



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE DNA Y RNA ASOCIADOS AL
CULTIVO DE TOMATE CASCARA (*Physalis ixocarpa* Brot)**

TESIS

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

PRESENTA:

CANEK MENDOZA FLORES



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

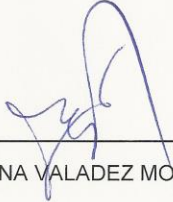


Chapingo, Estado de México, junio 2016

La tesis titulada, **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE DNA Y RNA ASOCIADOS AL CULTIVO DE TOMATE CASCARA (*Physalis ixocarpa* Brot)** fue realizada por Canek Mendoza Flores bajo la dirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, ha sido revisada por el H. Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

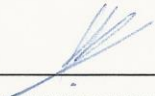
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR _____ DRA.

ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR _____ DR.

NAHUM MARBAN MENDOZA

ASESOR _____ DRA.

ELSA VENTURA ZAPATA

Chapingo, Estado de México. Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, por haber permitido realizar mi maestría.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por dirigir la presente investigación, por su confianza, conocimientos y amistad.

A la Dra. Elsa Ventura Zapata y al Dr. Nahúm Marbán Mendoza por su colaboración y asesoría durante el trabajo práctico de esta investigación.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, en especial al técnico Mario por haberme proporcionado los controles positivos utilizados en esta investigación.

Al CONACyT por la beca brindada para poder realizar los estudios de maestría.

A mis hermanos Jorge Mendoza y Carmina Mendoza

A mis amigos de la generación 54 de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal por brindarme su amistad su apoyo y su compañerismo durante este tiempo con ellos.

A todos mis amigos de las demás generaciones a Lucio Delesma, Marco Maidana.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos para enriquecer los míos.

DEDICATORIA

Dedicado para mis madres, Esperanza Flores Aguilar y Julia Ortega Serrano y padre Jorge Mendoza, cariño y comprensión.

A mis hermanos, Jorge Mendoza Ortega y Carmina Malinali Ortega, por su

Por su apoyo

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en México DF el 18 de mayo de 1979, realice mis estudios de media superior en el C.E.C.y.T. No 11 Wilfrido Massieu del Instituto Politécnico Nacional.

Realice mis estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo.

Realice estudios de Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS.....	7
REVISIÓN DE LITERATURA	7
Clasificación botánica del tomate cascara (<i>Physalis ixocarpa Brot</i>).....	8
Botánica	8
Generalidades de los Virus.....	11
Virus fitopatógenos	12
Transmisión de los virus	14
Plagas del tomate	16
Virus relacionados con el tomate de cáscara en México	16
Síntomas ocasionados por enfermedades virales	17
Virus de DNA que afectan al tomate	19
Virus de RNA que afectan al tomate	21
Producción y uso de semillas sanas	23
Técnicas moleculares en la detección de virus	24
Uso de la bioinformática	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Fase de Campo	29
Plantas diferenciales para controles positivos.....	31
Extracción de DNA	32
Extracción de RNA	32
Cuantificación de DNA y RNA	33
Calidad de DNA y RNA	34
Trascricpción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	34
Iniciadores (oligonucleótidos) utilizados	35
Detección de virus de DNA (geminivirus) asociado a <i>Physalis ixocarpa</i> ... Brot	35
Evaluación de iniciadores para los virus de RNA asociados a <i>Physalis</i> <i>ixocarpa Brot</i>	36

PCR para la detección de virus de DNA y RNA asociado a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	38
Evaluación de la funcionalidad de primers mediante PCR In Silico	39
Análisis de resultados.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Extracción de DNA y RNA.....	40
Identificación de virus en plantas de tomate	41
Identificación de geminivirus con los primers PAL1v1978- PAR1c496 ..	41
Identificación de geminivirus con los primers AV494- AC1048	43
Identificación de virus PHV	44
Identificación de virus TPV	45
Identificación de virus AMV	46
Identificación de virus TEV	47
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXO 1. Genomas de virus.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1. Genoma de un Begomovirus bipartita.....	21
Figura 2. Gel de calidad al 0.8 % de agarosa de muestras de DNA de Atlixco, Puebla.....	42
Figura 3. Gel de calidad al 0.8% de agarosa de muestras de RNA de Atlixco, Puebla.....	42
Figura 4. Gel de calidad al 0.8% de agarosa de muestrad de RNA de Iguala, Guerrero.....	43
Figura 5. Gel de agarosa al 2.2 % de muestras de tomate para la identificacion de geminivirus.....	44
Figura 6. Gel de agarosa al 2.2 % de muestras de tomate para la identificacion de geminivirus.....	46
Figura 7. Gel de agarosa al 2.2 % de muestras de tomate para la identificacion de virus PHV.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales estados productores de tomate de cascara.....	9
Cuadro 2. Análisis general y contenido nutricional del tomate de cascara (<i>Physalis ixocarpa</i> , Brot) sobre la base de 100 gr de fruto.....	10
Cuadro 3. Plagas del tomate	15
Cuadro 4. Características de los géneros de la familia Geminiviridae.....	20
Cuadro 5. Lista de materiales de plantas de tomate obtenidas de campo.....	30
Cuadro 6. Mix para síntesis de cDNA	35
Cuadro 7. Temperaturas y tiempos para síntesis de cDNA.....	36
Cuadro 8. Secuencias de iniciadores para la detección de virus de DNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	37
Cuadro 9 Secuencias de los iniciadores para la detección de virus de RNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	39

Identificación molecular de virus de DNA y RNA asociados al cultivo de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.)

Molecular identification of DNA and RNA viruses associated with the tomato husk (*Physalis ixocarpa* Brot.) crop

Canek Mendoza Flores¹, Ernestina Valadez Moctezuma²

Resumen

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) es una especie originaria de México, ocupa el quinto lugar en superficie cultivada (46,524 ha.). Sin embargo, el rendimiento y calidad son afectados por enfermedades causadas por virus, con pérdidas del 30 al 100% en rendimiento. El objetivo del presente trabajo fue, Identificar virus de DNA y RNA en plantas de tomate de cáscara con síntomas de virosis. Se colectaron plantas con síntomas de virus en las regiones de Atlixco, Puebla; Iguala, Guerrero; Irapuato, Guanajuato y Zacatepec, Morelos. Se realizó extracción de DNA y RNA de plantas y semillas para identificar virus por medio de las técnicas de PCR y RT-PCR. Se identificaron a los siguientes virus: Virus Huasteco del Chile (PHV), Virus Texano del Chile (TPV), Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus Jaspeado del tomate (TEV) y Virus Mosaico del Tabaco (TMV) en plantas de tomate en las regiones mencionadas.

Palabras clave: Virosis, detección, primer específicos, transcripción reversa.

Abstract

The tomato husk (*Physalis ixocarpa* L.) is a species native to Mexico; it ranks fifth in cultivated area (46,524 ha). Nevertheless, the yield and quality are affected by diseases caused by viruses, with yield losses of 30 to 100 %. The aim of this work was to identify DNA and RNA viruses in tomato husk plants with symptoms of viral diseases. Plants with virus symptoms were collected in the regions of Atlixco, Puebla; Iguala, Guerrero; Irapuato, Guanajuato and Zacatepec, Morelos. DNA and RNA extraction from plants and seeds was performed to identify the virus by PCR and RT-PCR. We identified the following viruses: Pepper Huasteco Virus (PHV), Texano Pepper Virus (TPV), Alfalfa Mosaic Virus (AMV), Tobacco Etch Virus (TEV) and Tobacco Mosaic Virus (TMV) in tomato plants in the regions mentioned.

Keywords: virus diseases, detection, specific primer, reverse transcription.

¹Estudiante de Maestría. Maestría en Protección Vegetal. Departamento de Parasitología. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco Km 38.5, Chapingo, 56230. Texcoco de Mora, Estado de México. E-mail: canekmef@hotmail.com.mx.

²Profesora-investigadora. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco Km 38.5, Chapingo, 56230. Texcoco de Mora, Estado de México. E-mail: nestty56@yahoo.com.mx.

INTRODUCCIÓN

El tomate verde también conocido como tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) es una especie originaria de México, asociada a la vertiente del pacífico, donde aún es posible hallársele en forma silvestre, en una franja que va desde Centroamérica (Guatemala) hasta California (Marín, 2010). Otros autores como Vavilov, 1992 consideran que el tomate verde es originario del sur de México. Actualmente, crece en forma silvestre entre los maizales. Dentro del género *Physalis*, se ha estimado que existen alrededor de 80 especies, confinado en su gran mayoría a zonas templadas y tropicales de América. De todas las especie de este género, aproximadamente 70 se encuentran en México y este cultivo se ha manejado desde épocas precolombinas, teniendo una importante participación en la dieta de la población (Peña, 2001).

El tomate verde es una hortaliza de gran importancia económica y tradicional, su consumo se remonta desde épocas prehispánicas, se considera como un ingrediente básico en la cocina mexicana, debido principalmente a la elaboración de salsas y otros guisados hechos a partir de este fruto. Además, de la importancia que tiene en su contenido nutricional, en vitaminas y minerales. La cadena agro alimentaría de tomate verde de cáscara tiene una importancia relevante para el país, debido principalmente a que participan una gran cantidad de actores en todos los eslabones de la cadena, especialmente en el sector primario integrado por productores con pequeñas propiedades. Es producido prácticamente en todo México, extendiéndose hasta Colombia. En México se destacan la zona centro-sur y pacifico-norte (Peña, 2001). Se cultiva comercialmente en todas las entidades del territorio mexicano, su producción se

destina al mercado nacional y a la exportación. En México, el tomate de cáscara ocupa el quinto lugar en cuanto a superficie cultivada, ya que en 2014 se sembraron 46,524 ha, siendo Jalisco, Sinaloa, Puebla, Michoacán, Estado de México y Sonora los principales estados productores. Teniendo una producción nacional de alrededor de 661,141.11 toneladas (SIAP, 2014). Del tomate de cáscara se utiliza, actualmente, su raíz, tallo, hojas, fruto, cáliz; con fines comestibles, medicinales, industriales, ornamentales, como trampa vegetal, forrajera, como juguete o ceremonial. El fruto de tomate de cáscara está constituido en su mayoría por agua (93.3%). Además, contiene cenizas, proteínas, grasas, fibra cruda y carbohidratos asimilables; vitaminas como niacina y ácido ascórbico; minerales como calcio, hierro y fósforo (SNICS, 2013). Por lo anterior, sus frutos tienen gran demanda como condimento en las comidas Mexicanas, usándolo en la preparación de salsas y platillos típicos (López, 2009). En el SNICS se tienen registradas 11 variedades mexicanas: Diamante, Manzano, Tepetlixpa, Milpero Tetela, Potrero, Puebla SM3, Rendidora, Salamanca, Tamazula SM3, Tecozautla 04, Yema de Huevo, y CHF1-Chapingo, ésta última es la primera variedad protegida mexicana, obtenida por la Universidad Autónoma Chapingo (SNICS, 2013). Se tienen más de 1000 accesiones colectadas, con lo que se asegura su conservación y su acceso a los programas de investigación, entre cuyos avances se tiene la caracterización de variedades de uso común, programas de fitomejoramiento participativo y la generación de nuevas variedades, todo ello en beneficio de los agricultores (SNICS, 2013).

Para cualquier país, los cultivos agrícolas representan no solo una fuente de productos alimenticios para la población, sino también una actividad que genere beneficios económicos y empleo para muchas personas. Sin embargo, la gran diversidad de los cultivos es constantemente atacada por plagas que provocan enfermedades, mermando considerablemente las ganancias de los productores (Anaya *et al.*, 2011). Las enfermedades ocasionadas por organismos fitopatógenos constituyen uno de los factores que más afectan a la producción agrícola, ya que no solo provocan pérdidas cuantiosas, sino que limitan el potencial del cultivo a ciertas áreas; debido a esto, el desarrollo de la agricultura se ve obstaculizado y la economía de los agricultores disminuida (Cepeda *et al.*, 2008).

