), reporto el ataque de *Fusarium oxysporum* en cilantro y le asigna el nombre de *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii* al igual que otros autores en años posteriores. Tomando en cuenta estos reportes, no existiría ninguna accesión para

esta nueva forma especial de *F. oxysporum*, por lo cual se desconoce si pudiera tratarse de la misma forma especial. Por otro lado al hacer el mapa genético correspondiente, el aislamiento 1 tiene mayor parecido con *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Anexo 3). 1) En cambio el aislamiento 3, se encuentra altamente emparentada con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* (Anexo 4).

La identidad del aislamiento 2, de acuerdo a la secuencia amplificada de los ITS es *F. equiseti*, que provocó síntomas de clorosis en plantas. Este resultado coincide con lo reportado por, McVicar et al., (2004); García, (2007). El mapa genético indica que se encuentra relacionada con la especie *F. equiseti*, tal y como se observa en el Anexo 4, y como se había determinado en primer instancia.

V. CONCLUSIONES DEL CAPITULO

- ⇒ Se aislaron dos hongos (aislamiento 1 y 2) de las plantas con síntomas de “amarillamiento o fuego del cilantro” y una cepa (aislamiento 3) de las plantas con síntomas de clorosis y achaparramiento del ensayo de transmisión por semilla y suelo.
- ⇒ Los tres aislamientos fueron fitopatógenos, los aislamientos 1 y 2 provocaron síntomas de clorosis, y el aislamiento 3 de clorosis marginal y achaparramiento.
- ⇒ Los tres aislamientos fueron hongos del género *Fusarium*, siendo el 1 y el 3 de la especie *Fusarium oxysporum* y al secuenciarse y ser comparados, dar parecido a las f. sp. *vasinfectum* y *avenae*, respectivamente, aunque la literatura reporta *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii*, como la forma especial presente en cilantro. Mientras que el aislamiento 2 resultó ser *Fusarium equiseti*.

5. DISCUSION GENERAL

Debido a que los síntomas del “amarillamiento o fuego” del cilantro, sugieren a primera vista la presencia de virus, se realizó una prueba de transmisión mecánica, la cual resulto negativa, esto conllevó a replantear el experimento hacia otros posibles factores como deficiencias nutrimentales, herbicidas, hongos, nematodos, fitoplasmas, bacterias limitadas a floema, virus limitados a floema o daños por alimentación de insectos chupadores.

Los ensayos iniciales indicaron que los síntomas del “amarillamiento o fuego” no se debía a daños provocados por el herbicida más utilizado (Linuron); al realizar una prueba con dosis altas, se produjo necrosis de hojas y muerte de la planta, por fitotoxicidad, estos sintomas coinciden con lo reportado por Ruíz, (2006) para otras especies, estos síntomas son completamente distintos a los de la enfermedad en estudio. Se comprobó además, que los síntomas de “amarillamiento o fuego”, no son causados, por deficiencias de macronutrientes (N,P,K), debido a que son distintos a los síntomas de deficiencias en otros cultivos mencionados por Rubasky and Quiros, (1999) que son; crecimiento lento y restringido crecimiento de raíces y tallos, tallos delgados, erguidos y duros, hojas más pequeñas de lo normal, pálidas, y cuando la deficiencia es muy fuerte presentan una pérdida del color, las hojas inferiores son las primeras afectadas, las hojas más viejas pueden desarrollar un tinte de color blanco amarillento. Se encontró también, que los agentes causales de la enfermedad, no se transmiten por semilla, ya que al sembrar las 7 variedades de cilantro colectadas en campo (Sun master, Pakistán, Canadiense, Líder, Long Standing, American Pasific, y Criollo), y las cuales habían sido ya afectadas por la enfermedad al haber sido sembradas por los productores, no presentaron ningún síntoma en invernadero, bajo condiciones controladas. Otro aspecto importante, fue determinar que la enfermedad no es provocada por organismos transmitidos o presentes en suelo, ya que al realizar un ensayo con dos tipos de suelo, de uno de ellos, se aisló *Fusarium oxysporum*, el cual ya había sido reportado en cilantro por Srivastava, (1972), Diederichsen, (1996), Kenneth, (2008) y Singh, (2009) mientras que en el otro suelo, las plantas se mostraron sanas al igual que los testigos.

Al identificar los insectos presentes en las parcelas con la enfermedad, se encontraron áfidos (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, *Hyadaphis coriandri*, *Therioaphis trifolii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon* sp., *Semiaphis heraclei*, *Brevicoryne brassicae*), chicharritas (*Empoasca* sp., *Spangbergiella* sp., *Draeculacephala* sp. y *Oncometopia* sp.), psílicos (*Bactericera cockerelli*), y trips (*Frankliniella occidentalis*), algunos de ellos no han sido reportados aún en cilantro, o en cultivos de la familia umbelíferae a la que pertenece. La importancia de la presencia de insectos chupadores, radica en el potencial para la transmisión de agentes patógenos de plantas, sin embargo, muchos de ellos (*Hyadaphis coriandri*, *Therioaphis trifolii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon* sp., *Semiaphis heraclei*, *Brevicoryne brassicae*, sp., *Draeculacephala* sp., *Oncometopia* sp., *Frankliniella occidentalis*) solo se encontraban en uno de los siete sitios de colecta (San Matías Tlalancaleca, San Martín Texmelucan, Quecholac, Palmar de Bravo, San Salvador el seco, Atlixco y Tehuacán), y otros como las chicharritas encontradas, no se han reportado como agentes transmisores de patógenos para cilantro o umbelíferas, por lo cual, se descarto la posibilidad de tratarse de algún fitoplasma ya que, como lo mencionan Manotoba, (2011), Rubatsky and Quiros, (1999) las únicas chicharritas con potencial para transmitir Fitoplasmas en umbelíferas son *Macrosteles fascifrons* y *Circulifer tenellus*. En el caso de los trips, que tienen potencial para transmitir Tospovirus (Mound, 2001) se descarto la posibilidad de tratarse de este tipo de patógenos, debido a que el cilantro se reportó ICTV, (2011) como inmune al único virus de este género, que ataca a plantas Umbelíferas, el *Tomato spotted wilt virus*. Se enfocó el interés a aquellos insectos presentes prácticamente en todos los sitios de colecta con problemas de “amarillamiento o fuego” y estos fueron los áfidos, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, y el psílido, *Bactericera cockerelli*, en el caso de los áfidos, al realizar pruebas de transmisión con los dos primeros, en base a la técnica planteada por Pinto, (1985), se logró reproducir a la clorosis y necrosis de nervaduras, mosaicos, moteados, coloraciones rojizas, amarillamiento de nervaduras, deformaciones y achaparramiento, los cuales son los síntomas descritos como “amarillamiento o

