

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE VIRUS EN
MALEZAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE OKRA EN
GUERRERO Y MORELOS, MÉXICO.**

TESIS



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

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

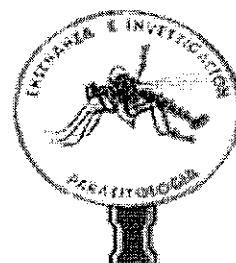
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**SANDRA LAURA DE LA RIVA
ALVAREZ**

CHAPINGO, EDO. MÉXICO

DICIEMBRE 2005



CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE VIRUS EN MALEZAS ASOCIADAS
AL CULTIVO DE OKRA EN GUERRERO Y MORELOS, MÉXICO

Bajo la Dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como
requisito parcial para obtener el grado:

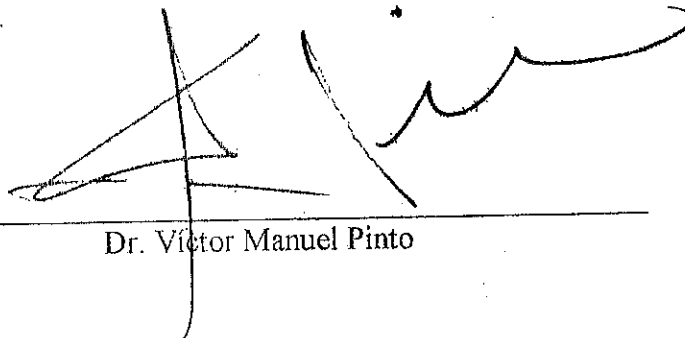
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR:



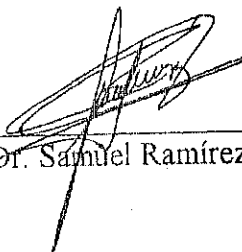
Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz

ASESOR:



Dr. Víctor Manuel Pinto

ASESOR:



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA (CONACYT),
POR EL APOYO DURANTE MI ESTADIA EN EL POSGRADO Y EL
DESARROLLO DE ESTA INVESTIGACIÓN

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO POR PROPORCIONARME
TODOS LOS MEDIOS MATERIALES Y HUMANOS EN MI FORMACIÓN
ACADEMICA

A MARIO SALAZAR SEGURA POR LA ASESORIA EN ENSAYOS DE
INVERNADERO Y SEROLOGICOS DAS-ELISA REALIZADOS EN EL
LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA
AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO

AL DOCTOR EN CIENCIAS ELIAS IBARRA DE PIEDRA POR LA ASESORIA
EN LAS PRUEBAS MOLECULARES DE RT-PCR E HIBRIDACIÓN
REALIZADAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL
CINVESTAV UNIDAD ZACATECO, DISTRITO FEDERAL

AL MAESTRO EN CIENCIAS ALEJANDRO MONSALVO REYES POR LA
ASESORIA EN LAS PRUEBAS DE PCR Y RNA dc, REALIZADAS EN EL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGIA
Y PROTOTIPOS. ENEP-IZTACALA, MEXICO Y AL DOCTOR EN CIENCIAS
RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ POR SU CONTRIBUCIÓN Y
DIRECCIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

INDICE

LISTA DE FOTOGRAFÍAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE CUADROS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
HIPOTESIS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Las malezas como reservorio de virus	4
3.2 Geminivirus	7
3.3 Importancia del cultivo de la okra	8
3.4 Problemática de la infección viral en el cultivo	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 COLECTA DE MUESTRAS	12
4.2 TRANSMISIÓN MECÁNICA	12
4.2.1 Gama de hospedantes	12
4.2.2 Transmisión okra-gama de hospedantes	13
4.2.3 Transmisión por semilla	13
4.2.5 Transmisión por injerto	13
4.3 PRUEBAS SEROLOGICAS	14
4.3.1 DAS-ELISA (inmunodetección enzimática de doble sándwich)	14

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	14
4.4.1 Extracción y electroforesis de RNA de doble cadena de origen viral	14
4.4.2 Extracción de DNA	15
4.4.3 EXTRACCION RNA TORAL	16
4.4.3.1 Extracción y purificación por el método de Isotiocionato de guanidina-cloroformo	16
4.4.3.2 Síntesis de cDNA (RT)	16
4.4.3.3 RT para PCR	16
4.4.3.4 Hibridación y Southern blot	17
V. RESULTADOS	18
5.1 COLECTA DE MUESTRAS	18
5.2.1 Transmisión mecánica	22
5.2.2 Transmisión okra-gama de hospedantes	23
5.2.3 Transmisión por semilla	23
5.2.4 Transmisión por injerto	23
5.3 PRUEBAS SEROLOGICAS DE DETECCION VIRAL	24
5.3.1 DAS-ELISA	24
5.4 CARACTERIZACION MOLECULAR	27
5.4.1 Extracción y electroforesis de RNA dc de origen viral	27
5.4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	28
5.4.2.1 Detección de geminivirus	28
5.4.3 TRANSCRIPTASA INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	29

5.4.3.1 Detección e identificación de virus RNA por RT	29
5.4.3.2 Hibridación Southern blot	31
VI. DISCUSIÓN	32
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. LITERATURA CONSULTADA	38

DATOS BIOGRÁFICOS

Sandra Laura de la Riva Alvarez nació el 20 de Diciembre de 1966 en el Distrito Federal. Egresada en 1997 del Departamento de Agroecología de la Universidad Autónoma En 1998 forma parte de Agricultura Ecológica Campesina A.C. desempeñando funciones de Coordinación de Difusión de Proyectos. A partir del 2000 ingresa al programa de Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de Chapingo, concluyendo en 2002; en ese mismo año se integra al equipo de trabajo de Desarrollo de Micro cuencas de la SAGARPA en la Ciudad de Celaya, Guanajuato como Coordinadora de Proyectos Productivos y como Evaluador de Proyectos Agroindustriales en un Bufete Crediticio en la misma ciudad. A partir del 2004 se enfoca a la consultoría privada y es colaboradora en el área de producción y comercialización de productos orgánicos en CIESTAAM-UACH.

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

FOTO 1 <i>Abelmoschus esculentus</i> L	19
FOTO 2 <i>Euphorbia heterophilla</i>	19
FOTO 3 <i>Sida rhombifolia</i>	20
FOTO 4 <i>M. perfoliatum</i>	20
FOTO 5 <i>Convolvulus vulgaris</i>	21
FOTO 6 <i>Malvastrum spp</i>	21
FOTO 7 <i>Nicotiana tabacum</i>	24
FOTO 8 <i>Datura stramonium</i>	24
FOTO 9 <i>Gomphrena globosa</i>	24
FOTO 10 <i>Capsicum Nahum</i>	26
FOTO 11 <i>Datura stramonium</i>	26

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Patrón electroforetico de RNA dc de muestras de campo	28
Fig. 2 Perfil electroforético de muestras de campo	29
Fig. 3 Perfil electroforetico de muestras de campo	29
Fig. 4 perfil fragmentado de DNA de muestras de campo	30
Fig. 5 Patrón electroforetico RT-PCR de DNA	31
Fig. 6 Southern blot	31

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1 Sintomatología en gama de hospedantes	22
CUADRO 2 Gama de hospedantes positiva por DAS-ELISA	25

ABREVIATURAS

ARN	Acido ribonucleico
ADN	Ácido dexoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
M	Molar
μl	Microlitro
min	Minuto
μM	microMolar
Pb	Pares de bases
Kb	Kilobase
Oligo	Oligonucleótido
Rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerisa
RT	Trascripción inversa
cDNA	DNA copia

RESUMEN

En okra (*Abelmoschus esculentus* L.) se detectaron síntomas de mosaico amarillo y deformación de hojas y fruto provocando pérdidas económicas importantes en Iguala y Morelos, México. Debido a la poca de información que relacione a las plantas no cultivadas con sus enfermedades y sus agentes causantes se plantearon los objetivos de Detectar e Identificar a los virus presentes en algunas especies de malezas asociadas al cultivo de okra en los Estados de Morelos y Guerrero, México.

Se demostró por transmisión mecánica en plantas indicadoras y diferenciales y por serología DAS-ELISA la importancia de las familias Malvaceae, Solanaceae, Compositae, y Euphorbiaceae como la fuente primaria de infección asociada a las familias Tombusviridae, Potyviridae, Bromoviridae y Geminiviridae. En tanto que pruebas de PCR y por el análisis de hibridación tipo Southern utilizando los oligos degenerados CP/MOT y MP mostraron al grupo de geminivirus y al género Alfamovirus como los patógenos de estas plantas más importantes presentes en Morelos e Iguala, México.

Palabras clave: okra, virus, DAS-ELISA, PCR

ABSTRACT

In okra (*Abelmoschus esculentus* L.) mosaic yellow symptoms and deformation of leaves and fruit were detected causing important economic losses. Due to the lack of information that related to the non cultivated plants with their diseases and their causing agents attempt the goal to detect and identify the viruses presents in weeds associated to this cultivation in Morelos and Guerrero, Mexico. It was proven for mechanical transmission in indicative and differential plants and for serological DAS-ELISA, the importance of the families Malvaceae, Solanaceae, Compositae and Euphorbiaceae as the infectious principal source associated to the families Tombusviridae, Potyviridae, Bromoviridae and Geminiviridae founded in this cultivation. At PCR tests and the analysis of hybridization type Southern using degenerate oligos CP/MOT and MP showed to the geminivirus group and the genus Alfamovirus like the most important plant pathogens present in Morelos and Iguala, Mexico.