El cultivo de tomate tiene una gran demanda aunque su producción se ve afectada por una gran cantidad de plagas, entre las que se incluyen bacterias, virus, hongos e insectos (López, 2009). El bajo rendimiento y calidad del producto son debidas a diversas causas. Las enfermedades juegan un papel importante, principalmente de tipo fungosa y viral (SAGARPA, 2000). Éste último por ser de difícil control, contribuye ampliamente a la baja producción y calidad del producto, estudios en la región centro del país registran incidencias de 60 a 100 %, y pérdidas en el rendimiento del 30 a 100% causadas por los virus: Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato aspermy virus (TAV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Tobacco etch virus (TEV), Tomato spot wilt Virus (TSWV), Potato Y virus (PVY), Alfalfa mosaic virus (AMV), Tobacco mosaic Virus (TMV) y Tomato ringspot wilt virus (TRSV), en los estados de Puebla, México y Morelos (López,

2009). Tal estudio demuestra la agresividad de los virus, si no se presta atención desde un inicio.

La necesidad de obtener plantas libres de virus, ha hecho que la investigación se oriente al desarrollo de técnicas de detección más rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retro Transcriptasa (RT-PCR) para la detección de virus fitopatógenos, y mediante la técnica de microscopía electrónica conocer la forma y tamaño de las partículas virales en los tejidos de la planta localizados en la célula (Docampo y Lenardón, 2000).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tomate (*Physalis ixocarpa* brot) es afectado por un número considerable de patógenos, tales como hongos, bacterias y virus que causan enfermedades en diferentes estadios de desarrollo del cultivo; dentro de éstos, los virus son considerados el segundo grupo de patógenos respecto al número de enfermedades que desencadenan (alrededor del 30%) y a su importancia económica.

En la actualidad no existe un método que permita la eliminación del virus una vez que este ha infectado una planta, sino que se emplean estrategias de control orientadas a prevenir o disminuir la infección o la propagación del virus o su insecto vector. Un elemento clave en el control de las enfermedades virales es la disponibilidad de métodos de diagnóstico específicos y confiables, así como el conocimiento de la epidemiología del virus en cada zona geográfica y de su variabilidad genética y biológica. Dada la importancia que representan las entidades virales por las pérdidas económicas causadas a los agricultores se

hace necesario realizar estudios orientados a la prevención y disminución de este tipo de infecciones en los cultivos, tales como aquellos basados en la identificación molecular que permitan el diseño de herramientas moleculares que sirvan en un futuro para implementar estrategias de diagnóstico rápido de virus en zonas productoras de tomate. En este estudio se consideró al cultivo de tomate de cáscara porque es uno de los más afectados por virosis a nivel de campo y posiblemente transmisores de algunos virus a través de su semilla. Aunque en la última década se ha reportado el diseño de primers para detección específica de diferentes virus en plantas; en el presente trabajo se utilizaron primers específicos para geminivirus previamente reportados, pero además primers diseñados por Velasco, 2006 que fueron dirigidos a la detección de virus de RNA para este cultivo. Para el caso de los primers de Velasco, inicialmente se corroboró su funcionalidad *in silico* y posteriormente se emplearon para diagnóstico en las muestras de plantas y semillas del tomate de cáscara. La demostración de la funcionalidad de los primers diseñados por este último autor, representan una alternativa para el diagnóstico de virus tanto en el cultivo del tomate de cáscara y muy probablemente en otros cultivos en donde se reportan estos virus.

OBJETIVOS

General

- Identificar virus de DNA y RNA presentes en plantas de tomate de cáscara con síntomas de virosis asociados al *Physalis ixocarpa* brot. utilizando primers diseñados.

Específicos

- Comprobar la funcionalidad *in silico* de primers previamente diseñados para la detección de virus de DNA y RNA en plantas de tomate de cáscara.
- Detectar virus de DNA y RNA asociados al cultivo de tomate cascara (*Physalis ixocarpa Brot*) con síntomas de virosis.
- Utilizar iniciadores previamente reportados para detectar con PCR geminivirus en plantas de tomate con síntomas provenientes de campo.
- Utilizar iniciadores diseñados específicamente para detectar molecularmente virus de RNA en plantas con síntomas de virosis provenientes de campo.
- Evaluar presencia de virus en semilla de tomate de cáscara.

HIPÓTESIS

- Comparando fragmentos de DNA y cDNA obtenidos con PCR, se podrá hacer un diagnóstico rápido y específico de virus presentes en el cultivo de tomate cascara (*Physalis ixocarpa brot.*).

REVISIÓN DE LITERATURA

El tomate verde también conocido como tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.) pertenece a la familia Solanaceae y Subfamilia Solanoideae, Tribu Solaneae (contempla 18 géneros). Comúnmente el tomate verde es ubicado como la versión verde del tomate rojo (Peña, 2001). La palabra tomate, proviene del vocablo nahuatl “ayacach tomatl” cuya etimología significa “ayacach” (tly) que significa sonaja y “tomatl” tomate. Se considera que el tomate verde de cáscara es una especie originaria de México, asociada a la vertiente del pacífico, donde aún es posible hallársele en forma silvestre, en una franja que va desde Centroamérica (Guatemala), hasta California (López, 2009). Dentro del género *Physalis*, se ha estimado que existen alrededor de 80 especies, confinado en su gran mayoría a zonas templadas y tropicales de América y muy pocas especies en el Este de Asia, India, Australia, Europa y África tropical. De todas las especie de este género, aproximadamente 70 se encuentran en México. Esta planta forma parte de los cultivos que se han manejado desde épocas precolombinas, teniendo una importante participación en la dieta de la población. Los mayas y los aztecas recolectaban y cultivaban esta especie para utilizarla con fines alimenticios o curativos. Los aztecas dentro de sus campos de maíz, lo cultivaban con el nombre de milote. La polinización es realizada principalmente por insectos y no es posible la auto fecundación debido a la incompatibilidad gametófica. Tanto los tipos silvestres como los cultivados tienen una constitución cromosómica diploide $2n=24$ (López, 2009), aunque algunas especies del género son poliploides (Peña, 2001).

Clasificación botánica del tomate cascara (*Physalis ixocarpa* Brot)

Reino: Vegetal

División: Tracheophyta

Clase: Dicotiledónea

Orden: Tubiflorae

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *Physalis ixocarpa* Brot. Ex hornem

N. común: Tomate cascara, tomate verde o tomatillo

Fruto: baya

Botánica

El Tomate de cáscara fue descrito por vez primera por Brotero en 1753; es una herbácea anual alogama, perteneciente de la familia Solanácea, cuya altura va desde 40-120 cm; su ciclo es de 85-90 días; presenta tres tipos de hábito de crecimiento: rastrero, erecto y semierecto; tiene hojas simples, erectas, alternadas, ovaladas y pecioladas; el fruto es una baya amarilla o verdosa (Velasco, 2006). Las flores están solitarias en el eje axial de las hojas, tienen corola campanulada, con pétalos amarillos y usualmente con manchas de color purpura oscuro cerca de la base; el cáliz está unido a manera de bolsa que se extiende y envuelve al fruto. Raíz es de tipo columnar y las laterales crecen superficialmente; tallo es estriado herbáceo o leñoso en la base (Velasco, 2006).

Origen y distribución de tomate de cascara. El origen del tomate de cáscara se considera en el continente Americano, pero que muy probable sea México el principal centro de origen, puesto que crece en forma silvestre en la vertiente del

Pacífico, desde la frontera de Estados Unidos hasta Guatemala y Nicaragua. El género *Physalis* se encuentra principalmente en zonas templadas de América, con unas cuantas especies en el este de Asia, India, Australia, Europa y África tropical (Martínez, 2000). En dicho género, hoy en día se estima que existen alrededor de 100 especies de amplia distribución, y en México se encuentran aproximadamente 70 de ellas (Martínez, 2000).

Importancia. El Tomate verde ha cobrado gran importancia en México en las dos últimas décadas, ya que mientras en los 70's sólo se cultivaban 11,286 ha promedio por año, a partir de los 90's se han cultivado más de 25,000, siendo notorio un repunte superior a 46,424 has en 2014. Actualmente el tomate de cáscara tiene importancia nacional, ya que se cultiva en 27 de los 32 los Estados de la República Mexicana y sólo cuatro hortalizas se siembran en mayor superficie: papa (*Solanum tuberosum*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*.), chile (*Capsicum annuum* L) y cebolla (*Alium cepa* L) (López, 2009).

El incremento en la superficie cosechada se inició principalmente en la década de los setentas. Este se debió a un aumento significativo en el consumo per cápita a nivel nacional (3.5 kg actualmente) así como a la exportación hacia los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá, principalmente a partir de la década de los ochentas. La situación anterior ha motivado cambios significativos en la distribución del cultivo, ya que por ejemplo el Estado de Sinaloa, que no era productor de tomate de cáscara hasta antes de los ochentas, en 1993 fue el principal productor de este cultivo. El rendimiento promedio nacional de 14.94 ton/ ha en 2014 (SIAP, 2014).

El tomate cascara se produce en todo México, parte de Estados Unidos y centro América. Alrededor del 81% del tomate se produce en condiciones de riesgo, el resto de temporal. Como se muestra en el Cuadro 1, el estado con mayor superficie cosechada y volumen de producción es Sinaloa, seguido por Jalisco, Sinaloa, Puebla, Michoacán, Estado de México y Sonora (SIAP, 2014).

Cuadro 1. Principales estados productores de tomate de cascara para 2014.

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Valor Producción (miles de pesos)
JALISCO	7277	201441.44
SINALOA	7164	400156.21
PUEBLA	5949	190389.12
MICHOACAN	4517.65	163285.4
MEXICO	3921	282081.53
SONORA	3293	129699.74
GUANAJUATO	2223	41944.43
MORELOS	2154	87010.69
HIDALGO	1672.55	35747.51
ZACATECAS	1594	105536.9
DURANGO	6	67.5

Fuente: SIAP, 2014. Producción agrícola, por estado.

Otro aspecto importante de este cultivo es su uso, el cual es muy variado, resaltando su importancia como alimento y principalmente como condimento en un sinnúmero de comidas en forma de salsas, agregadas a los guisados, sopas, ensaladas, etc. El fruto del tomate verde mexicano contiene sales de fierro, de calcio y de fosforo, además de varias vitamina (Peña, 2001), su composición en 100 gr se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Análisis general y contenido nutricional del tomate de cascara (*Physalis ixocarpa*, Brot), sobre la base de 100 gr de fruto.

Análisis general (%)		Vitaminas (mgr)		Minerales (mgr)	
Humedad	93.00	Caroteno	0.00	Calcio	22.00
Cenizas	0.44	Riboflavina	0.05	Fósforo	11.00
Proteínas	0.75	Niacina	2.22	Fierro	2.90
Extracto etéreo	0.60	Ácidoascórbico	46.00		
Fibra cruda	1.33				
Carbohidratos totales	3.58				

Generalidades de los Virus

Definición. Los virus son elementos genéticos que no pueden replicarse independientemente de una célula viva, llamada célula hospedera. Por lo tanto, los virus son parásitos intracelulares obligados que tienen que introducirse en una célula viva adecuada para llevar acabo su ciclo de replicación. No obstante, los virus poseen su propia información genética y son por lo tanto, independientes del genoma de la célula hospedera (Madigan, 2009).