fuego” del cilantro. En base a esto se realizaron pruebas de diagnóstico para virus y bacterias limitadas a floema. Las pruebas de transmisión mecánica para virus dieron negativas, sin embargo, los ensayos con PCR, resultaron ser positivos prácticamente para todas las muestras colectadas, esto, para virus de la Familia Luteoviridae los cuales son limitados a floema y se transmiten de manera persistente. Cabe destacar que las pruebas de transmisión por áfidos, indican que se trata de más de un virus, debido a que un solo tipo de áfido no es capaz de transmitir todos los síntomas. El ICTV, (2011), y otros autores reportan una gran cantidad de virus que atacan a cilantro y otras umbelíferas (ver cuadro 15-18). La secuenciación de los fragmentos de 1050pb amplificados para muestras con síntomas de mosaicos, achaparramientos, moteados, clorosis en nervaduras y amarillamientos, probadas para virus de la familia Luteoviridae, al analizarse en el Genbank, expresaron 100% de cobertura y 99% de identidad para el *Turnip yellow virus* (TuYV) reportado como sinónimo del *Beet western virus* (BWYV) por ICTV (2011). Debido a que, para muestras con síntomas de enrojecimientos no hubo amplificación de fragmentos para Luteovirus, se cree que pudieran estar involucrados otros tipos de virus además de ser transmitidos solo por *Myzus persicae*. En el caso de las pruebas de PCR para bacterias limitadas a floema (*Xylella fastidiosa*, y *Candidatus Liberibacter solanacearum*), resultaron negativas.

Por otro lado, al hacer el aislamiento de los hongos presentes en plantas enfermas, y suelo, se lograron aislar 3 hongos, los cuales resultaron ser fitopatógenos. Al ser identificadas morfológicamente se encontró que dos de ellos (aislamiento 1 y 3) correspondían a *Fusarium oxysporum*, en base a las características descritas por Booth (1971) mientras que el aislamiento 2, fue *Fusarium equiseti*, al identificarlos molecularmente (PCR), se encontró que el aislamiento 1, tiene mayor homología con *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, mientras que el aislamiento 3 con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* aunque Koike, (2005) reporta *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii*, como la forma especial presente en cilantro. En el caso de la cepa 2 esto resultó estar mayormente emparentada con *Fusarium equiseti*, el cual ya había sido reportado en cilantro por McVicar *et al.* (2004); García (2007).

Los hallazgos en relación a las condiciones ambientales prevalecientes, en los municipios con problemas de “amarillamiento o fuego” del cilantro, reportados por CESAVER, (2009), indican que estas son muy variables (11.8-21.7°C), sin embargo, en todos los casos la enfermedad se concentra en la temporada, cálido-seca de la estación de crecimiento del cilantro en el estado de Puebla, esto sucede, debido a que los vectores de la enfermedad (áfidos) prefieren estas condiciones de temperatura y se reproducen con mayor intensidad en ellas (Arias *et al.*, 1992), a su vez esto ocasiona que los agentes transmitidos tengan mayores posibilidades de infectar a mayor cantidad de plantas, aunado a que los áfidos se encuentran infectivos toda su vida al tratarse de virus persistentes.

Los resultados anteriores indican que “el amarillamiento o fuego del cilantro” es provocado por virus del género la familia Luteoviridae (*Turnip yellow virus*), y otros posibles virus no identificados, transmitidos por *Myzus persicae*, y *Macrosiphum euphorbiae*, esto aunado al ataque de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, que al actuar en complejo provocan mayor severidad de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES GENERALES

- ⇒ La enfermedad se presenta con mayor incidencia y mayor severidad en la época cálido-seca, aunado a que los municipios con presencia de la enfermedad comparten características climáticas.
- ⇒ La enfermedad se distribuye en manchones y se presenta con un patrón de invasión de las orillas hacia el centro de la parcela.
- ⇒ El o los patógenos que provocan los síntomas no se transmitieron por semilla ni por suelo, a excepción de un hongo que provocó achaparramiento en las plantas (aislamiento 3).
- ⇒ Los factores abióticos (Linuron y deficiencia de N, P y K) no son los causantes de la enfermedad en estudio.
- ⇒ Se identificó a los trips; *Frankliniella occidentalis*, chicharritas; *Empoasca* sp., *Spangbergiella* sp., *Draeculacephala* sp. y *Oncometopia* sp. psíidos; *Bactericera cockerelli*. y a 7 especies de pulgones *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum*

rufiabdominalis, *Macrosiphum euphorbiae*, *Hyadaphis coriandri*, *Therioaphis trifolii*, *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon* sp., *Semiaphis heraclei*, *Brevicoryne brassicae*. Siendo los áfidos *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, y *Macrosiphum euphorbiae* los vectores involucrados con la enfermedad.

- ⇒ Se reprodujeron todos los síntomas del “amarillamiento o fuego” al hacer las pruebas de transmisión por *Myzus persicae*, y *Macrosiphum euphorbiae*; sin embargo, el síntoma de nervaduras amarillas solo se transmitió por *M. euphorbiae*, mientras que el síntoma de enrojecimientos solo por *Myzus persicae*, ambos áfidos fueron incapaces de transmitir el agente causal del síntoma de manchas cloróticas.
- ⇒ El PCR para *Xylella fastidiosa*, y *Candidatus liberibacter solanacearum* resulto negativo.
- ⇒ La prueba de PCR para virus de la familia Luteoviridae dieron positivo para las muestras con mosaicos, achaparramientos, moteados, clorosis en nervaduras, y amarillamientos, pero no para enrojecimientos y manchas cloróticas.
- ⇒ La secuenciación del fragmento amplificado (1050pb) indicó que se trata de *Turnip yellow virus* con un 99% de cobertura y 98% de identidad.
- ⇒ Se aislaron 3 hongos fitopatógenos del cuello y raíz de las plantas con síntomas, que al inocularse provocaron clorosis. Morfológicamente, el aislamiento 1 y 3 fue *Fusarium oxysporum*, mientras que el aislamiento 2 fue *Fusarium equiseti*. Molecularmente, (PCR con ITS 4 y 5) al secuenciarse, el aislamiento 1 y 3 fueron *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *cepae*, respectivamente, aunque la literatura reporta *F. oxysporum* f. sp. *coriandrii*, como la forma especial presente en cilantro. Mientras que el aislamiento 2 tuvo mayor similitud con *Fusarium equiseti*.
- ⇒ Los 7 genotipos probados fueron susceptibles a la enfermedad.
- ⇒ La enfermedad del “amarillamiento o fuego” del cilantro, es ocasionada por un complejo de fitopatógenos que incluyen a virus (*Turnip yellow virus*, otros virus no identificados), transmitidos por *Myzus persicae*, y *Macrosiphum euphorbiae*, y los