Key words: okra, viruses, DAS-ELISA, PCR

I. INTRODUCCION

Las enfermedades virales son particularmente importantes en los trópicos y subtrópicos, por las pérdidas agrícolas que en la mayoría de los casos son devastadoras; En muchas de estas regiones, el patrón de cultivos consiste desde hace varias décadas de grandes poblaciones homogéneas, esta condición permite que diferentes grupos de plantas no cultivadas sean seleccionadas por presiones ambientales inducidas creciendo y desarrollándose por varias generaciones rodeando a los cultivos. México tiene diversidad de sistemas agrícolas; en algunas regiones, ya sea por las condiciones ambientales, económicas o culturales es muy frecuente que se “tolere” y la mayoría de las veces se fomente la presencia de plantas silvestres dentro y fuera de los cultivos, las cuales juegan un papel importante como reservorio de algunos virus que atacan a muchos cultivos, entre ellos a la okra (*Abelmoschus esculentus* L); cultivo que adquiere cada vez mayor importancia por ser una hortaliza de demanda internacional, exportándose sobre todo a E.U.A., Canadá y Japón. Sin embargo, los problemas fitosanitarios que se presentan en esta especie son todavía más importantes por la escasa información disponible.

Como muchos otros cultivos, la okra es atacada por hongos, insectos y principalmente por virus. Recientemente se han caracterizado algunos géneros de virus de las familias Tombusviridae, Potyviridae, Closteroviridae y Geminiviridae asociados a plantas silvestres de las familias de Malvaceae,

Solanaceae, Compositae, Euphorbiaceae y Convolvulaceae encontradas en éste cultivo. Siendo el grupo más importante el de los geminivirus (Brown, J. 1996; De la Torre, *et al.* 1996 y 2000).

En Morelos e Iguala, la predominancia de síntomas en okra son los mosaicos en hojas y moteados en frutos con diferencias en el grado de daño, ocasionando pérdidas considerables de rendimiento y calidad del fruto, hasta del 70% en etapa vegetativa y en otros casos hasta el 90% en fructificación (SAGARPA, 2003).

La okra es una especie nativa Africa, fue introducida en México a principios del siglo XX, probablemente por semilla, de tal forma que es poco probable que esta planta llevara consigo los virus que se han detectado en esta planta. También es probable que las fuentes de inóculo de los virus que afectan a la okra sean diversas especies de malezas silvestres asociadas al cultivo. Por tanto y debido a la poca información sobre las fuentes de inóculo de los virus que afectan a la okra, los objetivos del presente trabajo de investigación fue:

II. OBJETIVO

Detectar e Identificar a los virus presentes en algunas especies de malezas asociadas al cultivo de okra en los Estados de Morelos y Guerrero, México.

HIPÓTESIS

Las plantas silvestres presentes dentro y alrededor del cultivo son la fuente de inóculo de los virus que infectan al cultivo de la okra.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 Las malezas como reservorio de virus.

Las malezas de los cultivos causan daños directos derivados de la propia competencia, pero también causan daños indirectos al hospedar plagas y enfermedades que luego pueden transmitirse hacia el cultivo, en especial aquellas enfermedades que requieren vectores para su difusión, como las virosis. Es común observar malezas con síntomas de virosis; el síntoma que se presenta más frecuentemente es el mosaico, esta denominación se aplica a síntomas en hojas que tienen alteraciones cloróticas, en las que alternan partes verdes normales con otras amarillentas (Singh, 1990), algunas veces pueden confundirse como deficiencia de nutrientes, fitotoxicidad o quimeras, etc. Los síntomas iniciales en hojas jóvenes son generalmente difusos, con apariencia moteada, en hojas viejas se presentan áreas amarillentas irregulares e internervales. (Brown, J. 1995)

Los daños de las malezas a la agricultura en México, se estiman en pérdidas considerables por efectos de competencia y por hospedaje de plagas; así, en granos básicos se tienen pérdidas en rendimientos que fluctúan entre 15 y 45%, en el caso de cultivos hortícolas y en ciertos frutales se incrementan drásticamente los riesgos de pérdidas totales por encima del 50% por enfermedades de alto riesgo como las virosis y fungosas. En cultivos forrajeros e industriales las pérdidas en volumen cosechado oscilan del 15 al 70% (SAGARPA, 2003).

Los virus que infectan a cultivos generalmente están asociados con plantas silvestres hospedantes, muchas de las cuales son abundantes y ampliamente distribuidas. Investigaciones realizadas en malezas de diferentes regiones y jardines botánicos en varios países demuestran que un 10% ó mas de las plantas están infectadas con al menos un virus transmisible mecánicamente (Stevens, 1983). Particularmente, el suelo, el clima y las prácticas agrícolas tienen una marcada influencia sobre el equilibrio del agrosistema, por tanto el efecto de las enfermedades sobre las plantas puede variar ampliamente de acuerdo con el genotipo del hospedante. Así la naturaleza de la reacción del cultivo depende de la sensibilidad del hospedante y a la infección a partir de la diseminación de agentes infectivos, y estos a su vez determinan la predisposición ó la resistencia a la enfermedad, factores que se potencian en plantas anuales como el frijol calabaza, chile entre otros. (Torres Pacheco *et al.* 1996; Paplomatas *et al.* 1994; Bos, 1983; Hewitt y Chiarappa, 1977).

Estas particularidades y algunas otras variantes en los virus, tienen marcada influencia en las enfermedades con diferencias en la ecología de una región como el caso del CMV (virus mosaico de la calabaza), BGMV (virus mosaico dorado del frijol) entre muchos otros. Ya que los virus pueden aniquilar o no, a poblaciones de plantas causando los mismos síntomas de mosaicos, deformaciones y enanismo independientemente de la forma o tipo de virus que se trate dependiendo de las condiciones inherentes a la planta y su ambiente. (Matthews, 1991).

Sabemos actualmente que muchos virus infectan a más de un hospedante, si estos se encuentran en un microagrosistema, entonces se convierten en un foco de infección una vez establecido el ó los cultivos, además de que sus residuos vegetales sirven como propágulos. A pesar de haber sido estudiados los virus en cultivos, las plantas silvestres son determinantes en su sobrevivencia aún cuando éstas son eliminadas dentro de los terrenos de cultivo, ya que son sometidas a una constante selección natural y pueden sobrevivir portando a virus o asociaciones de ellos manifestando o no su presencia. Debido a su variabilidad genética, dos plantas no reaccionan igual a una infección del mismo tipo. La alta competencia natural las lleva a una selección o resistencia y latencia (*Idem*).

Diversos virus son transmitidos a plantas sanas por el rozamiento de sus hojas o por savia infectada, en forma natural los virus no tienen actividad fuera de las células vivas y en general requieren de vehículos ó vectores para su transmisión. Para la transmisión de enfermedades por vectores a partir de malezas basta un radio de 50 a 100 metros de su punto de resguardo y alimentación del cultivo y pueden ser agentes transmisores activos los artrópodos, nemátodos y vertebrados o pasivos como el viento, esporas, el agua, el suelo y las herramientas. Agrios, en 1993 reporta mas de 650 virus fitopatógenos de los cuales aproximadamente 250 han sido caracterizados y actualmente por el desarrollo de técnicas avanzadas ésta cifra se incrementa.

Los virus y algunas variantes que causan enfermedades similares pueden diferir completamente en su ecología, por ello la identificación y nomenclatura son esenciales para posteriores investigaciones.

3.2 Geminivirus

Muchos de ellos causan pérdidas económicas importantes en cultivos básicos como maíz, frijol, papa y trigo, a cultivos anuales como hortalizas y cereales en áreas templadas y tropicales.

Taxonómicamente se clasifican en 3 grupos de acuerdo a su rango de hospedantes, a sus vectores y a su organización genómica. El primero Mastrevirus, comprende a los geminivirus que infectan monocotiledóneas, son transmitidos por chicharritas, pero no mecánicamente poseen una molécula de DNA simple; El segundo grupo Curtovirus infecta dicotiledóneas, son transmitidos por chicharritas es transmitido por inoculación mecánica, con genoma de DNA bipartita; El grupo de Begomovirus son los que tienen un genoma DNA bipartita, son transmitidos por mosquita blanca (*B. tabaci* Gennadius) e infectan a dicotiledóneas y difícilmente tienen transmisión mecánica; una excepción es el virus rizado amarillo del tomate (TYLCV) de Israel y Sardinia, que es monopartita y es transmitido por mosquita blanca (Gibbs, 1998; Garzón-Tiznado *et al*, 1993).

Los geminivirus se caracterizan porque contienen un genoma de cadena sencilla de DNA circular contenido en un par de partículas geminadas isométricas con 18-20 nm de diámetro, 30 nm de longitud y simetría

icosahédrica. De acuerdo con Pathmanathan, *et al* (1998), los viriones contienen una molécula bipartita de uno ó dos segmentos "A", "B", donde el segmento "B" es similar al segmento "A". De longitud total de 2600 nucleótidos cada una. Los genes del segmento "A" codifican funciones requeridas para la replicación y encapsidación, mientras que los genes del segmento "B" son requeridos para promover el movimiento viral dentro de la planta.