Un virus está constituido por una población de individuos idénticos por su forma, dimensión, su estructura y su composición química. La partícula infecciosa, que transmite la enfermedad de uno a otro organismo, es el virión que está formado por uno o varios ácidos nucleicos, protegidas por una envoltura llamada cápside (subunidades capsidiales, cuyo número fijo es característico a cada virus) (Albouy *et al.*, 2000). La forma y las dimensiones de las partículas es muy variable (de 30 a 200 nm aproximadamente, y formas: alargadas, helicoidales poliédricos, etc.) (Velasco, 2006).

Los virus vegetales o fitovirus, son los agentes responsables de un gran número de enfermedades de plantas, que producen pérdidas económicas importantes. El termino virus que en latín significa “veneno” ha sido originalmente utilizado para designar a todo agente desconocido, susceptible de provocar trastornos de la salud, y tenido como responsable de enfermedades que tiene una causa indeterminada (Albouy *et al.*, 2000).

Composición. Todos los virus tienen su información genética en forma de ácidos nucleicos (AN). Algunos tienen DNA en doble o en espiral simple, y otros tienen RNA de doble espiral o sencillo, pero la mayoría de los fitovirus tienen RNA de cadena simple (sdb.im.ac.cn).

Estructura. La arquitectura del virion viene definida por las formas de agregación de las subunidades capsidiales y sus interacciones con el ácido nucleico que contienen. Se distingue dos grandes tipos estructurales, uno de simetría cúbica (con relación a un punto) y otro de simetría helicoidal (con relación a un eje) (ictvonline).

Clasificación. En cuanto a la ubicación de los virus, se agrupa de acuerdo al conjunto de los virus que tienen características comunes, al lado de sus propiedades biológicas (serie de huésped, vectores), la naturaleza de su genoma (DNA y RNA) y la estructura de los viriones (ictvonline).

Virus fitopatógenos

Los virus de las plantas se diferencian ampliamente de todos los demás fitopatógenos no solo en el tamaño y forma sino que también en la sencillez de su constitución química y su estructura física. Los métodos de infección de los

virus fitopatógenos pueden ser por propagación, translocación dentro del hospedero, y la diseminación; los síntomas se producen sobre el hospedero. Debido a su pequeño tamaño y a la transparencia de sus partículas; Los virus tienen diferentes formas, principalmente forma poliédrica o de varilla, o variantes de estas dos estructuras básicas. Hay siempre solo RNA o solo DNA en cada virus y, en la mayoría de los virus de las plantas hay solo un tipo de proteína (Agrios, 2010).

Taxonomía de los virus fitopatogenos. El genoma del virus está constituido de DNA o RNA y estructuralmente se pueden presentar en las combinaciones de cadena doble (cd) o de cadena sencilla (cs), y circulares (cir) o lineales (lin). Las posibles composiciones químicas y estructurales del genoma del virus son: DNA-cd, DNA-cs, RNA-cd, RNAs y las combinaciones con circulares y lineales. Las características de la composición química y estructural del ácido nucleico son determinantes en el diagnóstico y clasificación viral. El genoma del virus está constituido de uno, dos, tres o varios componentes cromosomales a los que se denominan *monopartitas*, *bipartitas*, *tripartitas* o *multipartita*, respectivamente. Los componentes de los virus pueden estar contenidos en una sola capsida.

Infección y síntesis virales. Los virus que afectan a las plantas penetran en las células solo a través de las heridas producidas mecánicamente o por ciertos vectores, otra manera como se pueden infectar las plantas es cuando un grano de polen infectado se deposita en un ovulo; los virus penetran en las células de los tejidos vegetales de una planta huésped, y utilizan la maquinaria de dichas células para multiplicarse. De esta manera se establece el proceso de replicación en su interior, pudiendo en ocasiones extenderse a las células contiguas,

produciéndose una propagación de la infección dentro de la planta. Debido a su condición de parásitos obligados, el virus necesita transmitirse de una planta infectada a otra invadiendo un nuevo organismo donde se desarrolla una infección (Agrios, 2010).

Transmisión de los virus

La transmisión es el proceso utilizado por los virus para superar las barreras existentes entre organismos y penetrar en estos, accediendo al interior de células de la planta huésped donde se lleva a cabo su proceso de replicación. La transmisión es por tanto un proceso esencial para la supervivencia de los virus vegetales. Ahora los mecanismos empleados para ello se puede diferenciar según empleen o no un organismo vector en el proceso (Llácer, 2000).

Mecanismos de transmisión sin organismos vectores. Este tipo de transmisión se puede producir aprovechando los mecanismos y estructuras reproductivas del huésped; caso de los virus capaces de permanecer en material vivo como semillas, polen o bien tejidos que sirvan para la propagación vegetativa de la planta (tubérculos y bulbos) (Llácer, 2000).

Transmisión vegetativa. Este tipo de transmisión ocurre en la mayoría de los frutales y plantas de ornato y arbustos que se propagan mediante tubérculos, cormos o esquejes; este medio de transmisión de los virus es el más importante para todos estos tipos de planta. La transmisión de los virus mediante propagación vegetativa no solo hace que las nuevas plantas se enfermen, sino que en casos de propagación mediante gemación o injerto, la presencia de virus en la yema, o el injerto puede resultar en una disminución en el éxito de las

uniones del injerto; en plantas ya establecidas también existe la posibilidad de transmisión de virus, mediante las raíces adyacentes (Agrios, 2010).

Transmisión mecánica. Dicha transmisión puede efectuarse entre plantas bastante próximas una vez que ha soplado un viento fuerte, que hace que las hojas de esas plantas se rocen y, en caso de que presenten heridas que intercambien parte de su sabia, transmitiendo así algún virus presente en esta última; caso del virus X de la papa (VXP) se transmiten con mayor facilidad por este medio. Cuando las plantas son dañadas por el hombre durante las labores de cultivo en el campo o en el invernadero, parte de la sabia infectiva por el virus que se adhiere a las herramientas, manos, o ropa, se transfiere accidentalmente a plantas dañadas posteriormente; la transmisión del virus a través de la sabia se extiende y se efectúa con rapidez (caso VMT en tomate) causando pérdidas considerables (Agrios, 2010).

Transmisión por insectos. Esta forma de transmisión de los virus es el más común y económicamente más importante. El orden homóptera (áfidos y chicharritas principalmente) es el que tiene mayor cantidad de insectos vectores de virus. Los insectos, con sus partes bucales succionadoras, llevan los virus que infectan a las plantas dentro de sus estiletes, o los acumula dentro de su soma, y una vez que el virus ha pasado de los tejidos del insecto, introducen nuevamente al virus en las plantas a través de sus partes bucales (virus persistente o circulativos). Los insectos masticadores también pueden transmitir virus circulativos en sus partes bucales (Agrios, 2010). En el Cuadro 3 se describen las principales plagas del tomate, así como sus características como transmisores de microorganismos, entre ellos los virus.

Plagas del tomate

Cuadro 3. Plagas del tomate portadores de virus.

Nombre común/científico	Características	Imagen
Pulgón saltador o psílido del jitomate <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc	Insecto succionador de savia y transmisor de fitoplasmas, causa la enfermedad conocida como “permanente” en chile, jitomate y tomate de cáscara, así como “punta morada” en papa.	
Mosquita blanca/ <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood), <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)	La importancia de esta plaga se debe a la gran capacidad de reproducción, en un corto periodo alcanza poblaciones de más de mil adultos por planta y la principal es la transmisión de virus.	
Trips/ <i>Thrips tabaci</i> Linderman y <i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande.	Provocan daño directo al alimentarse ya que raspan la superficie de las hojas lo que ocasiona que la planta no realice adecuadamente la fotosíntesis, se deshidrate y puedan entrar enfermedades.	
Pulgoness/ <i>Myzus persicae</i> Sulzer y <i>Aphis gossypii</i> Glover.	Ocasionalmente causan daños directos al succionar la savia provocando debilitamiento, pérdida de vigor, amarillamiento y deformaciones, excretan mielecilla, la cual ocasionando la atracción del hongo <i>Capnodium</i> sp (fumagina), el cual que reduce la fotosíntesis y calidad de frutos.	
Araña roja/ <i>Tetranychus urticae</i> Koch	Ocasionalmente causan severos daños y cubre con telaraña al cultivo de jitomate, sobre todo en época seca y con alta temperatura. Tanto el adulto como las ninfas pican y absorben la savia de las hojas.	

Fuente: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C.

Virus relacionados con el tomate de cáscara en México

Las enfermedades virales que se tienen reportadas atacando a tomate de cáscara son: virus chino del tomate (CdTV), virus huasteco del chile (PHV), virus Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco etch virus (TEV), mancha anular del tabaco (TRSV), Tomato spot wilt virus (TSWV),

Impatiens necrotic spot virus (INSV), virus mosaico dorado del chile (PGMV) Alfalfa mosaic virus (AMV) como variante en moteado amarillo (Velasco, 2006; Martínez, 2000). Otro estudio realizado en la zona centro del país, confirma la presencia de los siguientes virus: Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato aspermy virus (TAV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Tobacco etch virus (TEV), Tomato spot wilt virus (TSWV), Potato Y virus (PVY), Alfalfa mosaic virus (AMV) y Tobacco mosaic virus (TMV), registrando incidencias de 60 a 100 % en los estados de México, Puebla y Morelos (De la Torre, 2002).

Síntomas ocasionados por enfermedades virales

Una ayuda indispensable para la identificación de una enfermedad es un perfecto conocimiento de la sintomatología; generalmente la infección viral se manifiesta sobre la planta enferma por modificaciones de su aspecto o de su desarrollo, que la distinguen de la planta sana (Albouy *et al.*, 2000). Estas modificaciones son influenciadas por diversas variables interactuando, la mayor parte de las cuales son el genoma viral, el genoma hospedero y el ambiente. Por tanto, dichos síntomas se puede agrupar de la siguiente manera:

Síntomas sobre las hojas. Mosaicos foliares. Alteraciones sobre las hojas, son debidas a una deficiencia en pigmentos clorofílicos, a la destrucción de dichos pigmentos, o a la alteración de la estructura de los cloroplastos. El nombre de mosaico deriva de la alternancia de zonas de diversas tonalidades de colores (amarillo-verdoso y amarillo-pálido); la extensión de cada zona es variable pero por lo general siguen la textura de las nervaduras secundarias de la hoja, y el

nombre deriva del contorno con ángulos vivos que la caracteriza y que se asemeja a las teselas de un mosaico (Conti *et al.*, 2000).

Necrosis foliares. Manchas como los mosaicos, de una deficiencia en la asimilación clorofílica, o por la síntesis anormal de pigmentos antociánicos, o de melanina. Los Tospovirus (TSWV, INSV) producen 8 este tipo de síntomas; generalmente, las alteraciones se inician bajo forma de manchas puntiforme de color oscuro con localización internervial, pero también puede afectar el tallo a través del peciolo, estas manchas generalmente se presentan en forma de estrías más o menos profundas en el tejido (Conti *et al.*, 2000).

Deformaciones. Crecimiento desigual de las células alteradas por la presencia del virus, o proliferación de algunas de ellas provocando deformaciones del limbo foliar que aparece abarquillado, hinchado o crispado (CMV). La reducción de la superficie foliar por ejemplo, puede afectar a toda la superficie, o solamente a los bordes que aparecen muy recortados. Sin embargo con frecuencia se encuentra reducido al nervio central (filimorfismo o nematofilia en tomate) (Conti *et al.*, 2000).

Manchado. Cuando la parte del tejido foliar decolorado pierde la identidad de teselas (mosaico) y se funden dando origen a punteados más o menos extensos, o en líneas continuas que tienden a formar un contorno definido; ejemplos de ellos son las manchas anulares y/o lineales sobre hojas senescentes y sobre bayas de pimiento (De la Torre, 2002).