hongos *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f sp. *cepae*, y *F. equiseti*.

7. RECOMENDACIONES

- ⇒ Realizar el aislamiento, purificación e identificación del o los virus que provoca los enrojecimientos y las manchas cloróticas.
- ⇒ Realizar el aislamiento de hongos del suelo de otros sitios de colecta.
- ⇒ Hacer pruebas de transmisión con pulgones de la especie *Rhopalosiphum rufiabdominalis* y *Hyadaphis coriandri*.
- ⇒ Hacer pruebas de diagnostico para determinar la presencia de virus de los géneros, *Closterovirus* y *Rhabdovirus*.
- ⇒ Hacer análisis foliar de plantas con síntomas de “amarillamiento o fuego del cilantro”, y comparar los niveles de macro y micronutrientes presentes, son los recomendados, para determinar las deficiencias generadas por los patógenos en la planta.
- ⇒ Hacer un ensayo involucre la inoculación de todos los patógenos aislados en una planta.
- ⇒ Hacer un estudio epidemiológico de la enfermedad, para diseñar el manejo integrado del “amarillamiento o fuego del cilantro”.

8. BIBLIOGRAFIA

Abu-Samah, N. and Randles, J.W. 1983. Clover yellow vein virus. Ann. appl. Biol. pp.103: 97.

Acosta, J. 2002. Fitoplasmas: Su Conocimiento e Importancia Económica. Tesis Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 9-21.

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. ELSERVIER, Academic Press. USA. 948p.

Allen, W.R., Davidson, T.R. and Briscoe, MR. 1970. Strawberry latent ringspot virus. *Phytopathology* 60:1262.

Astier S.; Albouy J.; Maury Y.; Robaglia C. y Lecoq H. 2006. Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science Publisher. India, Edenbridge Ltd. pp.159-180.

Atkey, P.T. and Brunt, A.A. 1982. Arrachaca B virus. *Phytopathology*.103:294.

Ávila A.C.; Lima M. F.; Wanderley L.J. da G. Nagata T.; and Da Gama L.J.W. 1990. Coriander: a New Natural Host of Groundnut Ring Spot Virus in Brazil. *Gen. Virol.* 71:2801.

Barrales V. J. y García B. R. B. 2004. Etiología del Tizón de la hoja y Pudrición de la Raíz del Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en Tepeaca, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp.3 y 52.

Bautista, M., N. 2006. Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación. Colegio de porgraduados. Texcoco, Edo. de México. 113 p.

Bem, F. and Murant, A.F.1979. *Ann. appl. Biol.* 92: 237. *Ann. Rep. Scottish. Crop Res. Inst. Ann. Phytopathology. Soc. Japan* 42: p.382.

Blackman, R.L. and Eastop, V.F., 2000. Aphis on the World's Crops. An Identification and Information Guide. Second Edition. WILEY. The Natural History Museum, London. 466p.

Blade S. 1998. Coriander. Government of Alberta. Agriculture and Rural Development. Agdex 147/20-2. Alberta, Canadá. 10p.

Boccardo, G., Lisa, V., Luisoni, E. and Milne, R.G. 1987. Carrot temperate virus 1. *Adv. Virus Res. Soc. Japan.* 32:171.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey. England. 90 p.

Borror, D.J; De Long D. M. y Triplehorn C. A. 1981. An Introduction to the Study of Insects. Fifth edition. Saunders College Publishing. New York, USA. pp. 308-343.

Brown, F. and Hull, R. 1973. Parsnip mosaic virus. *J. gen. Virol.* 20:43.

Casper, R. 1988. In: The Plant Viruses, Vol. 3; Polyhedral Virions with Monopartite RNA Genomes, ed. R. Koenig, Plenum Press, New York. p.235.

Castro T. R. E. 2010. Identificación de Dos Fitopatogenos en Cilantro (*Coriandrum sativum*) en la Región de Atlixco, Puebla. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 63p.

Corrêa R.L., Silva T. F., Simões-Araújo J. L., Barroso P. A. V., Vidal M. S., and Vaslin M. F. S. 2005. Molecular Characterization of a Virus from the Family *Luteoviridae* Associated with Cotton Blue Disease. Archives of Virology. Arch Virol (2005) 150: 1357–1367

Davis R. M. and Raid R. N. 2002. Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 50-59.

Dennis J. 2002. New disease of coriander in Australia associated with a *Microdochium* species. South Australian Research and Development Institute. New Disease Reports (2002) Volumen 6, 7. GPO Box 397, Adelaide, SA, Australia, 5001. 1p.

Diederichsen A. 1996. Coriander (*Coriandrum sativum* L.). Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 3. Institute of Plant Genetic and Crop Plants Research, Gatersleben, Germany/ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. 83p.

D'Agostino, G., Luisoni, E. and Lovisolo, O. 1992. Celery T virus. Proc. Eur. EM (Granada, Spain) 3:427.

Duffus, J.E. 1965. Beet pseudoyellows virus. Phytopathology 55:450.

Edwardson, J.R. and Christie, R.G. 1991. Primula mosaic virus. In: The Potyvirus Group, Vol. III, p. 809.

Elnager, S. and Murrant, A.F. 1976. Anthriscus yellows virus. Ann. appl. Biol. 84:153.

Font, I.; Abad, P.; Albiñana, M.; Espino, A.I.; Dally, E.L.; Davis R. E. y Jorda C. 1999. Amarillos y enrojecimientos en zanahoria: Una enfermedad a diagnóstico. Bol. San. Veg. Plagas, 25: pp.405-415.

Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC (FDA) 1995. Serie Cultivos. Boletín Técnico No. 25. Santo Domingo, República Dominicana. 26p.

García C. E. 2007. El Cilantro (*Coriandrum sativum* L.). Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp.4-46.

Garrett, R.G. and Tomlinson, J.A. (1966). Parsnip virus 3.Rep. NAT Veg. Res. Stn. 1965, p.74.

Garibaldi A.; Gilardi G. and Gullino M.L. 2010. First Report of Collar and Root Rot Caused by *Pythium ultimum* on Coriander in Italy. Plant Disease. APS. Volume 94, Number 9. pp. 1,167- 1,168.

Gibbs, M.J. 1991. Celery T virus.Grad. Dip. Thesis, Aust. NAT Univ. J. gen. Virol. 66: 1575.

Gómez, B. J. G. 1997. Se Incrementa el Interés por Cilantros de Calidad. Hortalizas, frutas y Flores. Edit. Año dos mil, S.A. pp. 44-36.

Hooper P. and Dennis J. 2002. Coriander: Overcoming Production Limitations. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication No 02/147. RIRDC Project No CAG-1^a. Kingston, Australia. 32p.

Kenneth H.R. 2008. Westcott's Plant Disease Handbook. 7ma edición. Springer. Nueva York. USA. pp.1151-1163.

Koike S.T. 2005. First Report of *Fusarium* Wilt of Cilantro Caused by *Fusarium oxysporum* in California. October 2005, Volume 89, Number 10. 1,130.1 - 1,130.1pp.

Koike S.T. 2006. Cilantro Yellow Blotch Virus. University of California, U.S. Department of Agriculture, and County of Monterey cooperating. Crop Notes. January/February, 2006. 1432 Abbott Street Salinas, California, USA. 5p.

Holman J. 1974. Los Áfidos de Cuba. Instituto Cubano del Libro. La Habana, Cuba. pp. 51-151.

Lee Y.A. and Liu Y.H. 2004 First Report of Bacterial Leaf Blight of Coriander Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *coriandri* in Taiwan. August , Volume 88, Number 8 Pages p.910.

Misari, SM and Sylvester, E.S. 1983. Coriander feathery red vein virus.Hilgardia 51:1.

Moreno P., L. y Jaramillo E.R. 2004. Virus fitopatogenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. Universidad de Guanajuato, instituto de ciencias hortícolas. Guanajuato, Guanajuato, México. 143p.

Mound A., L. 2001. So many thrips – so few tospoviruses?. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium On Thysanoptera. CSIRO Entomology, GPO Box 1700, Canberra, Australia. p.55.

Munyaneza J., E. 2010. Association of *Liberibacter* with Newly Emerging Psyllid-Transmitted Diseases of Potato and Other Annual Crops. III Simposio Nacional y II Internacional De Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara, Jalisco, México 28 y 29 de septiembre de 2010.

Munyaneza, J. E., Fisher, Sengoda, V. G., Garczynski, S. F., Nissinen, A., and Lemmetty, A. 2010. First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* associated with psyllid-affected carrots in Europe. Plant Disease 94: 639.

Murant A. F. and. Roberts I. M., 1971. Cylindrical Inclusions in Coriander Leaf Cells Infected with *Parsnip Mosaic Virus*. Scottish Horticultural Research Institute, Invergowrie, Dundee. Journal of General Virology (1971), 10, 65-70. Gran Bretaña pp. 65-70

Murant A. F. 1972. Carrot mottle virus. Scottish Horticultural Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland. Rev. appl. Mycol. 28: 435.

Natsuaki, T., Muroi, Y., Okuda, S. and Teranaka, M. 1990. Carrot Temperate virus 2, 3 y 4. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 354.

Nelson P.E., Toussoun T. A. and Marasas W.F.O. 1993. Fusarium Species, an Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State Press University Park And London, USA. 17-25, 74-76 y 142-146 pp.

Pérez V. J. J. 1986. Etiología y Desarrollo Epidemiológico de la Bacteriosis del Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en San Diego Texcoco, Edo. de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fitopatología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, México. pp. 5,49

Pinto C. B. 1985. Manual de Prácticas de Virología Agrícola. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, Méx.: 42 p.

Promega, 2009. Technical Bulletin. GoTaq® PCR Core Systems. Instructions for Use of Products. Part# TB25. USA. 17p.

Rawlings M. R. 2003. Effects Of The Rice Root Aphid, *Rhopalosiphum Rufiabdominalis* (Sasaki), On Wheat Growth And Yield. Master Of Science Tesis. Midwestern State University Wichita Falls, Texas. 75p.

Rubatzky V.E. Quiros, C.F. y Simon, P.W. 1999. Carrots and Related Vegetable Umbeliferae. Crop Production Science in Horticulture. CABI Publishing. UK by the University Press, Cambridge. pp.161-219.

Ruiz C. R. de J. 2006. Control Químico de Malezas en Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en Chapingo, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Chapingo, México. 47p.

Santos, J., P. 2001. Revisión bibliográfica de especies de chicharritas (Homóptera: *Cicadellidae*) de importancia agrícola en México Tesis Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 8 p.

Schreiber A. 2011. Cilantro. Ringold Rd. 2621. WA 99330-9745. Washinton, USA. 2p.

Silos C. M.C. y Martínez R. A. 2003. Evaluación De 14 Variedades De Cilantro *Coriandrum sativum* L. Bajo Las Condiciones Ecológicas De La Comarca Lagunera. Sistemas De Producción Agropecuaria– Agrofaz Volumen 3 Número 2, 2003. Universidad Juárez del Estado de Durango Facultad de Agricultura y Zootecnia. Venecia, Dgo., México. Volumen 3 Número 2. pp. 343-346.

Smith K. M. 1972. A Texbook of Plant Virus Diseases. Academic Press. Third Edition. Great Britain. pp. 144-147.

Smith R., Bi j., Cahn M., Cantwell M., Daugovish O., Koike S., Natwick E. and Takele E. 2011. Cilantro Production in California. Vegetable Production Series. UC Vegetable Research and Information Center. University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication No. 7236. Richmond, CA. USA. 4p.