3.3 Importancia del cultivo de okra

La okra es un arbusto herbáceo originario de África, conocida como "bonbo" ó "angú", donde se consume la fruta, que es una vaina verde o roja grande. Como alimento tiene un alto contenido de vitaminas (A,C y E), minerales (calcio, hierro y fósforo) y proteínas, sobre todo en las semillas, además resulta ser un alimento muy atractivo para países como E.U.A., Canadá y Japón por contener pocas calorías (Jaramillo, 1993).

En México los principales estados productores y exportadores son: Tamaulipas, Guerrero, Morelos, Michoacán y Colima sobre una superficie calculada en 4,173 ha, de riego y temporal (SAGAR-CIEA, 1999). Dónde no solo tiene importancia como producto de exportación, sino también por ser fuente de empleo y mano de obra requerida durante la cosecha (Pereyda *et al.*, 1998). Sin embargo, al igual que la mayoría de los cultivos, presenta una serie de enfermedades desde las primeras etapas de su desarrollo; las de mayor impacto son la virosis, potenciadas por las condiciones ambientales como alta humedad relativa y temperaturas elevadas, estas infecciones generalmente son producidas por

varios tipos de virus atacando uno o formando complejos a la vez, que dependiendo de la época se manifiestan en síntomas leves (40% de infección) o severos (90% o mayor de infección). Cuando la planta es atacada por virus, las hojas, ramas y tallos detienen su crecimiento por la pérdida de tejido fotosintético apareciendo un mosaico sistémico y deformación de frutos (Díaz, 1999; observación personal, 2001).

Actualmente se reportan tres virus que atacan a la okra en el mundo, los cuales pertenecen a los grupos de los Geminivirus: el virus mosaico de las venas amarillas de Behendi (BYVMV), fue reportado por primera vez en *Hibiscus esculentus* colectada en Bombay, India. Aunque la sospecha de su presencia fue reportada anteriormente por Singh en 1990 al investigar las condiciones ambientales, como la sequía con escasa o nula precipitación y la proliferación de la mosquita blanca (*B. tabaci*), observó igualmente el desarrollo de la sintomatología del mosaico de las venas amarillas. Los síntomas son persistentes y consisten de engrosamiento y aclaramiento de nervaduras, reducción de hojas y frutos. Su transmisión se lleva a cabo cuando muda su vector (*B. tabaci* G.), no es de transmisión transovárica, por semilla, por contacto entre plantas, a través de polen ó mecánicamente pero sí por injerto (Brunt, *et al*, 1996).

El virus del enrollamiento de hoja (OKLCV), descrito por vez primera por Kirkpatrick en 1930 en *Hibiscus esculentus* en Sudán, África. Encontró que los viriones ocurrían a bajas concentraciones en la savia de plantas enfermas. Fami, (1976) utilizando microtomografías de plantas sanas y enfermas y

llevadas al microscopio electrónico logró observar partículas virales. Los síntomas observados fueron moteados cloróticos en hojas y frutos y un enanismo general en las plantas enfermas.

Actualmente Brunt y col. reportan al virus del enrollamiento de la hoja confinado a Chad, Nigeria y Sudán, en África desde 1996. Este virus ocasiona engrosamiento y deformación de las nervaduras de la hoja; en infecciones tempranas se detiene el crecimiento de la planta sin que logren el llenado de vainas y en infecciones tardías las vainas no alcanzan el tamaño de corte. Indica también que la época de lluvia es la más riesgosa en este cultivo. Este virus se ha encontrado en plantas de las familias de Malváceas y Solanáceas.

Por otro lado, en México, De la Torre (1999) ha identificado en la Iguala, Gro. al virus mosaico de la okra (OKMV), que pertenece al grupo de los Tymovirus, TMV (Tobacco mosaic virus), del grupo de los Tobamovirus, tiene dos partículas de varilla rígida conteniendo cada una RNA de cadena sencilla, son transmitidos por nemátodos, semillas ó mecánicamente; TBSV (Tomato bushy stunt virus), del grupo de los Tobamovirus; AMV (alfalfa mosaic virus) pertenece al grupo de los Bromovirus, virus RNA de cadena sencilla, poseen 3 partículas baciliformes y una isométrica, es transmitido mecánicamente y por áfidos de manera no persistente. CMV (Cucumber mosaic virus), pertenece al grupo de los Cucumovirus, virus RNA de cadena sencilla con un genoma tripartita, partículas isométricas de 28 nm de diámetro, se transmite por áfidos y mecánicamente de manera no prersistente. INSV (Impatiens necrotic spotted virus), y posiblemente TEV (Tobacco etch virus) pertenece al grupo de los

Potyvirus, virus RNA de cadena sencilla posee partículas de varilla flexible, son transmitidos por áfidos en forma no persistente y mecánicamente, en okra ocasiona síntomas como mosaico amarillo, mosaico rayado, deformación y reducción del tamaño de los frutos y arrugamiento de hojas. Diaz (1999) reporta en la misma región al virus del amarillamiento de la okra.

3.4 Problemática de la Infección viral en el cultivo

A partir de la década de los 80's, la okra a tenido mucho auge en México su demanda como cultivo de exportación es por ello que suponemos que en el inicio las enfermedades típicas del cultivo no aparecerían en México, sin embargo, desde 1985 en Iguala se han reportado casos de infección de hasta el 90%, los más leves están sobre el 50% (Diaz, 1999). Se sabe que cuando algunos elementos ambientales predominan como alta humedad relativa y altas temperaturas la incidencia de infección viral se dispara sobre el umbral de tolerancia del cultivo por lo que a pesar de ser cultivo de riego solo se siembra en una época del año (de septiembre a noviembre en Iguala, Gro. y de enero a mayo en Morelos). Por otro lado, se han encontrado dentro y aledañas al cultivo plantas silvestres y aunque, éstas no siempre representan una fuente de inóculo por si mismas al ser infestadas con huevecillos de mosca blanca y áfidos entonces se convierten en un serio problema para la okra (Observación directa).

Actualmente los esfuerzos hechos para controlar estas enfermedades en México se limitan al control químico de la mosquita blanca (*B. tabaci* G) y en menor medida al uso de variedades resistentes.

IV. MATERIALES Y METODOS

El área de estudio comprendió diferentes predios localizados en Mazatepec y Temixco, Morelos e Iguala, Guerrero donde se cultiva regularmente la planta de okra. Ambas regiones de clima Aw_0 (w) el mas seco de los cálidos subhúmedos con temperatura media anual de 24°C con lluvias en verano y poca oscilación térmica; en Iguala con la variante (i') marcha de temperatura tipo Ganges (García, 1989).

4.1 COLECTA DE MUESTRAS

Se tomaron muestras aleatoriamente de las malezas presentes dentro y alrededor del cultivo de la okra. Se identificaron las plantas colectadas de las áreas de estudio.

4.2 TRANSMISIÓN MECÁNICA

4.2.1 Gama de hospedantes

El material enfermo y sano colectado fue inoculado en una gama de hospedantes de 12 especies diferentes con la intención de verificar la incidencia de síntomas por transmisión y determinar plantas indicadoras y diferenciales. Para la inoculación mecánica se maceraron 2g de hoja en morteros con una solución amortiguadora de fosfatos DIECA I 0.02 M y pH 7.2 (1:2 P/V), el macerado resultante fue aplicado sobre las hojas de plantas sanas indicadoras

de *N. glutinosa*, *N. tabacum* var. *xanthi*, *N. benthamiana*, *Datura stramonium*, *L. esculentum*, *Capsicum annum*, *Chenopodium album*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *P. vulgaris*, *Ipomoea spp* y *Gomphrena. globosa*. Antes de la inoculación dichas hojas habían sido espolvoreadas con Carborundum 600, posteriormente lavadas con agua.

4.2.2 Transmisión okra gama de hospedantes

Al mismo tiempo se tomaron plantas sanas y enfermas de okra de cada parcela visitada. Se inocularon 10 de las plantas de okra sanas con muestras de plantas silvestres y okra con mosaico y deformación de hojas.

4.2.3 Transmisión por semilla

Se sembró un lote de 20 macetas con semilla de okra proveniente de plantas enfermas. Para verificar si alguna de las virosis eran transmisibles vía semilla.

4.2.4 Transmisión por injerto

Se hicieron injertos de plantas colectadas de okra y malezas sobre patrones de plantas sanas de *A. esculentus*, *C. annum*, *P. vulgaris*, *G. globosa* y *C. amaranticolor*, *N. glutinosa*, todas con 45 días de edad. El área de unión se selló con cinta parafilm para mantener al injerto y fueron cubiertas con bolsas plásticas para mantener humedad relativa por espacio de 6 días.

Posteriormente se hizo una selección de plantas con sintomatología característica y se sometieron nuevamente a la re transmisión viral en plantas diferenciales para mantener al virus.

4.3 PRUEBAS SEROLOGICAS

4.3.1 DAS-ELISA (Inmunodetección enzimática de doble sándwich).

Se utilizaron siete antisueros (Anti-IgG) y sus correspondientes anti-IgG fosfatasa alcalina (Agdia.Co) para la detección serológica de los siguientes virus en 96 muestras de malezas, gama de hospedantes y okra:

AMV (virus mosaico de la alfalfa), TEV (virus jaspeado del tabaco), TBSV (virus enanismo arbustivo del tomate), TSWV (virus del marchitamiento moteado del tomate), INSV (virus necrótico del impatiens), TMV (virus mosaico del tabaco), PnMV (virus mosaico de poinsetia) y CMV (virus mosaico del pepino). En cada caso se incluyeron controles positivos y negativos para detectar la presencia de virus directamente en plantas de campo y gama de hospedantes.