Síntomas de frutos. Los frutos expresan como anormalidades de: número, tamaño, forma, hábito, color textura, maduración, sabor, contenido de semillas, persistencia y producción total (Conti *et al.*, 2000).

Síntomas del tallo y raíces. Involucra anormalidades en: hábito de crecimiento, longitud de entrenudos, número, forma, característica de corteza, color, rigidez histológica, fisiología, constitución química, producción de goma y muerte prematura de algunas partes. Síntomas en las yemas. Incluye anormalidades en: letargo, estructura y viabilidad. Síntomas de raíces. Las raíces incluyen anormalidades de: número, tamaño, forma, textura, color y composición química (De la Torre, 2002).

Virus de DNA que afectan al tomate

Taxonómicamente los geminivirus constituyen a la familia Geminiviridae, en la que se distinguen actualmente cuatro géneros (Cuadro 4) definidos en base al vector que los transmite, el hospedero que infectan y su estructura genómica: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*. El género más diversificado y ampliamente distribuido, el de los *Begomovirus*, agrupa a los virus que son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), infectan plantas dicotiledóneas y poseen en su mayoría genomas bipartitas. A este género pertenecen virus de gran importancia económica que causan pérdidas cuantiosas a los productores agrícolas de muchos países, como el virus del enrollamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV), el virus africano del mosaico de la yuca (ACMV), el virus del enrollamiento de la hoja del algodón (CLCuV), y el virus Huasteco del chile (PHV), entre otros (Conti *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Características de los géneros de la familia Geminiviridae

Género	Genoma	Plantas que infectan	Insecto Vector
Mastrevirus	Monopartita	Mono y dicotiledónea	Chicharritas (Cicadellidae)
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledónea	Chicharritas (Cicadellidae)
Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledónea	Chicharritas Saltamontes (Membracidae)
Begomovirus	Mono y bipartita	Dicotiledónea	Mosquita blanca (Aleyrodidae)

La familia Geminiviridae es un grupo de virus de DNA que se distribuye a nivel mundial, infectan tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas y los insectos vectores que los transmiten son la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn), sicaelidos y membrácidos (Rojas *et al.*, 2005); la familia Geminiviridae se dividen en cuatro géneros Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus y Begomovirus, clasificados de acuerdo a tres criterios: rango de hospedero, insecto vector y organización genómica (Fauquet *et al.*, 2008). Los viriones de los Geminivirus son geminados (de ahí su nombre) que consisten en dos icosaedros fusionados por una de sus caras, poseen un genoma de una (monopartita) o dos (bipartita) moléculas circulares de DNA cadena sencilla (DNAss). En los Begomovirus bipartitas, los dos componentes del genoma se denominan DNA-A y DNA-B, respectivamente (Figura 1). En el DNA-A, se localizan cuatro marcos de lectura abiertos (MLA) relacionados con replicación (gen AC1), transactivación (gen AC2), potenciación de la replicación (gen AC3) y encapsidación (gen AV1); el DNA-B, posee dos MLA relacionados con funciones para movimiento célula-célula (gen BV1) y larga distancia (gen BC1). Cada componente contiene unidades de transcripción divergentes separadas por una región intergénica con

una longitud aproximada de 300 pb, al interior de la región intergénica se encuentra la región común con aproximadamente 200 nt (Rojas *et al.*, 2005).

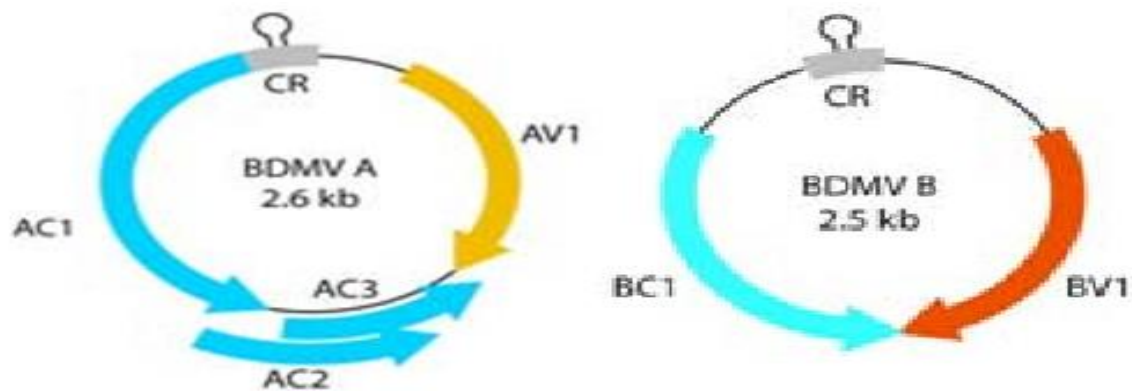


Figura 1. Genoma de un Begomovirus bipartita. Tomado de Gilbertson R. *et al.*, 2003.

Virus de RNA que afectan al tomate

Uno de los virus de RNA más comunes en el cultivo de tomate es CMV *Cucumber mosaic virus*, (familia bromoviridae) y consta de tres componentes genómicos (tripartita) de 3.389, 3.035 y 2.197 kb, son isométricos y producen inclusiones virales citoplasmáticas y vacuoladas, se trasmite por medio de vectores (*Aphidiadae*), por transmisión mecánica y mediante semilla. Este virus es de distribución mundial y afecta a una gran cantidad de plantas cultivadas como chile tomate, tomate, cascara, pepino calabaza, plátano y ornamentales (Conti *et al.*, 2000).

Cucumber mosaic virus CMV (Familia Bromoviride), es un Virion de RNA de cadena sencilla con tres componentes genómicos (tripartita) de 3.389,3.035, 2.197kb. Los viriones son isométricos. Producen inclusiones citoplasmáticas y vacuoldas, densas con bordes angulosos y el centro más claro se transmite por

medio de vectores (Aphidiidae), de manera no persistente; por transmisión mecánica y mediante semilla. Es un virus de distribución mundial.

Alfafa mosaic virus AMV (Familia bromoviridae) es un virus de RNA de cadena sencilla, con tres componentes genómicos (tripartita) de 3.64 kb, 2.59, kb y 2.04 k, en forma de viriones baciformes. Forma inclusiones citoplasmáticas, amorfas, vacuoladas, de diferentes tamaños. Se transmite mediante (áfidos de manera no persistente, por transmisión mecánica, transmisión por injerto, por semilla y polen. No se transmite por contacto entre otras plantas. Distribución mundial se ha encontrado que afecta alfalfa, tabaco, chile tomate cascara y ornamentales (Conti *et al.*, 2000).

TMV *Tobacco mosaic virus* (Familia tetraviridae) es un virus de RNA de cadena sencilla, de un componente genómico de 6.395 kb. Puede formar inclusiones citoplasmáticas cristalinas con caras hexagonales, a veces largas y estriadas, se transmiten mecánicamente por injerto, por contacto entre plantas, por semillas. No se transmiten por polen de distribución mundial. Afecta a casi todas las solanáceas como chile tomate y ornamentales (Conti *et al.*, 2000).

TSWV *Tomato spotted virus* (Familia Bunyaviridae) es un virus de RNA de cadena sencilla, contituido de tres componentes genómicos de 8.897, 5.4 y 2.916 kb es un virio isométrico, que posee una membrana de lipoproteína. Se transmite por vectores (Thysanoptera). De manera persistente, por inoculación mecánica, por injerto. No se transmite por contacto entre plantas, no por semilla, no por polen. Ocasiona grandes pérdidas en los cultivos de tomate y chile así como en ornamentales.

Producción y uso de semillas sanas

Las plantas para la producción de semillas deben estar protegidas contra las infecciones virales, para esto la industria de la producción de semillas siempre se orienta a la comercialización de semillas certificadas, es decir, garantiza la ausencia de virus o bien la presencia de infecciones que están dentro de los límites de tolerancia (Conti *et al.*, 2000).

Intervenciones génicas. La producción de plantas resistentes es hoy en día quizá la orientación más prometedora en la lucha contra los virus. Por ejemplo se tiene el TMV usado por más de 30 años. Hasta el momento se conocen y se han experimentado con variable éxito en planta, siete tipos de diferentes de resistencia transgénica. Resistencia por medio de proteínas virales estructurales contra TMV, ToMV, CMV, PVX, PVY, PVM, PLRV, TEV, BNYVV y AMV Resistencia por medio de proteínas no estructurales usada contra los siguientes virus: TMV, PVY, CyRSV, TEV, TVMPV, AMV y CaMV Resistencia por medio de proteínas no virales utilizada contra PVX, PVS, PVY, TMV y AMCV Resistencia mediante el RNA viral anti sentido (complementario al genómico) utilizada contra CMV y Geminivirus Resistencia por medio de RNA defectivos interferentes (DI RNA) utilizada contra CyRSV y ACMV Resistencia por medio de RNA autocatalíticos (Ribozimas) utilizada contra TMV. De las especies transformadas (papa, tomate, pepino, pimiento y melón) y que han experimentado niveles de resistencia útiles aún no se encuentra en el mercado (Conti *et al.*, 2000).

Principales virus transmitidos por semillas. Dentro de los virus considerados de mayor importancia que se transmiten por semillas se tienen: Sobeian mosaic virus (SMV), como principal hospedero la soya; Alfalfa mosaic virus (AMV), cuyos

hospederos chile, alfalfa, apio, garbanzo, frijol y tomate; Bean common mosaic virus (BCMV), como hospederos frijol, caupí, lupino; Squash mosaic virus (SqMV) sus hospederos son: garbanzo, melón, pepinillo, sandia, calabaza; Tobacco mosaic virus (TMV) teniendo como hospederos frijol, lechuga, manzana, pimiento, pera, tomate, vid y calabaza; Pronus netrotic ringspot virus (PNRV) cuyos hospederos cerezo, durazno, guindo y calabaza; Maize dwarf mosaic virus como hospedantes maíz y malezas; Potato virus T, hospederos papa, olluco y oca. El TMV se transmite en alto porcentaje por semilla; Inverna en tallos y hojas del tabaco ya sea en campo u otros derivados, también se menciona que AMV, CMV, EMV, TRV, TRV son transmitidas por semilla pero aún son poco estudiadas (Agrios, 2010).

Técnicas moleculares en la detección de virus

La identificación adecuada es siempre la clave en el desarrollo de soluciones prácticas para el manejo de enfermedades de virus de plantas. Los recientes avances en biotecnología y biología molecular han jugado un papel significativo en el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido, específico y sensible. Sin embargo, el desarrollo de las pruebas moleculares ha cambiado la metodología de prueba para el diagnóstico de virus. Dependiendo de los cultivos, la naturaleza de los virus y los intereses del productor y el consumidor, uno tiene que tomar una decisión sobre la prueba que se utilizará. Es recomendable usar más de un método de detección para enfermedades virales importantes. Uno de los criterios principales de selección de técnicas de detección son el costo de los reactivos, productos químicos, equipo necesario y mano de obra. Además, los métodos

útiles deben ser rápidos, confiables y específicos para detectar las cepas de virus o infecciones mixtas (Ahlawat, 2010).