Soto G. A. y Retana S.A. 2003. Clave Ilustrada Para los Géneros de Thysanoptera y Especies de *Frankliniella* Presentes en Cuatro Zonas Hortícolas en Alajuela, Costa Rica. Agronomía Costarricense 27(2): pp.55-68.

Sutic D.D., Ford R. E. and Tosic M. T. 1999. Handbook of Plant Virus Diseases. CRC. USA. pp. 203- 208.

Takale E. 2001. Cilantro Production: Sample Cost and Profitability Analysis. University of California. Agricultural and Natural Resources. Communication Service. Publication No. 8029. Oakland, CA. USA. 19p.

Tanaka, T., 1961. The rice root aphids, their ecology and control. *Spec. Bull. Coll. Agr. Utsunomiya Univ.*, 10: 1-183.

Tomlinson, J.A. and Webb, M.J.W. 1974. Celery virus. Rep. NAT Veg. Res. Str. 1973. p.101.

Urias M. C.; Rodriguez M. R. y Alejandro A. T.1992. Afidos Como Vectores de Virus en México. Volumen II. Identificación de Afidos de Importancia Agrícola. Colegio de Posgraduados. Montecillos, México. 163p.

Urias M. C. y Valenzuela Ureta J.G. 1992. Afidos como Vectores de Virus en México; Volumen I, Contribución a la Ecología y Control de Afidos en México. Capitulo: Importancia de las enfermedades en la Producción Agrícola en México. Centro de Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Mex. 68-90pp.

Walter A. 2007. Cilantro. Horticulture Production Guides. Collage of Agricultural Sciences, Department Plant, Soil, and Agricultural Systems. Southern Illinois University Carbondale. June, 2007. Horticultural Factsheet 4. Illinois, USA. 2p.

Wenbin L., Abad J. A., French M. R. D., Rascoe J., Wen A., Gudmestad N.C., Secor G.A., Lee L.M., Duan Y., Levy U.L. 2009. Multiplex Real-time PCR for Detection, Identification and Quantification of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' in Potato Plants with Zebra Chip. ELSEVIER. Journal of Microbiological Methods 78 (2009) 59–65.

Fuentes de web:

APS, 2011. The American Phytopathological Society. Pagina consultada: <http://www.apsnet.org/pages/apsnetredirect.aspx>, fecha de consulta: 13-09-2011.

Caloro seed. Semillera. <http://www.caloroseed.com/CGI-BIN/home.php>

Catindig J. y Heong KL. 2009. Bank Root Aphide Rice Knowlwdge. IRRI-CIMMYT. http://www.knowledgebank.irri.org/ricedoctor/index.php?option=com_content&view=article&id=598&Itemid=2820. (12-07-11).

CSIRO Entomology, 2009. Thrips, Plants, Tospoviruses: the Millennial Review. The 7th International Symposium on Thysanoptera. Calabria, Italy, from the 2-7th of July 2001. <http://www.ento.csiro.au/thysanoptera/symposium.html> 12-08-11.

El Universal. 2005. El cilantro un antibiótico. Las Buenas Noticias También son Noticia. Publicado el 27 de Junio por Carmen Cobos Gonzales. Pagina de consulta: <http://fox.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=19154&pagina=238>. Fecha de consulta: 23-08-2011.

FAO. 2011. FAOSTAT. Datos de la Producción Agrícola Mundial. Pagina de consulta: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> fecha de consulta: 22-08-2011.

Hammon B. 2001. Western Colorado Thrips. Entomology. Colorado State University Extension. <http://www.coopext.colostate.edu/TRA/PLANTS/thripsid.shtml> 12-08-11.

Manitoba. 2011. Coriander - Production and Management. Manitoba Agriculture, Food and Rural Initiatives. Manitoba, Canadá. Pagina de consulta: <http://www.gov.mb.ca/agriculture/crops/specialcrops/bie01s01.html> fechas de consulta: 22-08-2011

NCBI. 2011. Herramienta de comparación de bases nitrogenadas, BLAST, pagina de consulta. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Fecha de consulta: 20-08-2011.

SMN. 2011. Servicio Meteorológico. Nacional. Pagina de consulta: <http://smn.cna.gob.mx/> Fecha de consulta: 12/04/2011.

SNICS. 2011. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Pagina de consulta: <http://snics.sagarpa.gob.mx/Paginas/Inicio-SNICS.aspx> Fecha de consulta: 20/08/2011.

ISTA. 2011. International Seed Testing Association. Pagina de consulta: <http://www.seedtest.org/en/home.html> Fecha de consulta: 20/08/2011.

9. ANEXOS

ANEXO 1

ENTREVISTA A PRODUCTORES

1.- En relación a la “VARIEDAD”

- 1.1 ¿Cual es o son la(s) variedad(es) que siembra?
- 1.2 ¿Dónde compra la semilla?
- 1.3 ¿Desde hace cuánto tiempo siembra esta variedad?
- 1.4 ¿Cuánto dura su ciclo?
- 1.5 ¿Cuántos kilos de semilla usa por ha?

2.- En relación al “AMBIENTE”

- 2.1 ¿En qué épocas de año siembra cilantro? Y ¿por qué?
- 2.2 ¿Qué otros cultivos ha sembrado en este terreno?

3.- En relación al “PATOGENO”

- 3.1 ¿Cuáles son los problemas con insectos que tiene con el cilantro?
- 3.2 ¿Cuáles con los problemas con enfermedades que se presentan con cilantro?
- 3.3 ¿En qué temporada es hay más problemas de plagas y enfermedades en este cultivo?
- 3.4 ¿Desde cuándo se empezó a presentar el problema?
- 3.5 ¿En qué época se presenta?
- 3.6 ¿Qué % de la cosecha a perdido aproximadamente?
- 3.6 ¿Como lo ha controlado?
- 3.7 ¿Que piensa que pueda causarlo?

ANEXO 2.

Limpieza de gel con Wizard SV Gel and PCR Clean-up System

Purificación de ADN por centrifugación

Cortado de gel y preparación del producto de PCR

A. Disolución de la rebanada de gel

1. Hacer la electroforesis y cortar el gel donde está la banda de ADN y colocarlo en tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
2. Agregar 10µl de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de gel. Dar vortex e incubar a 50-65°C hasta que el corte del gel se disuelva por completo.