El procedimiento utilizado fue el descrito para DAS-ELISA por Cruz y Frias (1997).

Se seleccionaron muestras positivas discriminatorias por ELISA para llevarlas a PCR y RT-PCR

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

4.4.1 Extracción y Electroforésis de RNA de doble cadena de origen viral

El procedimiento utilizado para la extracción fue el descrito por (Valverde, 1990).

El patrón electroforético fue observado en gel de poliacrilamida al 6%, el volumen por carga de pozo fue de 40 µl por muestra + 15 µl de buffer de carga.

Las condiciones electroforéticas fueron de 100 volts por 2.5 horas a temperatura ambiente. Antes del tñido de geles se sumergen en una solución de 5 ml de etanol y ácido acético al 10% agitando por 30 min. Posteriormente se tiñen con nitrato de plata 0.011 M y son fotografiados en un transiluminador de luz blanca (Sambroock, 1989)

4.4.2 Extracción de DNA

Se hizo por el método de Dellaporta, *et al*, (1983), la amplificación del ADN viral por la PCR se hizo con los oligonucleótidos MOT/CP, que amplifican un segmento de 650 pb del componente A de geminivirus y que incluye un segmento de la región común (RC).

El patrón electroforético de DNA total se realizo en geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (Tris 108g, ácido bórico 5.5g, EDTA 0.5 M 40 ml, ajustado a pH 8.0). Las condiciones de electroforésis fueron de 75 volts, con 35 ciclos de 3 min 94°C, 1min a 94°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C y 7 min a 72°C y una mezcla de primers degenerados a una concentración de 5µM y 10 µM para cada dNTP's, 1µM de DNA y 1.25 unidades de Taq polimerasa. Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en un transiluminador de luz blanca.

4.4.3 EXTRACCIÓN RNA TOTAL.

4.4.3.1 Extracción y purificación

La extracción de RNA total de muestras colectadas se realizó mediante la técnica de Isotiocionato de guanidina cloroformo desarrollada en CINVESTAV - IPN, Programa Multidisciplinario de Biomedicina Molecular b. Unidad Zacatenco, México D.F.

4.4.3.2 Síntesis de cDNA (RT)

De la muestra de RNA total se hace una mezcla con 1 µl de oligos 5' ATG GAG AAT ACA AAA ACA AAT GCC TCG y 3' TCA ATG ATC AGG TAA TAT TTC ATC TTT, y 3 µl de RNA se incuban a 72° C por 10 minutos y se centrifugan rápidamente. Posteriormente a la mezcla anterior se añade 2 µl de buffer first strand 5x, 1µl de DTT, dNTP's y RT, se incuba por hora y media a 42° C. Por medio de una transcriptasa inversa el RNA total es copiado a cDNA con la incorporación de nucleótidos modificados (aminoallyl-dUTP).

4.4.3.3 RT para PCR

Se hizo una mezcla tomando 2µl de cDNA, buffer para PCR 10x 2.5 µl, 20 µl de agua, 0.5 µl de oligo 5', 0.5 µl oligo 3', 2.5 µl de dNTP's, 2 µl de cDNA y 1 µl de Taq Pol, todo el procedimiento desde la extracción de RNA hasta PCR realizó en condiciones estériles y a 4 ° C.

4.4.3.4 Hibridación y Southern blot

El análisis de hibridación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Southern (1975). El marcaje de la sonda y la hibridación se hizo por el método radiactivo P^{32} dCTP sobre una membrana Hybond-N, que consiste en detectar la secuencia específica desnaturalizada de DNA inmovilizada en la membrana utilizando una sonda de ADN de cadena sencilla marcada radiactivamente, el híbrido formado se mantiene en el filtro, mientras que la sonda no pegada se desprende del mismo.

Las muestras de DNA con sondas marcadas fueron escindidas del plásmido TOPO de *E.Coli* por la enzima de restricción *Hind* III. El inserto viral fue separado del plásmido DNA por electroforesis, extraído de esta matriz de agarosa y marcado radiactivamente. El análisis tipo Southern se realizó utilizando DNA total por el método de Dellaporta *et al.*, (1983), este se fraccionó nuevamente por electroforesis y fue transferido a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad. Las secuencias utilizadas de oligonucleótidos 5' ATG GAG AAT ACA AAA ACA AAT GCC TCG; 3' TCA ATG ATC AGG TAA TAT TTC ATC TTT que codifican para la proteína del movimiento del virus AMV de 900 pb

V. RESULTADOS

La abundancia de malezas dentro y fuera de los predios de siembra fue constante, sin embargo en Iguala Gro. hubo una mayor población de malezas de la familia de las compuestas (mismo genero y especie).

5.1 COLECTA DE MUESTRAS

Las especies de plantas silvestres colectadas e identificadas fueron: *Euphorbia heterophilla*; *Sida rhombifolia* (L.); *Malvastrum* sp (malva), (Malvaceae); *Sida rhombifolia*, *Sida spinosa* L.; *Stachys agraria*, *Parthenium bipinnatifidum*, *Lithospermum distichilium* L., *Tridax trilobata*, *Solanum rostratum*, *Melampodium perfoliatum*; *Ipomoea purpurea* (L.).

Se observaron síntomas de mosaico, moteado amarillo severo y enanismo, en casos muy severos hay deformación de frutos y reducción de tamaño en plantas de okra. Las Malvas mostraron los mismos síntomas, mientras que plantas Plantas de nochebuena silvestre presentaron síntomas de mosaico severo y clorosis en hojas apicales. *Melampodium* no mostró síntomas aparentes.

La distribución de síntomas en plantas colectadas se registró siempre con presencia de mosaico en okra desde un 40% antes de la floración y en casos severos hasta del 90% en fructificación.

Tanto en las malezas como en cultivo estos mosaicos fueron observados con mayor severidad en las áreas cultivadas de okra, más cálidas de Iguala, y en predios cercanos a cultivos de hortalizas en Morelos.



Foto 1. El cultivo de okra en todas las colectas presentaron moteados en diferentes grados de severidad, observándose disminución y deformación fruto y lámina foliar.

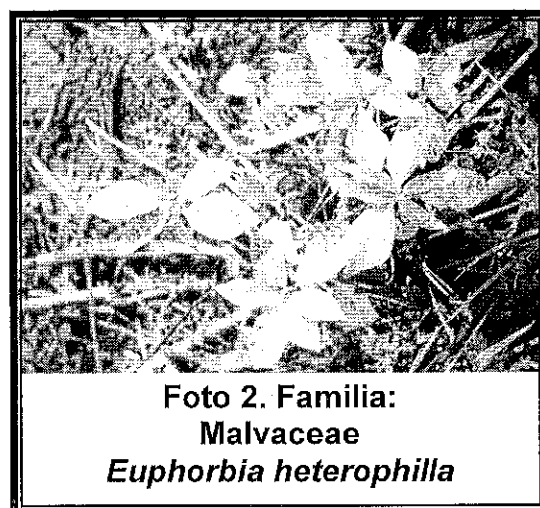


Foto 2. Las plantas de Nochebuena silvestre, siempre mostraron síntomas de mosaico severo en flores y hojas y algunas veces alargamiento de hojas.

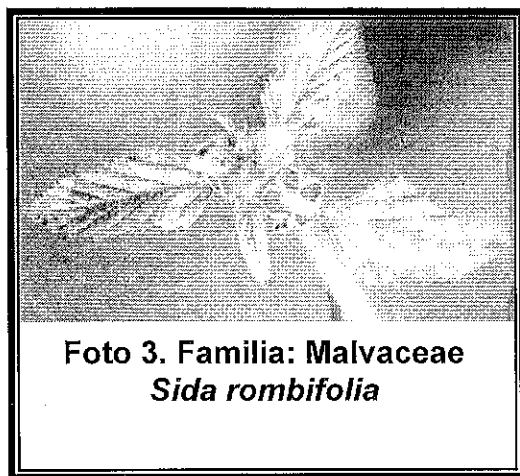


Foto 3. Las plantas de Sida en algunos casos presentaban mosaicos en hojas y flores

Las plantas de la familia Compositae, Solanaceae en todos los casos se encontraron infestadas por mosquita blanca y en casos aislados se observaron chicharritas dentro del cultivo.

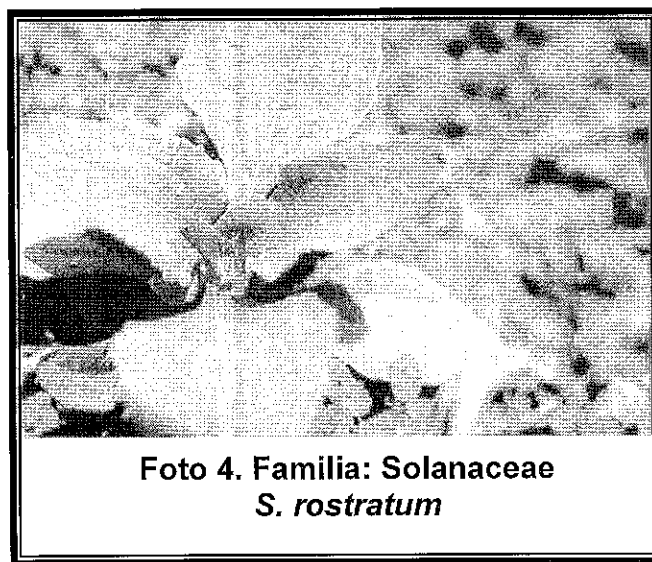


Foto 4. Algunas plantas de la familia de las Solanaceas presentaron clorosis ligera

Ejemplares de la familia Convolvulaceae tuvieron una ocurrencia muy baja en relación a las Compuestas y Malvaceas.