La sensibilidad y fiabilidad de los métodos de hibridación molecular dependen de la concentración y distribución de los virus, la recuperación de virus durante la preparación de la muestra, y la calidad de las sondas utilizadas para detectar los ácidos nucleicos virales. La detección de patógenos virales en muestras infectadas se basa en la producción de ácidos nucleicos por hibridación específica entre las secuencias de ácidos de cadena simple nucleico diana y las sondas de cadena simple complementarios. La hibridación molecular también se puede aplicar a la detección específica de amplicones de PCR, aumentando así su nivel de sensibilidad y especificidad (Bertolini *et al.*, 2001). Como para cualquier objetivo, la eficiencia de la PCR para la detección de virus se basa en la especificidad de los primers (López *et al.*, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue desarrollada por Kary Mullis en 1985; esta técnica permite la síntesis específica y exponencial de una región determinada de DNA mediante el uso de primers o iniciadores (secuencias específicas de nucleótidos) que hibridan con la secuencia blanco dejando un extremo 3'OH libre requerido para que la DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa) inicie la síntesis de la cadena de DNA complementaria en dirección 5'-3'. La PCR es un proceso cíclico donde la muestra de DNA inicialmente es desnaturalizada para obtener cadenas sencillas, esto se consigue por calentamiento generalmente a una temperatura de 94°C por un lapso de 30 segundos a 5 minutos; la hibridación de los iniciadores se realiza

Reduciendo la temperatura entre 40 °C y 65 °C (dependiendo de la longitud de la región a amplificar) y después del primer paso de hibridación la temperatura se aumenta a 72 °C para favorecer la acción de la DNA polimerasa, repitiéndose el ciclo un determinado número de veces. El proceso permite que cada amplificado sirva como molde para las subsecuentes rondas de amplificación. La PCR es altamente sensible, específica, eficiente y reproducible permitiendo la identificación y caracterización de especies mediante el diseño adecuado de iniciadores específicos (Bertolini *et al.*, 2001).

La disponibilidad de secuencias de nucleótidos de muchos virus y viroides ha mejorado el uso de ensayos basados en PCR como herramienta de diagnóstico. La PCR es un método muy poderoso que ha facilitado en gran medida la detección de virus de plantas que serían difíciles o requieren mucho tiempo para detectar usando ensayos convencionales (Rao y Maneesha, 2008). Los productos de PCR se pueden utilizar (a) como etiqueta para la hibridación, (b) para la secuenciación directa de DNA, y (c) como sonda específica.

Las ventajas de los ensayos basados en la PCR incluyen la alta sensibilidad, alta especificidad, y el alto rendimiento de la muestra. La reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) es ampliamente utilizada, debido a que casi el 70 % de los virus de plantas conocidas tienen genoma de RNA que es de cadena sencilla. Para la detección de los virus de RNA de cadena simple de transcripción inversa (RT) PCR es el método que implica una etapa inicial de transcripción inversa que convierte sola cadena de RNA en DNAc. De acuerdo con ello, el procedimiento de PCR seguido por la detección de los virus de RNA

de cadena simple que se conoce como transcripción inversa PCR. La sensibilidad del método es su principal ventaja.

Técnica de RT- PCR. Los viroides y la mayoría de los virus fitopatógenos (94%) tienen como material genético RNA, lo que impide la utilización de la PCR convencional, puesto que la DNA polimerasa solo realiza la síntesis a partir de la otra molécula de DNA. Por ello, para su amplificación primero se requiere obtener el DNA complementario (DNAc) al RNA, por medio de una transcriptasa inversa, transcriptasa reversa o retrotranscriptasa, una enzima de tipo DNA- polimerasa capaz de sintetizar DNA utilizando como molde RNA monocatenario (Tapia *et al.*, 2009).

Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR (Tapia *et al.*, 2009). La reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) es ampliamente utilizada, debido a que 70 % de los virus de plantas tienen genoma de RNA de cadena sencilla.

Para la detección de los virus de RNA de cadena simple de transcripción inversa (RT) PCR es el método que implica una etapa inicial de transcripción inversa que convierte sola cadena de RNA en DNAc. De acuerdo con ello, el procedimiento de PCR seguido por la detección de los virus de RNA de cadena simple que se conoce como transcripción inversa PCR. La sensibilidad del método es su principal ventaja. La transcripción inversa (RT) -PCR se ha utilizado para la detección de varios virus que infectan a las plantas (Glasa *et al.*, 2011). La técnica

es rápida, altamente específica y sensible para la detección de virus de plantas de importación y exportación.

En Corea, Lee *et al.*, 2011) han utilizado esta técnica para la detección de cinco virus pertenecientes a género Poty y Tospovirus. En los cultivos frutales, la presencia de fenoles, taninos y otros inhibidores del virus, la transcripción inversa (RT)-PCR no se puede utilizar universalmente. Por lo tanto el desarrollo de métodos rápidos para la extracción de RNA a partir de muestras de tejidos infectados es necesaria para evitar limitaciones en el diagnóstico y caracterización de virus utilizando (RT)-PCR (Hassan *et al.*, 2008).

Uso de la bioinformática

La bioinformática es una nueva disciplina dentro de la biología, donde las herramientas de la computación tienen una función primordial. Si bien algunos restringen el rango de estudio de la bioinformática al manejo y análisis de bases de datos biológicas -principalmente de secuencias, podría atribuírsele un sentido más amplio, como la fusión de las técnicas computacionales con el entendimiento y apreciación de datos biológicos, el almacenamiento, recuperación, manipulación y correlación de datos procedentes de distintas fuentes. Bioinformática propiamente dicha, que abarca la investigación y desarrollo de la infraestructura y de los sistemas de información y comunicación que requiere la biología moderna de bases de datos para el genoma y estaciones de trabajo para procesamiento de imágenes (Martínez, 2007).

Entre sus áreas de interés, se encuentran: la administración de datos en el laboratorio; la adquisición de datos y descifrado; la alineación y ensamblaje de

secuencias, la predicción de dominios funcionales en las secuencias del genoma, la búsqueda en bases de datos de estructuras, la determinación y predicción de estructuras macromoleculares, la construcción de árboles filogenéticos, las bases de datos compartidas y la robótica aplicada a tareas relacionadas con el mapeo y secuenciación de DNA (Yu *et al.*, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo. Km. 38.5 Carretera México–Texcoco. Estado de México, C. P. 56230.

Fase de Campo

La colecta de las muestras se realizó en municipios de zonas productoras de tomate de cascara de las siguientes regiones; Iguala, Guerrero; Atlixco, Puebla; Irapuato, Guanajuato y Zacatepec, Morelos, donde se cultivan diversas variedades de tomate cascara. Se colectaron hojas jóvenes con síntomas como: clorosis, deformación en hojas, mosaicos y enanismos; además se nos proporcionó semilla de Atlixco, Puebla y Zacatepec, Morelos por los productores. Las muestras colectadas fueron identificadas de acuerdo a las parcelas, las hojas de las plantas se colocaron en papel y almacenaron en bolsas de plástico. Cada muestra recolectada se etiquetó con los siguientes datos: lugar de recolección, fecha, descripción de síntomas como se muestra en el cuadro 5. Las muestras fueron llevadas al laboratorio y conservadas a 4 °C.

Cuadro 5. Lista de materiales de plantas de tomate obtenidas de campo.

No.	Clave	Lugar de colecta	Tipo de material
1	pP1M1	Atlixco, Puebla	Hoja
2	pP1M2	Atlixco, Puebla	Hoja
3	pP1M4	Atlixco, Puebla	Hoja
4	pP1M3	Atlixco, Puebla	Hoja
5	pP2M1	Atlixco, Puebla	Hoja
6	pP2M2	Atlixco, Puebla	Hoja
7	pP2M3	Atlixco, Puebla	Hoja
8	pP2M4	Atlixco, Puebla	Hoja
9	pP3M1	Atlixco, Puebla	Hoja
10	pP3M1	Atlixco, Puebla	Hoja
11	pP3M2	Atlixco, Puebla	Hoja
12	pP3M3	Atlixco, Puebla	Hoja
13	pP3M4	Atlixco, Puebla	Hoja
14	pP3M1	Atlixco, Puebla	Hoja
15	pP4M1	Atlixco, Puebla	Hoja
16	pP4M2	Atlixco, Puebla	Hoja
17	pP4M3	Atlixco, Puebla	Hoja
18	pP4M4	Atlixco, Puebla	Hoja
19	pP5M1	Atlixco, Puebla	Hoja
20	pP5M1	Atlixco, Puebla	Hoja
21	pP5M3	Atlixco, Puebla	Hoja
22	pP5M2	Atlixco, Puebla	Hoja
23	pP5M4	Atlixco, Puebla	Hoja
24	pP6M1	Atlixco, Puebla	Hoja
25	pP6M3	Atlixco, Puebla	Hoja
26	pP6M4	Atlixco, Puebla	Hoja
27	iP1M1	Iguala, Guerrero	Hoja
28	iP1M2	Iguala, Guerrero	Hoja
29	iP1M2	Iguala, Guerrero	Hoja
30	iP1M3	Iguala, Guerrero	Hoja
31	iP1M3	Iguala, Guerrero	Hoja
32	iP1M4	Iguala, Guerrero	Hoja
33	iP1M7	Iguala, Guerrero	Hoja
34	iP1M6	Iguala, Guerrero	Hoja
35	iP1M8	Iguala, Guerrero	Hoja
36	iP1M9	Iguala, Guerrero	Hoja
37	iP1M10	Iguala, Guerrero	Hoja
38	iP2M1	Iguala, Guerrero	Hoja
39	iP2M5	Iguala, Guerrero	Hoja
40	iP2M6	Iguala, Guerrero	Hoja
41	iP2M8	Iguala, Guerrero	Hoja
42	iP2M9	Iguala, Guerrero	Hoja
43	iP2M10	Iguala, Guerrero	Hoja
44	iP2M11	Iguala, Guerrero	Hoja
45	iP2M13	Iguala, Guerrero	Hoja
46	iP2M12	Iguala, Guerrero	Hoja
47	iP2M14	Iguala, Guerrero	Hoja
48	iP2M15	Iguala, Guerrero	Hoja
49	iP2M16	Iguala, Guerrero	Hoja
50	iP2M19	Iguala, Guerrero	Hoja
51	iP2M20	Iguala, Guerrero	Hoja

52	OKr 2	Iguala, Guerrero	Hoja
53	IraM2	Irapuato, Guanajuato	Hoja
54	MS1	Zacatepec, Morelos	Semilla
55	PS1	Atlixco, Puebla	Semilla

Plantas diferenciales para controles positivos.

La inoculación de las plantas diferenciales (Cuadro 6) se llevó a cabo mediante la transferencia directa de la savia, esta técnica consiste en inocular manualmente virones en hospedantes susceptibles. Dicha técnica se utiliza para conocer la etiología viral de una enfermedad o identificar una enfermedad virosa conocida. El método realizado fue el siguiente: Se etiquetaron las plantas con nombre científico y fecha con un abatelenguas; se maceró 1 gr. del tejido en 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos, posteriormente se aplicó carborandum a 2 o 3 hojas de cada planta, luego se humedeció el hisopo con la savia obtenida del tejido infectado; enseguida se frotó suavemente y firmemente las hojas tratadas. Se dejaron las plantas bajo invernadero, y se mantuvieron las plantas durante cuatro semanas para observación de síntomas.

Cuadro 6. Plantas diferenciales para controles positivos.