B. Procesamiento de ampliaciones de PCR

1. Añadir un volumen igual de Membrane Binding Solution a producto de PCR.

Unión del ADN

1. Insertar SV Minicolumna en el tubo de recolección.
2. Transferir la mezcla del gel disuelto o el producto de PCR a la Minicolumna de ensamble. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
3. Centrifugar a 16.000 xg durante 1 minuto. Desechar el filtrado y volver a colocar la Minicolumna en Tubo de la colección.

Lavado

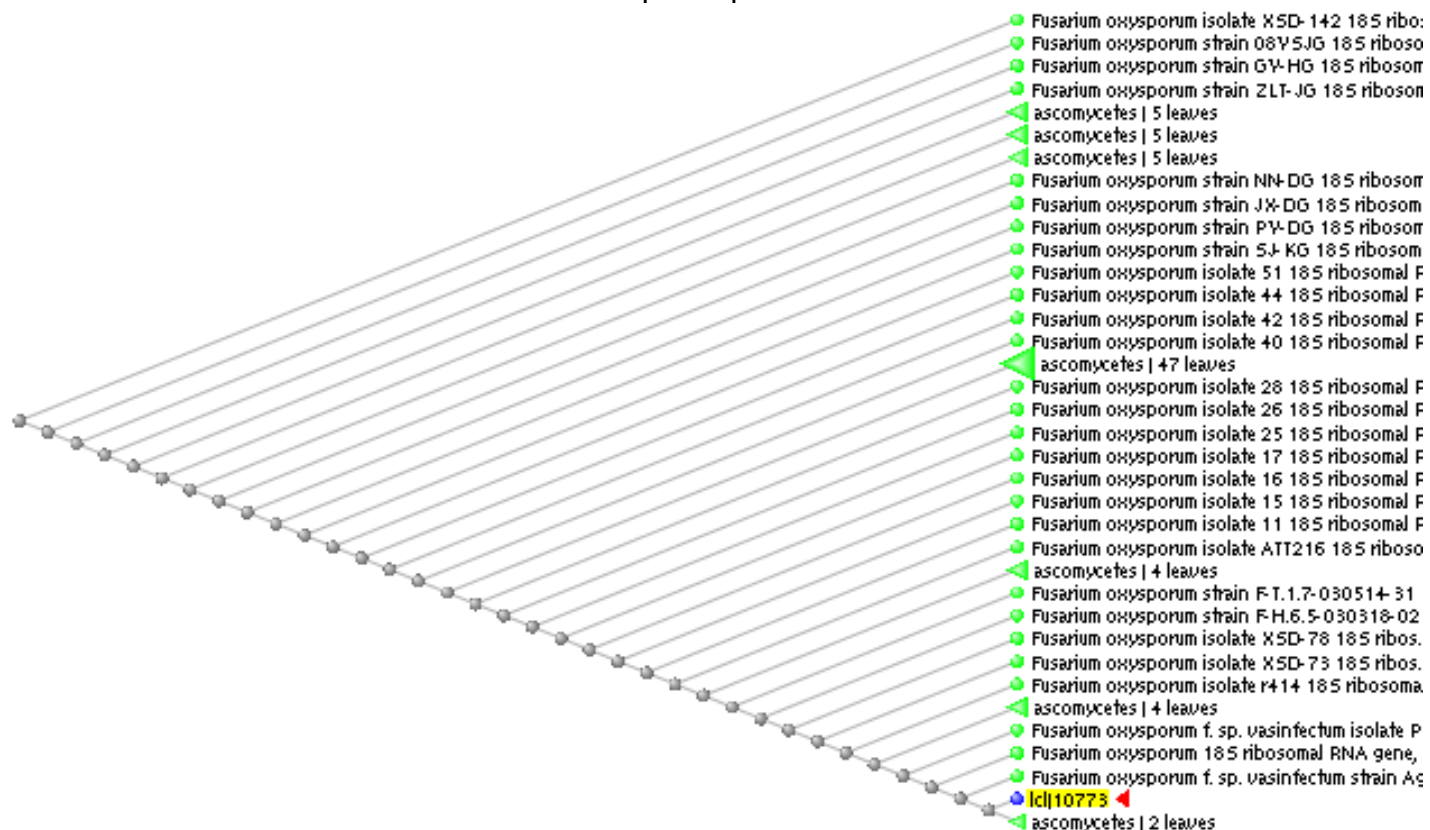
4. Agregar 700µl de Membrane Wash Solution (etanol añadido). Centrifugar a 16.000 xg durante 1 minuto. Desechar el filtrado y volver a insertar la Minicolumna en el tubo de colección.
5. Repetir el paso 4 con 500µl de Membrane Wash Solution. Centrifugar a 16.000 xg durante 5 minutos.
6. Vaciar el tubo de recolección y centrifugar en conjunto con la columna durante 1 minuto con la tapa de la microcentrífuga abierta (o fuera) para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol.

Elución

7. Transferir con cuidado la Minicolumna a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga limpio.
8. Añadir 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 16.000 xg durante 1 minuto.
9. Desechar la minicolumna y almacenar el ADN a 4 ° C o -20 ° C.