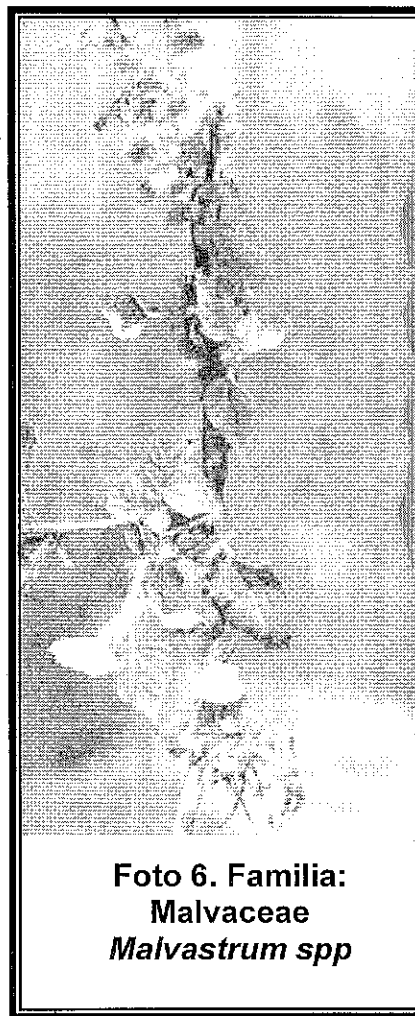
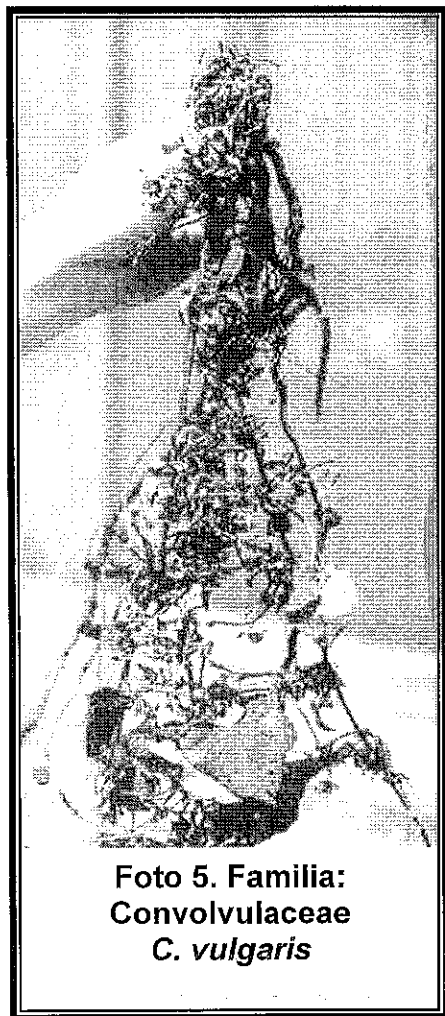


Foto 5 y 6 Ambas muestras fueron colectadas con severa deformación en ramas, hojas y raíz. Durante su conservación en invernadero siempre estuvieron presentes los síntomas mostrados

5.2.1 Transmisión mecánica

Para la selección de plantas indicadoras y diferenciales se tomó en cuenta la sintomatalogía presentada por algunas de las indicadoras antes mencionadas.

Los principales síntomas provocados se presentan en el cuadro 1:

Cuadro 1. Sintomatología en gama de hospedantes.

Hospedantes	Familias de muestras colectadas		
	Compositae	Malvaceae	Convolvulaceae
<i>N. rustica</i>	• Moteado • Arrugamiento de hojas		
<i>N. tabacum var. Xanthi</i>	• Moteado severo	• Moteado, clorosis ligera	
<i>N. glutinosa</i>	• Jaspeado • deformación de hojas • necrosis foliar • Arrugamiento • clorosis leve de hojas		
<i>C. annuum</i>		• clorosis	• deformación de lámina foliar
<i>P. vulgaris</i>			• manchas cloróticas leves • anillados necróticos insipientes •
<i>D. stramonium</i>	• Lesiones cloróticas	• Rigidez foliar • Lesiones cloróticas incipientes • Arrugamiento foliar • Deformación de botones florales	
<i>L. esculentum</i>	• Deformación de hojas, epinastia, • aclaramiento intervenla u • obscurecimiento de venas • endurecimiento de hojas	• Deformación de hojas • Lesiones cloróticas • Obscurecimiento de venas • Anillos necróticos concentricos	
<i>Ipomoea spp</i>	• Anillos necróticos		

C. quinoa e *Ipomoea sp* manifestaron ligeras clorosis y puntos necróticos incipientes respectivamente, *C. amaranticolor* no presento ninguno. No fue posible la transferencia mecánica de muestras de solanaceas.

5.2.2 Transmisión okra gama de hospedantes.

C. annum: Toda la planta presenta deformación severa, enanismo y deformación de frutos. Síntomas similares a los presentados en campo por okra y algunas hortalizas cercanas.

D. stramonium L.: Deformación severa, en algunos casos con moteado incipiente, los botones florales a los 3 ó 4 días se caen.

El 40% de la inoculación de muestras colectadas a okra sana presentaron mosaico y deformación en hojas inoculadas después de 5 días.

Plantas sanas de okra inoculadas con algunas plantas silvestres sanas fueron inoculadas con los aislamientos correspondientes a cada una, reproduciéndose en ellas los mismos síntomas observados en el campo.

5.2.3 Transmisión por semilla.

Del lote de macetas sembradas con semilla el 75% de las plantas presentaron malformación de hojas y mosaico entre los 16 y 20 días después de la emergencia.

5.2.4 Transmisión por injerto

Los injertos de okra enferma a okra sana, mostraron transmisión viral en la rama injertada; igualmente sucedió con *C. annum* y *N. glutinosa*.

En *P. vulgaris* la transmisión fue sistémica a los 6 días después del injerto. En plantas de *C. amaranticolor* no hubo ningún efecto.

5.3 PRUEBAS SEROLÓGICAS DE DETECCIÓN

VIRAL

5.3.1 DAS-ELISA

En las infecciones causadas por Malva, Nochebuena y *Melampodium*, hay un patrón claro y consistente con la sintomatología y pruebas serológicas verificadas para AMV y TEV (fotos 7,8 y 9).

Las fotografías muestran diferentes grados de daño.

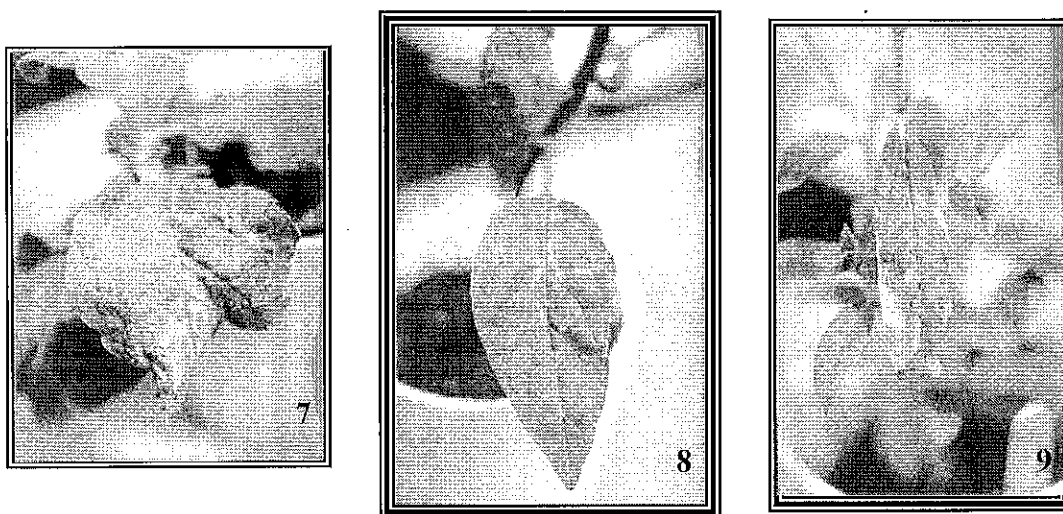


Foto 7y 8. *N. tabacum* muestra arrugamiento y lesiones necróticas, que con el tiempo invaden la lámina foliar y *D. stramonium* exhibe un moteado irregular, en hojas inoculadas la deformación es severa ambos son síntomas característicos de TEV. **9** *G. globosa* con lesiones necróticas crecientes iniciando en hojas inoculadas para posteriormente infectar los brotes nuevos, característico del AMV.

Por otro lado, muestras diferentes inoculadas de la misma fuente, incluyendo la fuente original, por esta misma prueba no siempre dieron positivo por ELISA

Muestras sometidas a DAS-ELISA de plantas de *Solanum rostratum*, la mayoría de las veces dieron positivo para todos los antígenos probados.