Plantas diferenciales	VIRUS
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	AMV
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	CMV
<i>Physalis Ixocarpa</i> Brot	TMV
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	TEV
<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>rustica</i>	TSWV

Extracción de DNA

La extracción de DNA de las muestras de plantas con síntomas y semillas se realizó con el método de CTAB 2% (Murray y Thompson, 1980). Primero se lavaron y desinfectaron las hojas y semilla con Dextran 10%, se pesaron 0.5 g de tejido y 0.3 g de semilla. Para las hojas con síntomas de virosis obtenidas de campo y las plantas utilizadas como controles positivos (Cuadro 6) se realizó el mismo procedimiento; posteriormente se molieron en un mortero (pre-enfriado a -20 °C) hasta obtener un polvo fino sin permitir que se descongelara y transfirió a un tubo de 2 mL, se añadió 1 mL de CTAB 2 % mezclándolo vigorosamente durante algunos segundos y se incubó a 65 °C en baño maría. Se agregaron 5 µL de mercaptoetanol para quedar a una concentración final de al 0.2% se incubó nuevamente a 65 °C por 60 minutos en agitación a baño maría. Posteriormente, se agregaron 100 µL de NaCl 5M y se agitó por inversión durante 2 minutos, después se agregaron 300 µL de cloroformo: octanol (24:1) y se mezcló por inversión, dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se agregaron 8 µL de RNAsa e incubó a 37 °C por 15 minutos y se agregaron 30 µL de cloroformo, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. Se adicionó a la fase acuosa 1 volumen igual de isopropanol al 100% y mezcló por inversión 10 minutos y se dejó reposar durante 24 horas. Al día siguiente se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70 %, centrifugando por 5 minutos a 13,000 rpm, se dejó secar y finalmente se disolvió con 50 µL de TE y se guardó a -20 °C.

Extracción de RNA

La extracción de RNA de las plantas con síntomas y semillas, se llevó a cabo utilizando el método de extracción de RNA de Trizol[®] Reagent. Se pesaron 0.5 g de tejido y se molió en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo completamente, el macerado se transfirió a un tubo de 1.5 mL que contenía 1 mL de la solución de Trizol[®] Reagent, se mezcló vigorosamente por inversión durante 20 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se tomó todo el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de cloroformo por 1 mL Trizol[®] Reagent, se mezcló vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 500 µL de isopropanol, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol por cada 1 mL de Trizol[®] Reagent. Finalmente, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos, se retiró nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. La pastilla de RNAse disolvió en agua libre de RNAsa o nucleasas. Posteriormente, se incubó a 60°C durante 15 minutos y se almacenó a -20°C.

Cuantificación de DNA y RNA

Se determinó la cantidad de DNA y RNA mediante el nanodrop (ND 1000) (espectrofotómetro), tomando 2 µL de las muestras stock.

Calidad de DNA y RNA

La calidad se determinó en geles de agarosa 0.8% con buffer de corrida TBE. Se cargaron 5 μL de las muestras stock y 3 μL buffer de carga. Los geles se corrieron a 80 voltios durante 90 minutos y se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración (0.4 a 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$) y se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad).

Trasccripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La síntesis de cDNA se realizó con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Mca Fermentas (Thermo Scientific). En un tubo de 200 μL se colocó la cantidad de RNA correspondiente a 1000 nanogramos, se añadió un microlitro de oligo dt y el resto de agua libre de nucleasas para obtener un volumen de 5 μL , inmediatamente se incubó a 70°C por 5 minutos en el termoblock y se colocó en hielo por 5 minutos y se aplicó spin por 10 segundos a 12000 rpm. Se utilizaron las condiciones del Cuadro 7 para realizar el mix y las condiciones de termociclaje del Cuadro 8.

Cuadro 7. Mix para síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración	1x
Buffer 5x	1x	4 μL
MgCl ₂	4mM	0.16 μL
dNTP's mix	0.5 nM	0.05 μL
RNasin	20u	0.5 μL
RT	20u	1 μL
Agua		9.29 μL
Volumen Final		15 μL

Cuadro 8. Temperaturas y tiempos para síntesis de cDNA

Temperatura	Tiempo
25 °C	5 minutos
42 °C	60 minutos
70 °C	15 minutos

Iniciadores (oligonucleótidos) utilizados

Se emplearon iniciadores específicos y degenerados para la reacción de PCR; para los virus de DNA (Cuadro 9) se utilizaron iniciadores previamente reportados por otros autores; para la detección de los virus de RNA (Cuadro 10) se diseñaron y sintetizaron iniciadores específicos para los diferentes virus considerados para esta investigación (Velasco, 2006).

Detección de virus de DNA (geminivirus) asociado a *Physalis ixocarpa* *brot*

Para la detección de Geminivirus en las plantas y semillas se utilizaron dos pares de iniciadores; el primer par corresponde PAL1v1978 PAR1c496 que amplifica un fragmento de 1100 pb del componente A en okra (Velasco, 2006) y que abarca desde parte del gen AC4 que codifica la proteína de los síntomas de expresión y parte del AV1 que codifica para la proteína de la capsida. El segundo par de iniciadores también va dirigido al componente A, AV494-AC1048, detecta un fragmento de 550 pb situado entre el gen de la proteína de la capsida AV1y el gen AC2 que codifica para la proteína de activación de la transcripción (Wyatt y Brown, 1996). Para la detección específica del Virus del Huasteco PHV y el Virus Texano del chile TPV se utilizaron los iniciadores específicos 240-241 y 425-426 reportados por Torres pacheco *et al.* (1996).

Cuadro 9. Secuencias de iniciadores para la detección de virus de DNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot.

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Producto esperado	Virus	Tm °C
PAL1v1978	5'gCATCTgCAggCCCACATYgTCTTYCCNgT3'	1100 bp	Geminivirus (componente A)	52
PAR1c496	5' AATACTgCAgggCTTYCTRTACATRgg3'			
AV494	5'gCCCATgTATAgAAAgCCAAg3'	550 bp	Geminivirus (componente A)	52
AC1048	5' ggATTAgAggCATgTgTACATg3'			
240	5' ggCTTATTTgTAATAAgAgAgAggTgT3'	350 bp	PHV (componente A)	45
241	5' gAATTAAGgTACATggACCACTT3'			
425	5' ggAgTCCCCAAGgAggCTTTA3'	2600 bp	TPV (componente A)	57
426	5' ACAATAgAgggCTgAgATTA3'			

AV=secuencia viral del componente A de Geminivirus, AC=secuencia complementaria del componente A del Geinivirus, PHV y TPV= nombre abreviado de los geminivirus. Los nucleótidos son representados por letras simples, a= adenina, t= timina, c= citosina, g= guanina, Y= citosina o timina, N= cualquier nucleótido, R= adenina o guanina.

Evaluación de iniciadores para los virus de RNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot.

La gran parte del genoma de los virus fitopatógenos es conocido; el diseño de los iniciadores de virus de RNA asociados al cultivo del tomate, se basaron en las secuencias reportadas en el banco de genes (GenBank) Velasco 2006). Se analizaron las secuencias correspondientes al gen de la proteína de la cápside para los virus de interés en este estudio, incluyendo variantes de los virus reportados.

Los iniciadores AMVF-AMVR se utilizaron para identificar al Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), estos detectan un fragmento de 554 pb. Los iniciadores CMVF-CMVR detectan un fragmento de 407 pb para el caso del Virus Mosaico del

Pepino (CMV); los iniciadores diseñados para la detección del Virus Mosaico del Tabaco (TMV) fueron TMVF-TMVR que detectan un fragmento de 436 pb; y finalmente los iniciadores TEVF-TEVR y TSWVF-TSWVR que detectan a los Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) y al Virus de la Marchitez del Manchado del Tomate (TSWV), amplifican un fragmento de 540 pb y otro de 660 pb respectivamente, de acuerdo a los fragmentos esperados con los iniciadores diseñados y referidos en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Secuencias de los iniciadores para la detección de virus de RNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot., diseñados por Velasco, (2006).

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Producto esperado	Virus	Tm °C
AMVF	5'TggTgggAAAgCTggTAAAC3'	554 bp	AMV	60
AMVR	5'CgACCCAAACTTCgTTgAAT3'			
CMVF	5'ggATgCgCgCTgATAATgCT3'	407 bp	CMV	60
CMVR	5'gCCAATTACTACACACgCTA3'			
TMVF	5'TTAgCCggTTTggTCgTCACg3'	436 bp	TMV	70
TMVR	5'TCgAgATCgAACTTTgCAAgC3'			
TEVF	5'ACTgCggCATCggTTgCCAgC3'	540 bp	TEV	70
TEVR	5'ACATCggCgTTggCACCTgTC3'			
TSWVF	5 TTAGCCGGTTTGGTCGTCACG3'	660 bp	TSWV	60
TSWVR	5 TCGAGATCGAACTTTGCAAGC'3'			

F y R = la dirección de iniciador, (Forward= adelante y Reverse= reverso), Los nucleótidos son representados por letras simples, a= adenina, t= timina, c= citosina, g= guanina.

PCR para la detección de virus de DNA y RNA asociado a *Physalis ixocarpa* Brot.

Las reacciones de PCR que se llevaron a cabo con los mismos volúmenes y concentraciones de los reactivos respectivos. En el caso de la detección de geminivirus se preparó un mix con una concentración 100 ng del DNA, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 200 μ M de cada dNTP, 2.5 mM de $MgCl_2$, 10 pmoles de cada par de iniciadores (PAL1v1968-PAR1c496; AC1048-AV494) (Cuadro 8), 1X buffer de reacción y agua libre de nucleasa (a un volumen final de 25 μ L). La PCR se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 con las siguientes condiciones de ciclaje: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos (94 °C, 1 min; 52 °C, 1 min; 72 °C 3 min), 1 ciclo de extensión final a 72 por 5 minutos y 4 °C por tiempo indefinido Para las muestras de los controles positivos; se incluyó un testigo previamente identificado de una planta de okra (*Abelmoschus esculentus*) afectada por geminivirus.

Para la detección específica de los Virus Huasteco del Chile (PVH) y Virus Texano del Chile (TPV), se prepararon los mix con las condiciones de PCR siguientes: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos (94 °C, 1 min; 45 °C, 2 min; 72 °C 3 min), 1 ciclo de extensión final a 72 por 7 minutos y 4 °C por tiempo indefinido. Para la detección TPV las condiciones fueron 1 ciclo de pre-desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos (94 °C, 1 min; 57 °C, 2 min; 72 °C 3 min), 1 ciclo de extensión final a 72 por 5 minutos y 4 °C por tiempo indefinido. El control positivo consistió en DNA proveniente del virus de PHV, tomado de muestras ya identificadas por el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia. Los productos amplificados se corroboraron en

geles de agarosa 2.2% realizando una electroforesis con separación lenta (80 volts), después se tiñó el gel en bromuro de etidio y posteriormente se documentó en un fotodocumentador Bio-Rad con el programa Quantity one

Las reacciones de PCR para los virus de RNA como el AMV, CMV, TSWV, TEV, TMV se realizaron una vez obtenido el cDNA mediante RT-PCR. Las condiciones se termociclaje variaron dependiendo del par de iniciadores empleado. Para los iniciadores (AMVF-AMVR), (CMVF-CMVR) y (TSWVF-TSWVR) se utilizó el programa: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; 45 ciclos (94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C 3 min), un 1 ciclo de extensión final a 72 por 7 minutos y 4 °C por tiempo indefinido. Para los iniciadores (TEVF-TEVR) y (TMVF-TMVR) las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 94 °C por 2 minutos; 45 ciclos (94 °C, 1 min; 70 °C, 1 min; 72 °C 3 min), 1 ciclo de extensión final a 72 por 7 minutos y 4 °C por tiempo indefinido para mantener la reacción.

Evaluación de la funcionalidad de primers mediante PCR In Silico

Se utilizaron en este trabajo los primers reportados por Velazco (2006) para corroborar su funcionalidad mediante PCR In Silico (ver Anexo) y evaluar su potencial para el diagnóstico de enfermedades virales.

Para la evaluación de los primers, se realizó un análisis bioinformático con el programa UGENE y la base de datos NCBI, 2016. Primeramente se ingresó a la base de datos del Genbank, se realizó una búsqueda con los virus que se trabajaron; por ejemplo con el PHV, TPV; posteriormente se bajó la secuencia completa del genoma del virus, se convirtieron a formato FASTA y se guardaron.