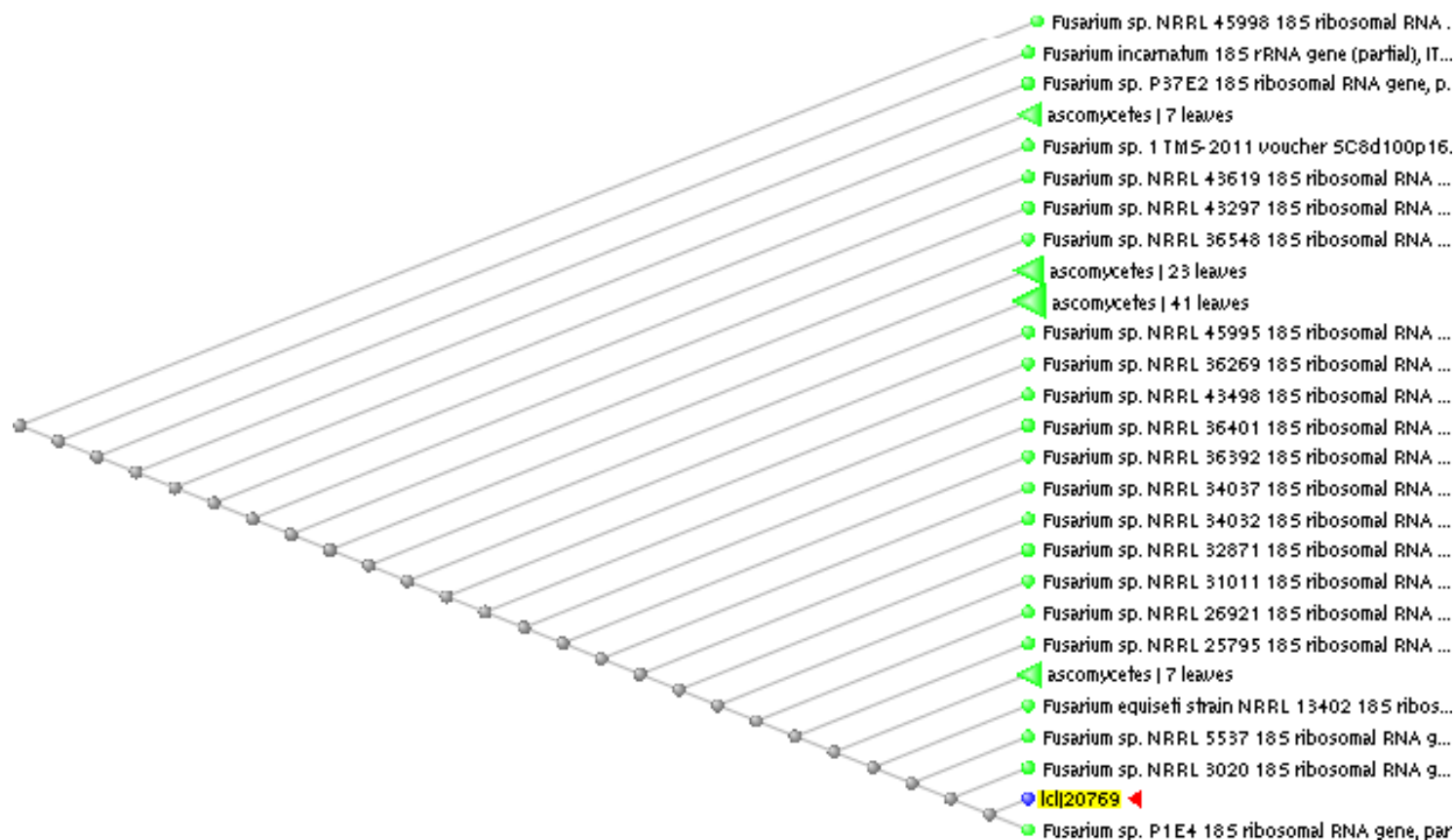


ANEXO 3. Mapa de parentesco de aislado 1.



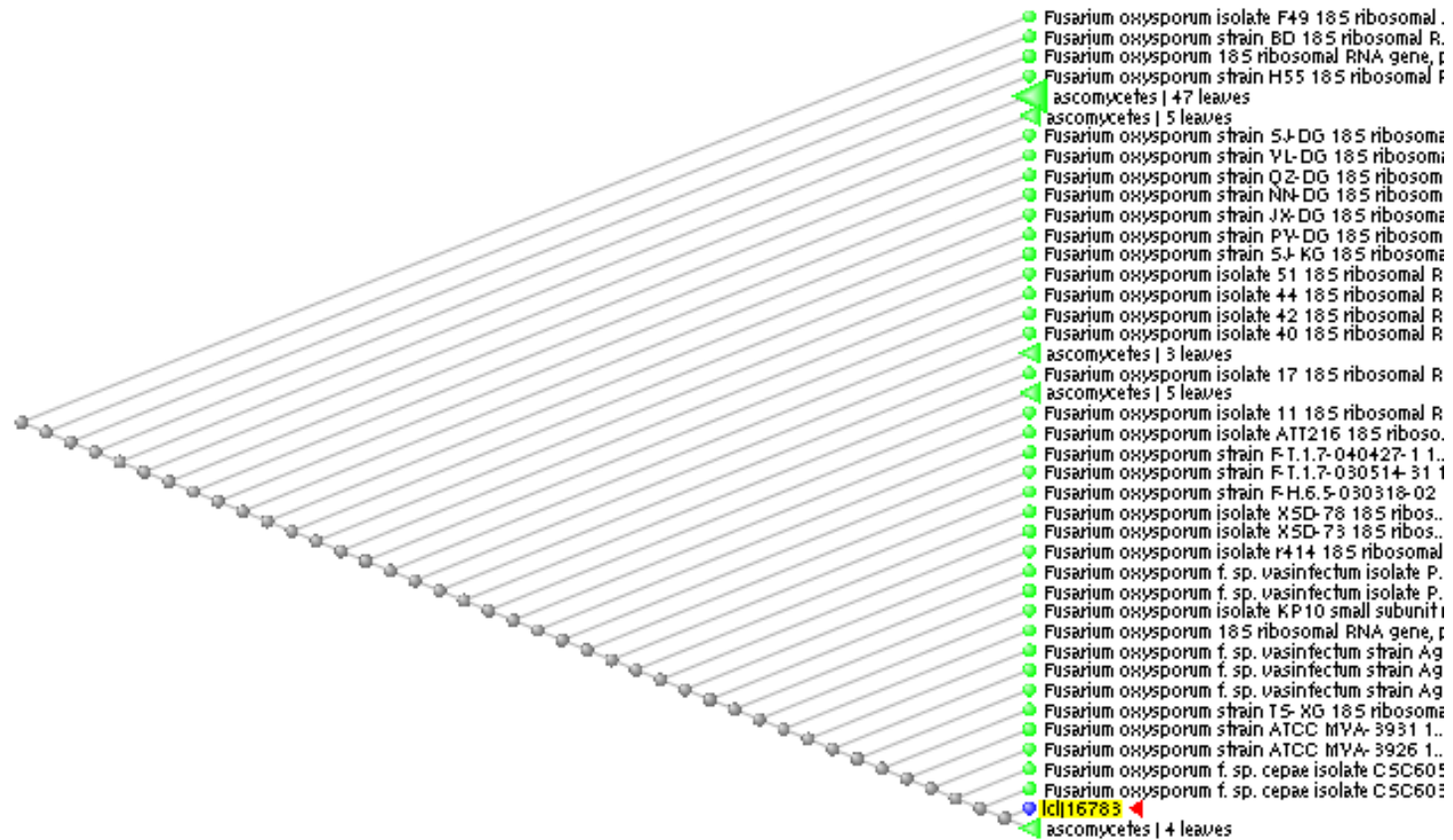
GATCCGAGGTCaACATTcAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCA
 ATCAATTTGAGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGC
 AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
 AAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCTCGTTTACCAGGGAGCGGGCTGATCCGCCG
 AGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTT

ANEXO 4 . Mapa de parentesco de la aislado 2.