En varias muestras se detectó la presencia de dos virus al parecer interactuando, la determinación se hizo sobre plantas infectadas de *G. globosa*, frijol, *Datura* y calabaza. Los síntomas que mostraron estas plantas eran similares a los del mosaico de la calabaza, si bien dichas plantas estaban infectadas con el CMV. En cambio, las plantas de *C. annuum*, *D. stramonium* y *L. esculentum*, fueron negativos para AMV pero exhibieron la sintomatología típica de geminivirus y sólo este virus fue “recuperado” de ellas aparentemente al inocularse manualmente muestras de estas plantas sobre las otras indicadoras.

Cuadro 2. Gama de hospedantes positiva por DAS-ELISA

Plantas positivas en pruebas de transmisión	
<i>Ipomoea sp</i>	TMV
<i>P. vulgaris</i>	AMV
<i>G. globosa</i>	AMV, TSWV
<i>C. annuum</i>	TBSV
<i>N. glutinosa</i>	TEV, TMV
<i>C. album</i>	-
<i>C. amaranticolor</i>	-
<i>C. quinoa</i>	-
<i>D. stramonium</i>	TBSV
<i>N. Benthamiana</i>	INSV
<i>N. tabacum</i>	TEV, CMV, TMV
<i>L. esculentum</i>	No identificado

Las fotografías 10 y 11 los síntomas característicos de las infecciones virales

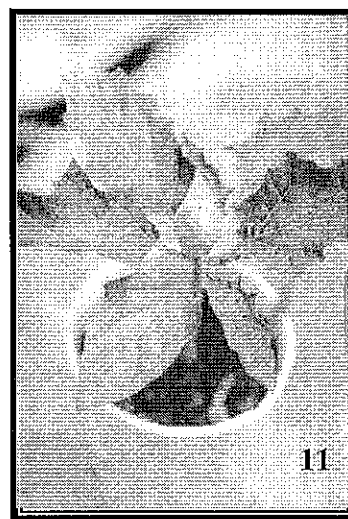


Foto 10. *C. annum* presenta hiponastia, lesiones cloróticas, reducción y deformación de hojas y frutos. **11.** *D. stramonium* muestra endurecimiento de hojas con un patrón moteado sistémico, con el tiempo el botón floral se torna clorótico y se cae.

En algunas siembras localizadas en los alrededores de Mazatepec y Temixco, Morelos, frecuentemente las plantas de okra mostraban síntomas más severos que los provocados por geminivirus, caracterizados por deformación pronunciada del follaje, con apariencia de arrugado, retorcido y de textura más gruesa que lo normal. En pruebas serológicas realizadas a este material, consistentemente se recupero el AMV y ocasionalmente del mismo material además de malva y nochebuena silvestre también el CMV.

Las muestras directas de *Melampodium*, malva y Sida estaban infectadas con diversos virus, de los cuales fue posible identificar INSV, TSWV, TBSV y TEV.

El material enfermo de malváceas frecuentemente estaba doblemente infectado por el TBSV y otro u otros no identificados.

Aislamientos del TSWV procedentes de plantas enfermas de Nochebuena produjeron un tenue moteado casi imperceptible en plantas sanas de esta especie inoculadas mecánicamente, siendo el virus recuperado al ser inoculado este material sobre las plantas indicadoras del AMV. Cuando ocurrían juntos, el TSWV se separó del AMV mediante transmisión no persistente, al inocularse estos aislamientos del AMV sobre plantas sanas de *G.globosa* y *N. tabacum* var. xhanti, mostraron moteado y deformación severa del follaje respectivamente.

5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

5.4.1 Extracción y electroforesis de RNA de doble cadena de origen viral.

Muestras de tejido fresco de hojas jóvenes de malezas colectadas se sometieron a extracción de RNA dc Los patrones electroforéticos observados en el gel de poliacrilamida al 6% muestran la presencia de los virus RNA comparado con los patrones conocidos y una banda menos pesada al parecer correspondiente al virus acompañante de CMV, CARNA-5 identificado previamente por De la torre y colaboradores (2000).

Fig 1 Patrón electroforético de RNA dc de muestras de campo

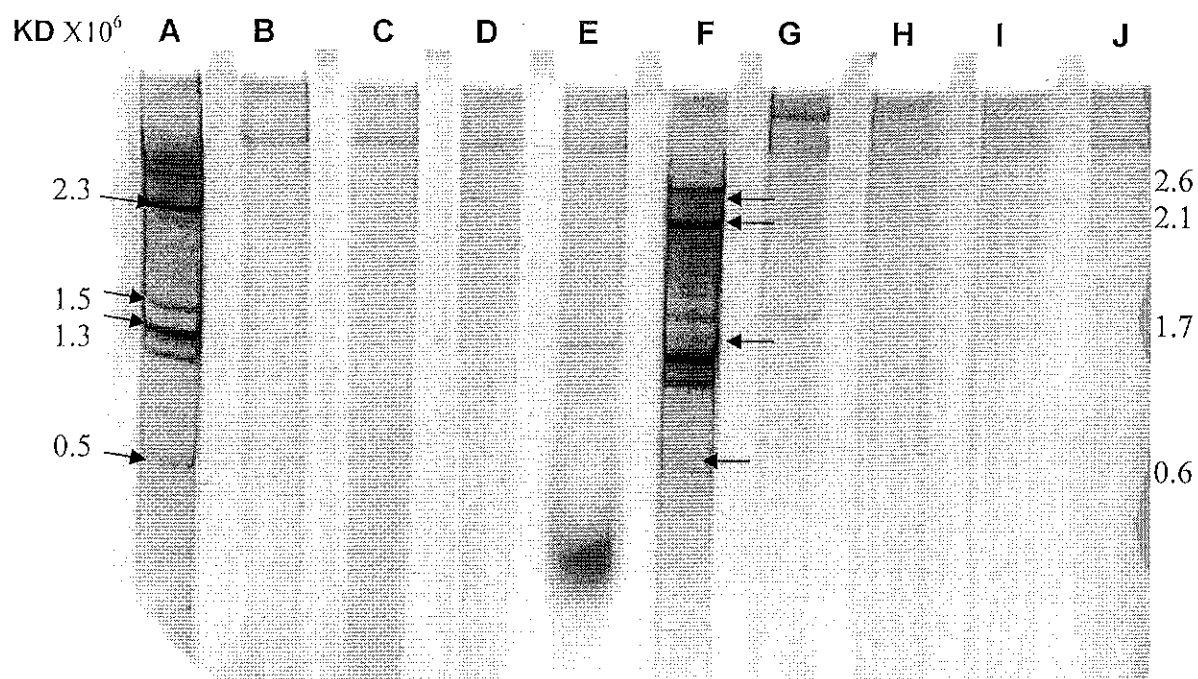


Fig 1 A. Positivo AMV B. *M. perfoliatum* C. *Sida rombifolia* D. *Malvastrum* spp E. *E. heterophilla* F. Positivo CMV G. *Solanum* sp H. *Sida spinosa* I. *Bidens odorata* J. *Pharbitis nil*.

5.4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

5.4.2.1 Detección de Geminivirus

De las muestras colectadas de malezas solo *M. perfoliatum* fue consistente en la amplificación del fragmento de 650 pb esperado para geminivirus. La okra colectada en campo también fue positiva para el mismo virus. La figura 2 muestra fragmentos similares obtenidos de plantas diferenciales inoculadas mecánicamente en *L. esculentum*, *C. annun* y *P. vulgaris*. La malva siempre estuvo presente con un fragmento de menor peso.

Fig. 2 y 3 Perfiles electroforéticos de PCR en muestras de campo e indicadoras

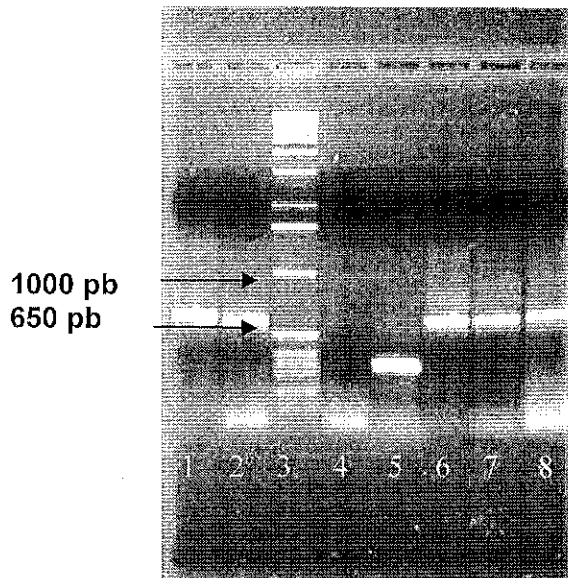


Fig 2 Carril 1. *P.vulgaris/okra* 2. *L.esculentum/M.perfoliatum* 3. marcador 4. planta sana 5. *Malvastrum spp* 6. *C. annum/okra* 7. *M. perfoliatum* 8. positivo.