Posteriormente, se exportó cada secuencia al programa UGENE y en el programa se escribieron los primers con los que se trabajaron, se le dio la opción PCR In silico, el programa localiza y analiza donde pueden pegar los primers en diferentes región del genoma del virus

Análisis de resultados

Se identificaron los fragmentos específicos para cada virus de acuerdo al peso molecular referido en los Cuadro 8 y 9 de forma visual en los geles de agarosa. Debido a que en algunos casos se identificó más de un fragmento, se utilizaron secuencias de los virus: geminivirus, PHV, TPV, AMV y TEV obtenidos del GenBank. Con el uso de programas bioinformáticos (UGENE y GENE CONSTRUCTION KIT 4.2) se ubicaron los primers en dichas secuencias y realizaron PCR virtual para corroborar los fragmentos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de DNA y RNA

Los métodos empleados para la extracción de DNA (CTAB 2%) Murray y Thompsom (1980) y RNA (RNA de Trizol® Reagent) permitieron obtener buena cantidad y calidad de DNA y de RNA. En las Figuras 2, 3 y 4 se muestran los geles de calidad con ambos tipos de moléculas obtenidas a partir de muestras de hoja de las dos principales regiones (Puebla y Guerrero) en donde se realizó el muestreo de plantas de tomate enfermas de virosis.

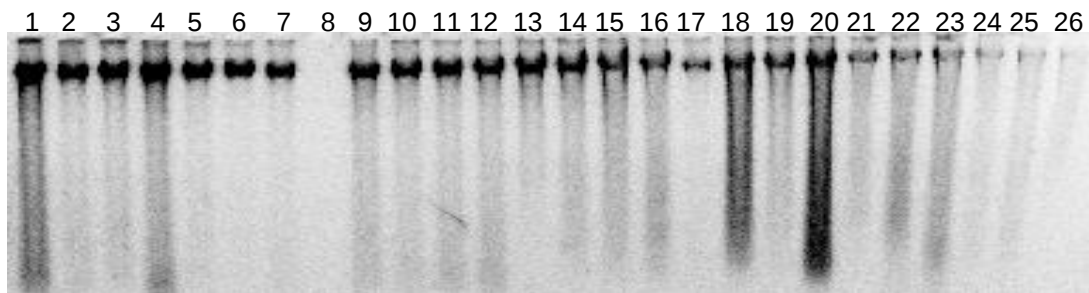


Figura 2. Gel de calidad 0.8 % de agarosa de muestras de DNA de Atlixco, Puebla.

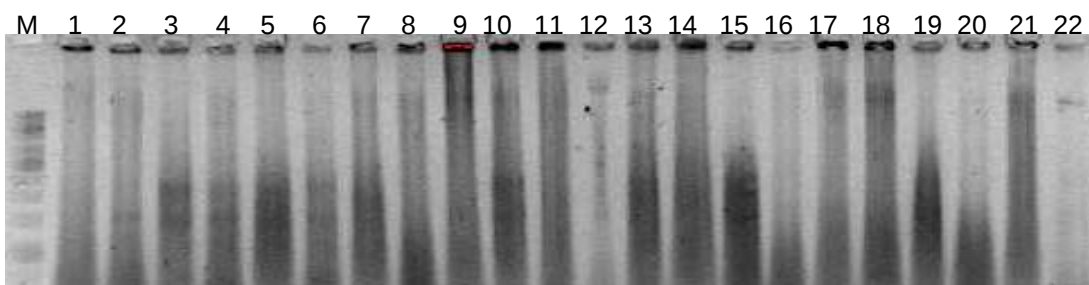


Figura 3. Gel de calidad 0.8% de agarosa de muestras de RNA de Atlixco, Puebla.

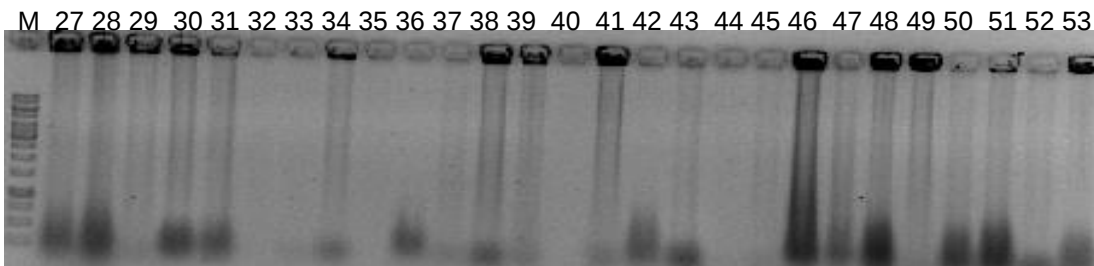


Figura 4. Gel de calidad 0.8% de agarosa de muestrad de RNA de Iguala, Guerrero

Identificacion de virus en plantas de tomate

Las 55 muestras (plantas de tomate de campo con sintomas de virosis y de semilla, Cuadro 5) fueron utilizadas para la identificacion de virus tanto de DNA como de RNA.

Identificación de geminivirus con los primers PAL1v1978- PAR1c496

En la Figura 5, se muestra el fragmento esperado de 1100 pb en los carriles 31, 32, 37, 38, 42, 43, 44 y 50 que corresponden a muestras de hoja de Iguala,

Guerrero. El resto de las plantas evaluadas para este virus se consideraron negativas por carecer de este marcador. Sin embargo, en la misma Figura, también se observaron 6 muestras que presentaron fragmentos pero de diferente peso molecular al esperado (aproximadamente 250-300 pb) que fueron las muestras: 31, 37, 42, 43, 44 y 50. Este par de iniciadores se ha caracterizado por que han sido capaces de detectar geminivirus presentes en diferentes cultivos con marcadores del mismo peso molecular, pero en algunos casos se presentan variantes (Rojas *et al.*, 1993), que quizá corresponda a lo observado en este gel.

Iniciadores	Producto esperado	virus
PAL1v1978- PAR1c496	1100 pb	
Geminivirus		

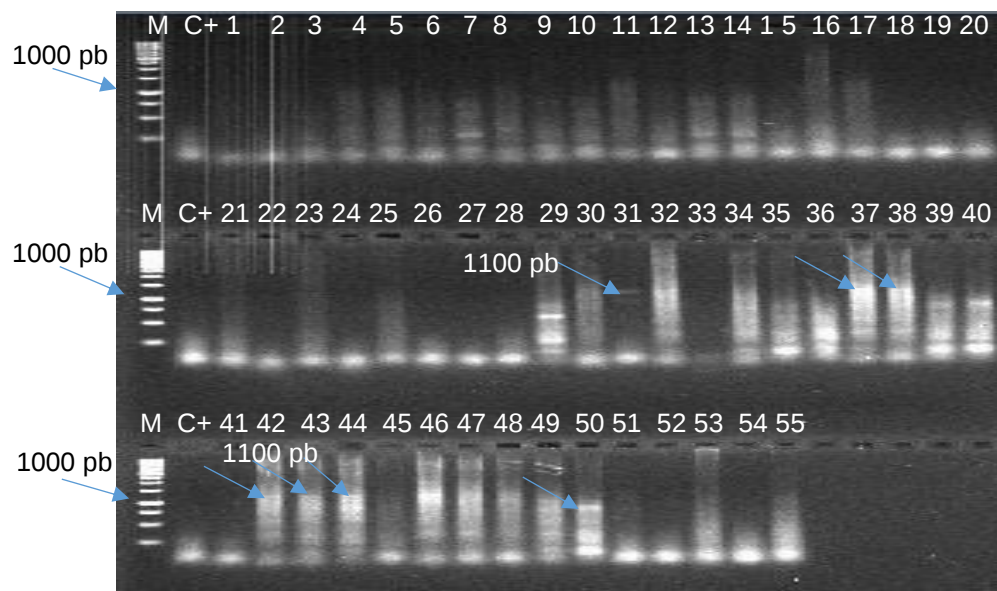


Figura 5. Gel de agarosa 2.2 % de muestras de tomate de cáscara para la identificación de geminivirus. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

Identificación de geminivirus con los primers AV494- AC1048

Para el par de iniciadores AV494- AC1048 reportados por Rojas *et al.*, (1993), que detectaron un fragmento de alrededor de 550 pb en el componente A de cualquier geminivirus (los iniciadores flanquean parte del gel AC1 para la proteína asociada a la replicación hasta parte del gen AV1 que codifica para la proteína de la cápside). Este fragmento se detectó en la muestra 31 que corresponden a la muestra de Iguala, Guerrero, que resultaron positivas con los iniciadores AC1048-AV494 (Figura 6).

El resto de las muestras analizadas con estos mismos iniciadores fueron negativas. Con estos resultados se confirma la presencia de geminivirus en las muestras señaladas. Sin embargo, es muy notoria la presencia de una banda de aproximadamente 300 pb en la mayoría de las muestras a excepción de la 1, 2, 17, 18, 22, 24, 26, 27, 28, 33, 41, 50 y 54. Al bajar las secuencias de los genomas de los virus y pegar los primers AV494- AC1048, es posible identificar fragmentos desde 500 pb hasta 300 pb, (Anexo 1) por lo tanto son similares a los obtenidos con las muestras analizadas.

Iniciadores	Producto esperado	virus
AV494- AC1048 Geminivirus	550 pb	

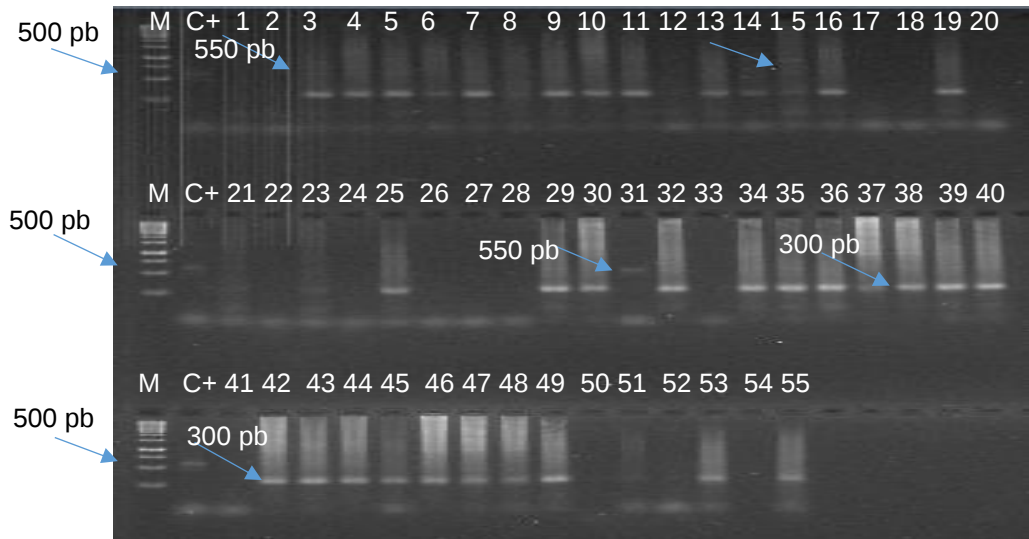


Figura 6. Gel de agarosa 2.2 % de muestras de tomate para la identificación de geminivirus. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

Identificación de virus PHV

Los geminivirus PHV y TPV en las plantas resultaron positivas con los dos pares de iniciadores degenerados, diseñados por Torres-Pacheco *et al.*, (1996). Los resultados se muestran en la Figura 7, carriles 30, 32, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 49 y 55, que corresponde a muestras de Iguala, Guerrero y semilla de Atlixco, Puebla. Estos resultados demuestran la utilidad de la detección molecular y confirman la presencia de geminivirus tipo PHV y TPV en los controles positivos. Al bajar las secuencias de los genomas de los virus y pegar los primers correspondientes, es posible identificar fragmentos desde 500 pb hasta 300 pb, (Anexo 1) por lo tanto son similares a los obtenidos con las muestras analizadas.