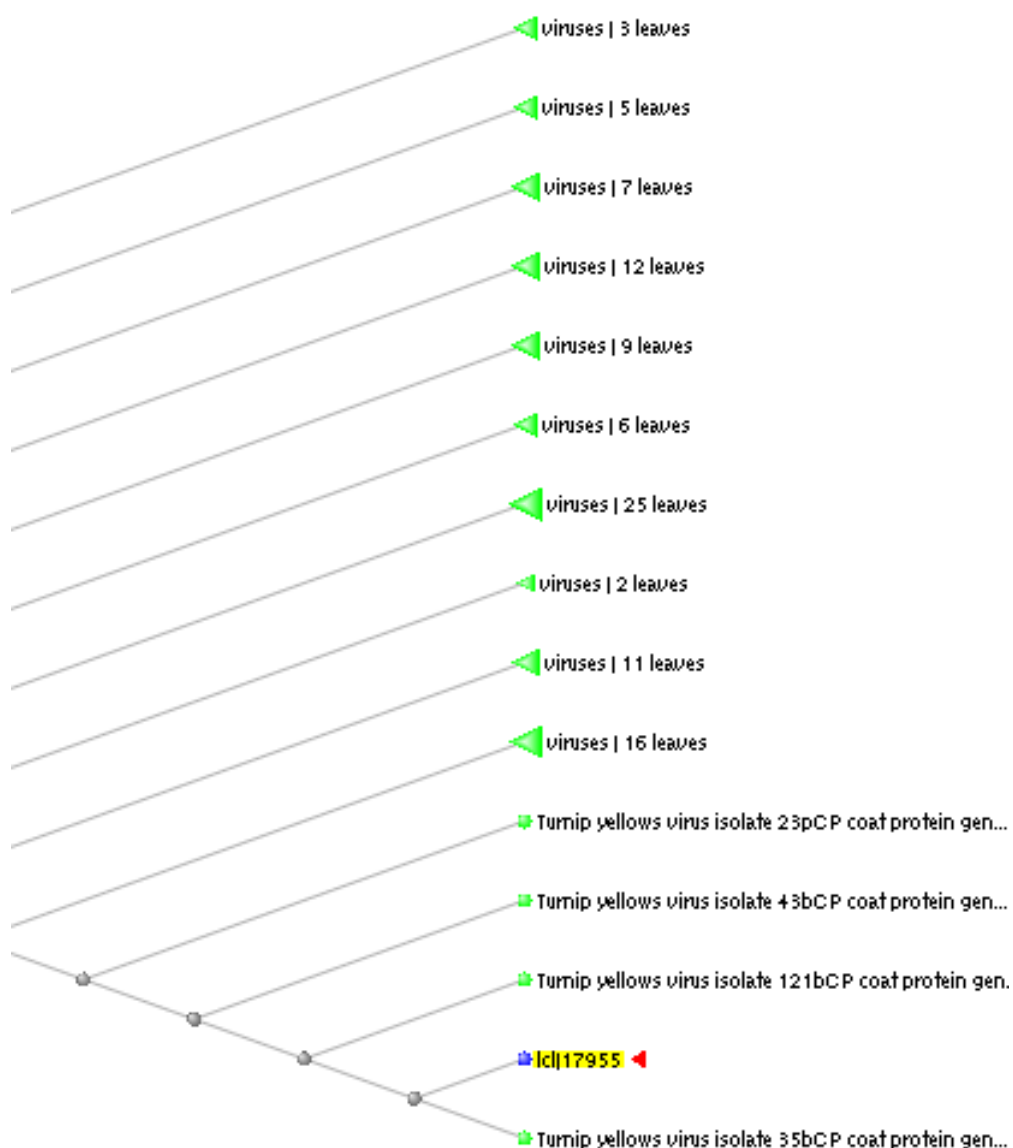
ATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAAGTAACGAGGTGTATGATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCA
 ATCGATTTGGGGAACGCGGGTTACCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGC
 AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
 AAGTTTTGATTTATTTGTTTGTCTTACTCAGAAGTTCCACTAAAACAGAGTTTGGGTCTCGGGCGGGCCGTCCTTTTTACAGGGCGCGGGCTGATCCGCCGA
 GGCAACGTATAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGA

ANEXO 5. Mapa de parentesco de la aislado 3.



CTACCTGATCCGAGGTCAACATTGAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGCCGCGACGATTACAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGA
 CCGCCAATCAATTTGAGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGC
 GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
 TGTGAAAGTTTTGATTTATTTATGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGAT
 CCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGAC

ANEXO 6. Secuencia y árbol genético del fragmento amplificado para virus de la familia *Luteoviridae*.



ATGAATACGGTCGTGGGTAGGAGAACAATTAATGGAAGAAGACGACCACGGAGGCAAGCACGACGCGCTCAG
CGCTCTCAGCCAGTGTTGTGGTCCAAACCTCTCGGACAACACAACGCCGACCTAGACGACGACGAAGAGGTA
ATAACCGGACAAGAGGAGCTGTTTCTACCAGAGGAGCAAGCTCAAGCGAGACATTTGTTTTCTCGAAAGACAA
TCTCGCGGGAAGTTCCAGCGGAGCAATCACGTTCTGGGCCGAGTCTATCAGACTGCCAGCATTCTCTAATGGAA
TACTCAAGGCCTACCATGAGTATAAAATCTCGATGGTCATTTTGGAGTTCGTCTCCGAAGCCTCTTCCCAAACT
CCGGTTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGTAACTCAACTCCCTTTCCTCAACGATTAACAAATTCGGGA
TCACAAAGCCCGGGAGGAAAAACGTTTACAGCGTCTTTCATCAACGGGATCGAATGGCATGACGTTGCCGAGGA
CCAATTCAGGATCCTCTACAAAGGCAATGGTTCTTCATCGATAGCTGGA