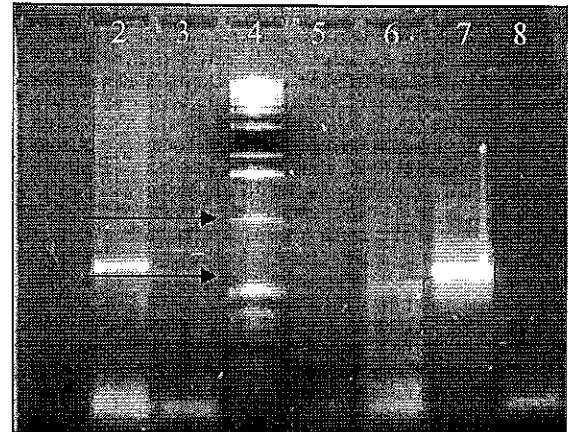


Fig 3 Carril 2. *P. vulgaris/okra* 3. *P.distilium* 4. Marcador 6. *S. rombifolia* 7. *M perfoliatum* 8. planta sana

Otras muestras frecuentemente mostraron perfiles diferentes, al esperado para geminivirus, los cuales no fue posible identificar en el momento de análisis.

5.4.3 TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

5.4.3.1 Detección e identificación de virus RNA por RT

Solo las muestras de *Malva sp* y *E. heterophilla* mostraron las bandas esperadas para los virus AMV de 900 pb y 850 pb del CMV.

Se seleccionaron muestras de tejido fresco de *E. Heterophilla*, *Malva sp*, *N. glutinosa* y *G globosa* por ser consistentes en patrón sintomatológico por gama

de hospedantes y serología ambas con síntomas de mosaicos amarillo. Sin embargo, pruebas posteriores con muestras positivas para CMV resultaron negativas sin recuperarse, lo mismo sucedió con muestras directas de malva.

La fig. 4 Muestra el perfil fragmentado de DNA de las muestras colectadas en campo y las plantas indicadoras positivas por ELISA.

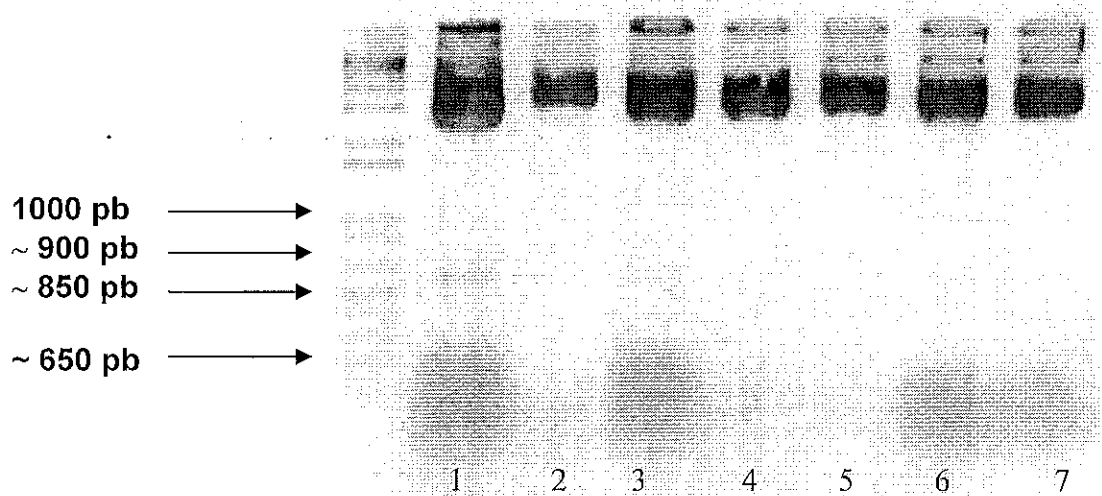
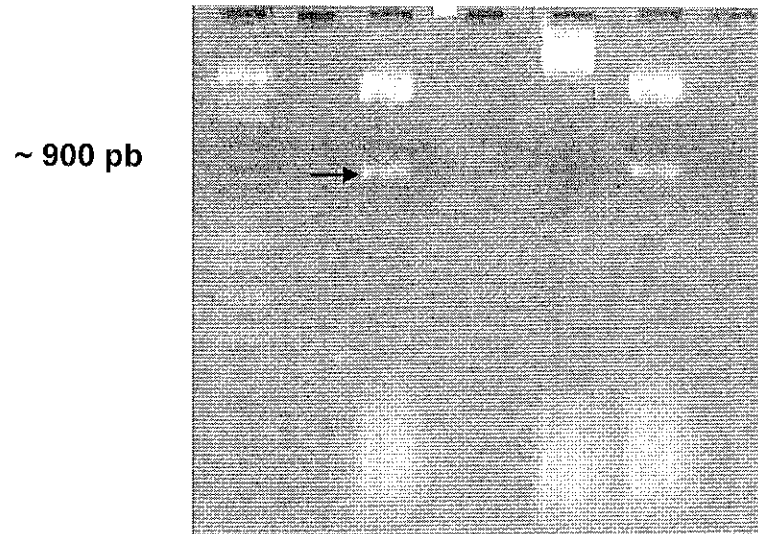


Fig. 4 Carril 1 *S. spinosa* 3 *N. glutinosa* 6 *E. heterophilla* 7 *G. Golobosa*

Se obtuvieron 3 clonas de AMV insertado en plásmidos bacterianos de *E. Coli*, una vez digerido éste y recuperado el ADN se utilizaron los oligos 5' ATG GAG AAT ACA AAA ACA AAT GCC TCG; 3' TCA ATG ATC AGG TAA TAT TTC ATC TTT que codifican para la proteína del movimiento del virus AMV de 900 pb, su amplificación en RT-PCR dio un patrón electroforético en el que se observan los fragmentos esperados comparados con un marcador general.

Las plantas diferenciales en la que se ha conservado el virus son *G. globosa* y *N. tabacum*.

La **Fig. 5**. Patrón electroforético PCR. Comprueba la presencia amplificada de DNA transcrito a partir de RNA del patrón esperado para AMV de 900pb que codifica para la proteína del movimiento.



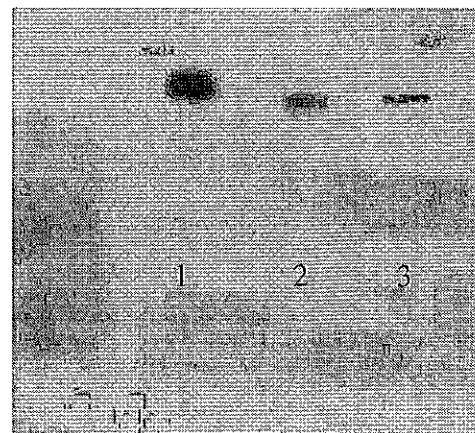
**Fig. 5 Carril 1 marcador 3. Plásmido de *E. Coli* digerido
5. Vértor 6. *E. heterophilla***

5.4.3.2 Hibridación molecular

A través de la hibradación tipo Southern se logró una transferencia positiva del fragmento de AMV de 900 pb extraído de *E. heterophilla*.

Fig.6 Souther blot para AMV

- 1 vector + inserto**
- 2 Digestión**
- 3 Sonda AMV-mp**



VI. DISCUSION

Las familias dominantes en orden de importancia por el número de especies encontradas fueron las Compuestas, Malvaceas, Convolvulaceas y Solanaceas; siendo la compuesta *Melampodium perfoliatum* y *Sida rhombifolia* las especies más abundantes y siempre presentes en los sitios de muestreo, excepcionalmente *M. perfoliatum* mostró síntomas ligeros de clorosis, mientras que *Malvastrum spp* solo se encontró en Morelos.

Varias malezas que mostraron síntomas y que fueron encontradas dentro y en los alrededores de las parcelas, resultaron infectadas con geminivirus y otros virus aún sin presentar enfermedad aparente. *Melampodium perfoliatum*, *S spp* y *S. rostratum* son particularmente importantes por ser plantas perennes y hospederas de vectores; Jovel, *et al.*, citado por Garzón-Tiznado en 2002 señala a estas mismas malezas y a dos especies de *Sida spp* como hospedantes alternos de geminivirus en el cultivo de pepino en Costa Rica, los perfiles electroforéticos muestran efectivamente fragmentos correspondientes posiblemente a otros geminivirus en *Sida rhombifolia*, *Malvastrum* y *esporádicamente en M. perfoliatum*.

Por gama de hospedantes, se logro reproducir los síntomas característicos de la infección causada por geminivirus en *C. Nahum* y *D. stramonium*, coincidiendo con las transmisiones logradas por Brunt, (1996) del virus de las venas amarillas de la okra (BYNMY) y al virus del enrollamiento de la hoja (OkLCV).

La transferencia por semilla se logro sin coincidir con algún reporte revisado, cabe señalar que de las plantas provenientes de esta semilla enferma no se logro una re transmisión a plantas sanas de okra.

De los injertos logrados se verificaron algunos patrones sintomatológicos de mosaicos, Fami, (1999) reporta al mosaico de la okra (Tymovirus) como transmisible mecánicamente y solo reproduce estos mosaicos sin percepción de otras alteraciones visibles; por otro lado, la deformación en hojas jóvenes e hiponastía de las ramas injertadas, fue similar a lo señalado por Bunt, *et al.*, (1996) como el síntoma característico para el virus del enrollamiento de la hoja de la okra (geminivirus).

El virus INSV encontrado en algunas Convolvulaceas está reportado por Brunt, (1995), como agente infectivo para la okra, sin embargo es este trabajo no se pudo detectar por DAS-ELISA en la okra pero si en solanáceas.

Los síntomas que exhibieron varias plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con malezas, eran semejantes a los descritos en la literatura para virus CMV, AMV, geminivirus y CdTV, TYLCV principalmente, estos últimos no fueron detectados en las muestras probadas (Brunt, 1996; Brown, *et al.*, 1988; Davis, 2000; Garzón-Tiznado, *et al.*, 2001).

Sin embargo, muchos de los síntomas descritos arriba desaparecían en invernadero, cambiando a plantas aparentemente sanas ó cambiando la sintomatología observada en campo sugiriendo que esto podría relacionarse con la estacionalidad, la estadía y abundancia de malezas perennes y anuales

con la época de siembra de cultivos en la región (observaciones directas en predios de Morelos con cultivos hortícolas). Sing y Mazumber, (1996), indican que los períodos de altas temperaturas, sequía y baja humedad relativa son condiciones ideales para el desarrollo de vectores como *B. tabaci*, o bien pudieran tener relación con las labores mecánicas y manuales hechas al cultivo, promoviendo la diseminación de la infección propia o de sus vectores.

Se evidenció la presencia de un virus de bajo peso molecular CARNA-5 acompañante del virus mosaico del pepino (CMV), reportado anteriormente por De la Torre *et al.*, (2000).

Por otro lado, se demuestra que la sintomatología observada en plantas de okra corresponde esencialmente a causas de origen viral, las pruebas moleculares de PCR refuerzan la hipótesis que estas infecciones ocurren en asociación múltiple, caracterizadas por moteado incipiente, deformación del follaje y fruto y en menor medida enanismo, encontrándose difundidos en todas las parcelas ubicadas en Mazatepec, Temixco, Edo. Morelos e Iguala, Guerrero.

Las muestras seleccionadas infectadas con geminivirus detectados en pruebas moleculares, dieron negativos en ensayos posteriores; También fueron frecuentes perfiles diferentes al esperado, sugiriendo la posibilidad de que se trate de complejos virales en los que uno ó varios de ellos se transmite en forma no persistente o sean cepas de baja virulencia.

A *E. Heterophilla* se la confirmó como portadora del virus AMV por la consistencia y persistencia en la detección del virus en todas las pruebas aplicadas y en concordancia con los resultados reportados por Debrot, y Centeno en 1986 que además identifican al virus PnCV (virus críptico de poinsettia), obtenido de otras especies de *Euphorbia*.

CONCLUSIONES

Se determinó en las malezas la presencia de complejos de virus RNA, como el AMV, CMV ligado a un virus de bajo peso molecular acompañante probablemente CARNA-5; y virus DNA, geminivirus bipartita y probablemente un complejo formado al menos por uno transmisible por semilla.

Los resultados de las pruebas por inmunodetección DAS-ELISA indican que los mosaicos de las malezas estudiadas, están relacionados al menos serológicamente con los mosaicos de la okra.

El uso de la PCR como herramienta de diagnóstico molecular es útil en la detección de fragmentos virales, pero resulta deficiente cuando no se cuenta con los iniciadores específicos.

Se comprobó la presencia de AMV en *E. heteropilla* presente dentro de las parcelas cultivadas con okra mediante la aplicación de gama de hospedantes, Rt-PCR e Hibridación tipo Southern.

La determinación de las plantas que son hospederas naturales de los virus involucrados, es de suma importancia para su control, tal es el caso de las compuestas y solanáceas colectadas en los predios de estudio. La identificación de estos hospedantes alternos como fuente primaria de infección podría fundamentar el diseño de esquemas espaciales y temporales de siembra de las hortalizas más frecuentes en dicha zona, y también permitiría valorar la necesidad real de controlar a las plantas silvestres en los alrededores

de los campos de cultivo en tanto sea posible conocer los mecanismos de control eficaz y proveer de variedades comerciales aptas para cada región de este y otros cultivos. El control debe continuar basándose en el conocimiento de las relaciones entre el micro y macro ambiente.

VIII. LITERATURA CONSULTADA

Bos, L. 1983. Ecology and control of virus induced diseases of plants a critical synopsis. *Adv. Applied Biol.* 7: 105-173.

Briddon R. W. 2000. Diagnosing tomato yellow leaf curl virus. Network, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich, *Phytopathology* 90:S9.

Brown, J. K. and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* 76:220-225.

Brunt, A. A. Crabtree, K. (1996 onwards). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL

Brunt, A. A. 1997. Known susceptibilities of Malvaceae. In:

<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

Cárdenas, Soriano Elizabeth. 1999. Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales, microscopía electrónica y rango de hospedantes. CP. Montecillo, México. pp147

Celebi-Toppak F. 2000. Resistance to cucumber mosaic virus in potato appears to be temperature sensitive. *Plant Pathology*, Cornell University, Ithaca, NY

Clark, M. F. and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

- Davis** M. J. 2000. Weed hosts of tomato yellow leaf curl virus in Florida. Tropical Research and Education Center, University of Florida. Phytopathology 90:S18.
- De La Torre**, A. R. 2000. XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. P 239
- Dellaporta**, S. L., J. Woods and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
- Dijkstra**, J. and C. P. De Jager. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and exercises. Edit: Springer, Berlin. pp 459
- Debrot** E F. Centeno. 1986. Ocurrencia del virus Mosaico de las Euphorbiaceas infectando a Euphorbia heterophylla L. en Venezuela. FONAIAP. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay Venezuela
- Fami**, L.A. 1976. Mosaic Virus and leaf curl in Nigeria. PANS 22(4) 474-478p
- García**, M. E. 1989. Apuntes de Climatología. Facultad de Ciencias, UNAM., México D. F. 120 p
- Garzón-Tiznado**, J. A., I. Torres-Pacheco., J. T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella. and R. Rivera-Bustamante. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. Phytopathology 83:514-521.
- Hewitt**, WB y L Chiarappa. 1977. Plant health and quarantine in virus multiplication. Genetic Resources. CRR Press Cle.
- Jaramillo**, VJ. 1993. El cultivo de la okra. Programa de hortalizas y Frutales CNIA. Palmira, Colombia. P 15.
- Kurstak**, E. 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp 935

- Lotrakul**, P., R. A. Valverde, C. A., J. Sim, and R. De La Torre. 1998. Detection of a Geminivirus Infecting Sweet Potato in the United States. *Plant Dis.* 82: 1253-1257.
- Matthews**, REF. 1991. Factors influencing the course of infection and disease. *Plant virology*. Ap New York.
- Matthews**, REF. 1993. *Plant virus diseases*. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 15-77
- Martinelli**, P. G. 1990. Tomato bushy stunt tobamovirus. In: Brunt, A. et al., (1996 onwards). *Plant viruses on line : Descriptions and lists from the VIDE Database*. Versión 20. 1996. URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>
- Martin** E.M, K. S. Kim. 2000. Characterization of an icosahedral virus isolated from peach with mild mosaic symptoms: a possible new plant virus. *Phytopathology* 90:S49.
- MacDonald** S. S. Tolin B. Nault y J. Reid. 2000. Field spread of TEV in Jamaican hot pepper variety. *Phytopathology* 90:S50.
- May**, B.W. 1985. *Virology. A practical approach*. Edit: Oxford University Press. NY. pp 5-7
- Mehta**, P., J. A. Wyman, M. K. Nakhla and D. P. Maxwell. 1994. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* with 2 tomato infecting geminiviruses. *Journal of Economic Entomology* 87: 1285-1290.
- Moggi** G. and L. Giugnolini. 1983. *Simon & Schuster's guide to Garden Flowers*. Edit: Fireside Book, New York. 511 p.
- NCBI. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

- Padidam**, M., R. N. Beachy and C. M. Fauquet. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General Virology* 76: 249-263.
- Pereyda** H, UA Ayvar, SS Noriega. 1998. Diagnóstico y experimentación de estrategias contra el amarillamiento de la okra (*Abelmoschus esculentus*) M. Tercer Foro Estatal de estudios sobre Guerrero. Chilpancingo Gro. s/p
- Rojas**, M. R., R. L. Gilberston, D. R. Russell and D. P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the Polymerase Chain Reaction to detect whitefly-transmitted Geminiviruses. *Plant Disease*. 77: 340-347.
- Regenmortel**, M. H. V., D. H. Bishop, C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff and C.H. Calisher. 1997. Guidelines to the demarcation of virus species [news]. *Archives of Virology* 142: 1505-1518.
- Sambrook**, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Southern**, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Mol. Biol.* 98:503-517.
- Surzycki**, S. 1999. *Basic techniques in molecular biology*. Springer-Verlag Berlin. pp 233-262.
- Sambrook** J. y D. Russell. 2000. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (3ª edición) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAGAR-CICEA**. 1997. *Estadística Agropecuaria*. P 394-396.
- SAGARPA**. 2003. *Estadísticas Agropecuarias*.

- Singh, S. J.** 1990. Etiology and epidemiology of withefly-transmitted virus diseases of okra in India. Indian Inst. Of Horticultural research, Bangalore 560 089. Plant disease Research. 5:1, 64-70
- Walkey, D.G. A.** 1986. Applied Plant Virology. Edit: John Wiley & Sons. New York. pp 329
- Wu, Z. C., J. S. Hu, J. E. Polston, D.E. Ullman, and Hiebert.** 1996. Complete Nucleotide sequence of a nonvector-transmissible strain of Abutilon mosaic Geminivirus in Hawaii. Phytopathology 86:608-613.