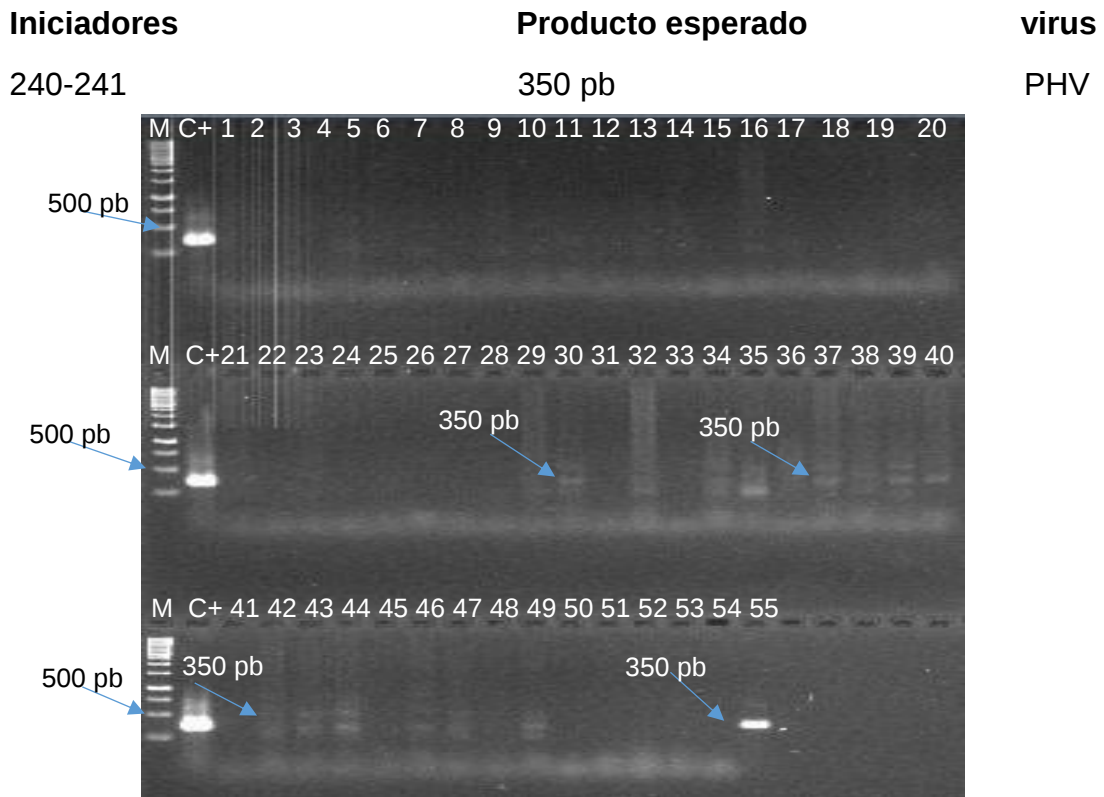


Figura 7. Gel de agarosa 2.2 % de muestras de tomate para la identificación de virus PHV. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

Identificación de virus TPV

Para TPV con un fragmento de 2.6 Kb reportado por Torres-Pacheco *et al.*, (1996), no resultaron positivas ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, se detectaron fragmentos de 500 pb (4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 16, 19, 23, 25, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 46, 47 y 51) y 300 pb (3, 4, 7, 9, 10, 25, 29, 30, 32, 38, 39, 40, 42, 44, 45, 46, 47, 51, 53 y 55) que se muestran en la Figura 8. Es importante resaltar que la muestra 55 corresponde a semilla de tomate. Al obtener los genomas del GenBank y Q-bank para el virus TPV y pegar los primer 425-426 fue posible identificar que los fragmentos detectados son de pesos muy bajos desde 350pb e inclusive menores a 100pb, y en ninguno de los genomas

fue posible identificar el fragmento esperado de 2.6 kb; por lo que nuestros resultados apoyan lo obtenido en el análisis *In Silico*. (Ver anexo)

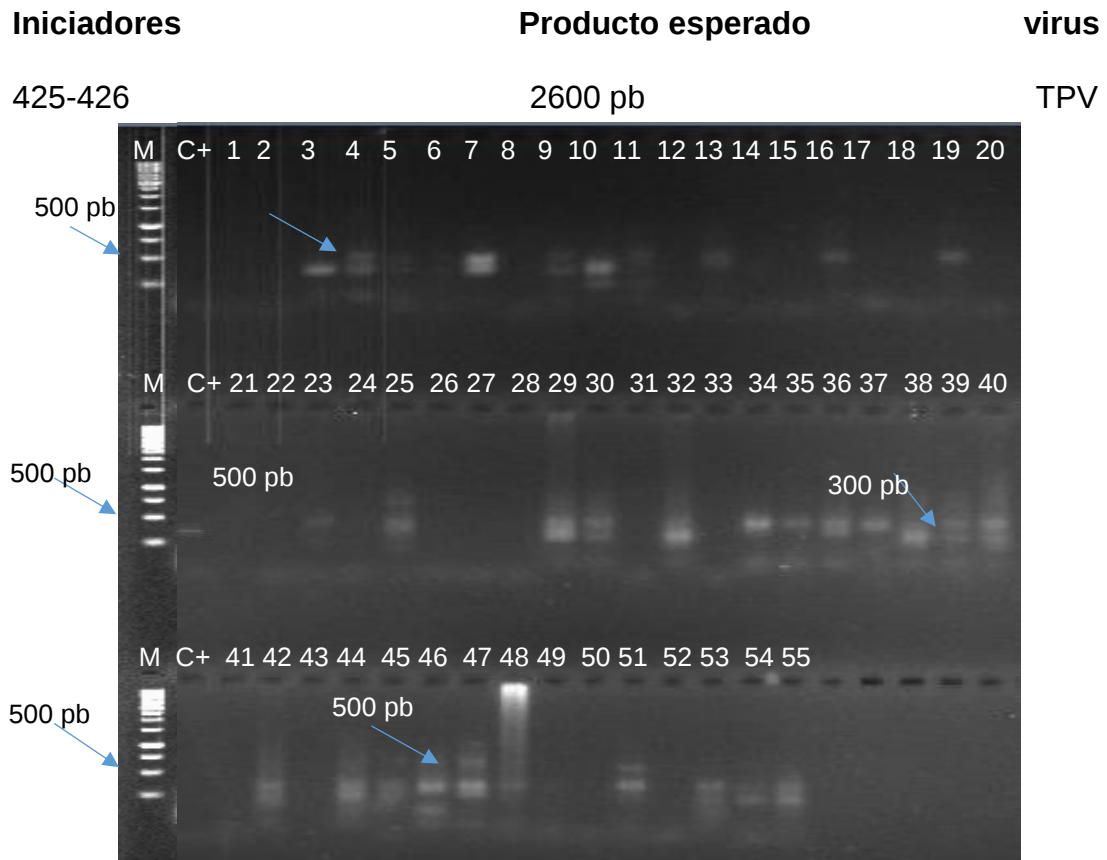


Figura 8. Gel de agarosa al 2.2 % de muestras de tomate para la identificación de virus TPV. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

Identificación de virus AMV

La Figura 9 se muestran los resultados para el AMV, donde se observa el fragmento de 554 pb en los carriles 26 y 27 que corresponden a las plantas de Atlixco, Puebla. También, es posible identificar un fragmento de 200-300 pb en las muestras 5, 40 y 55, siendo la muestra 55 semilla de tomate, lo cual se puede deber a diferencias en los genomas propios de los virus, ya que como se observa en los genomas obtenidos de GenBank y el Q-bank, para los genomas 8, 9 y 10

se obtuvieron con los mismos primers fragmentos de 400, 300 y 100 pb, respectivamente.

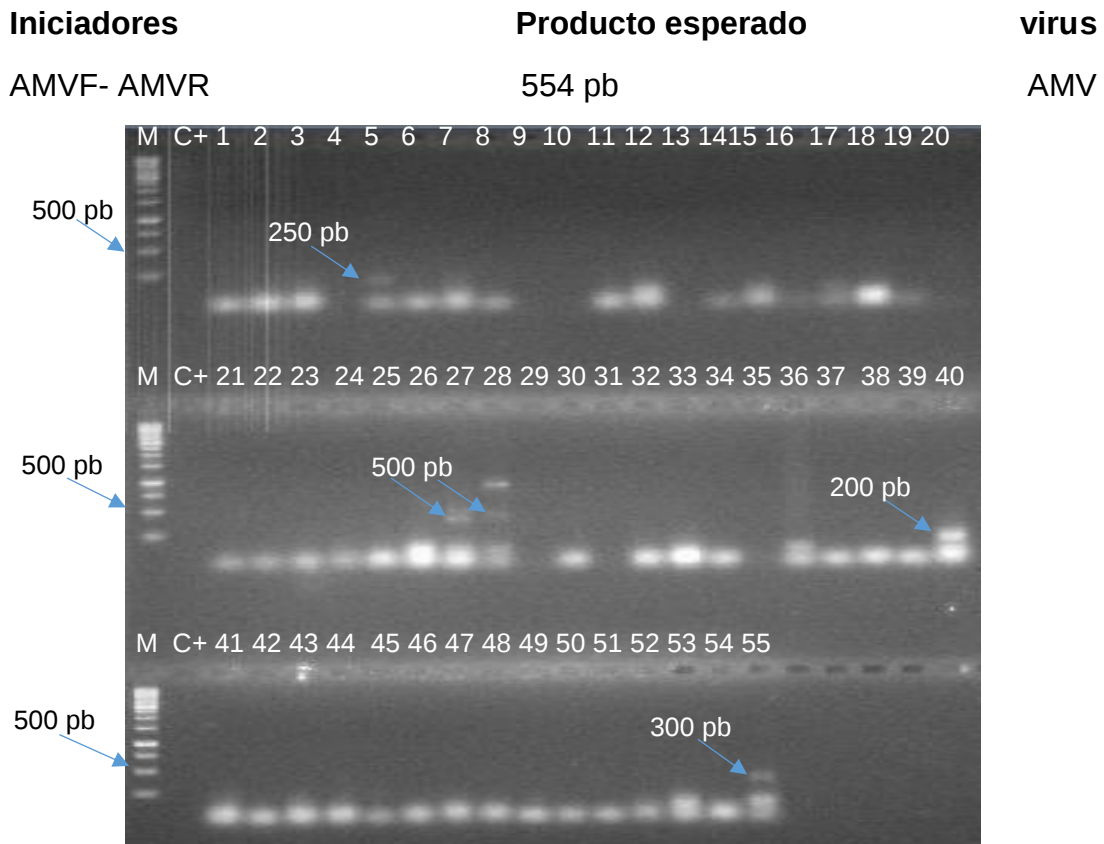


Figura 9. Gel de agarosa 2.2 % de muestras de tomate para la identificación de virus AMV. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

Identificación de virus TEV

En la Figura 10 se observan las amplificaciones para TEV, el control positivo fue de aproximadamente 300 pb y no de 540 pb, como se esperaba, por lo que se tomó a este fragmento como positivo y el cual se identificó en las muestras de hoja 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 12, 13, 15, 27, 30, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 53 y la 55 semilla. En los genomas obtenidos para este virus

en el GenBank y el Q-bank es posible identificar con los mismos primers fragmentos de 300 pb y hasta de 500 pb (Anexo 1).

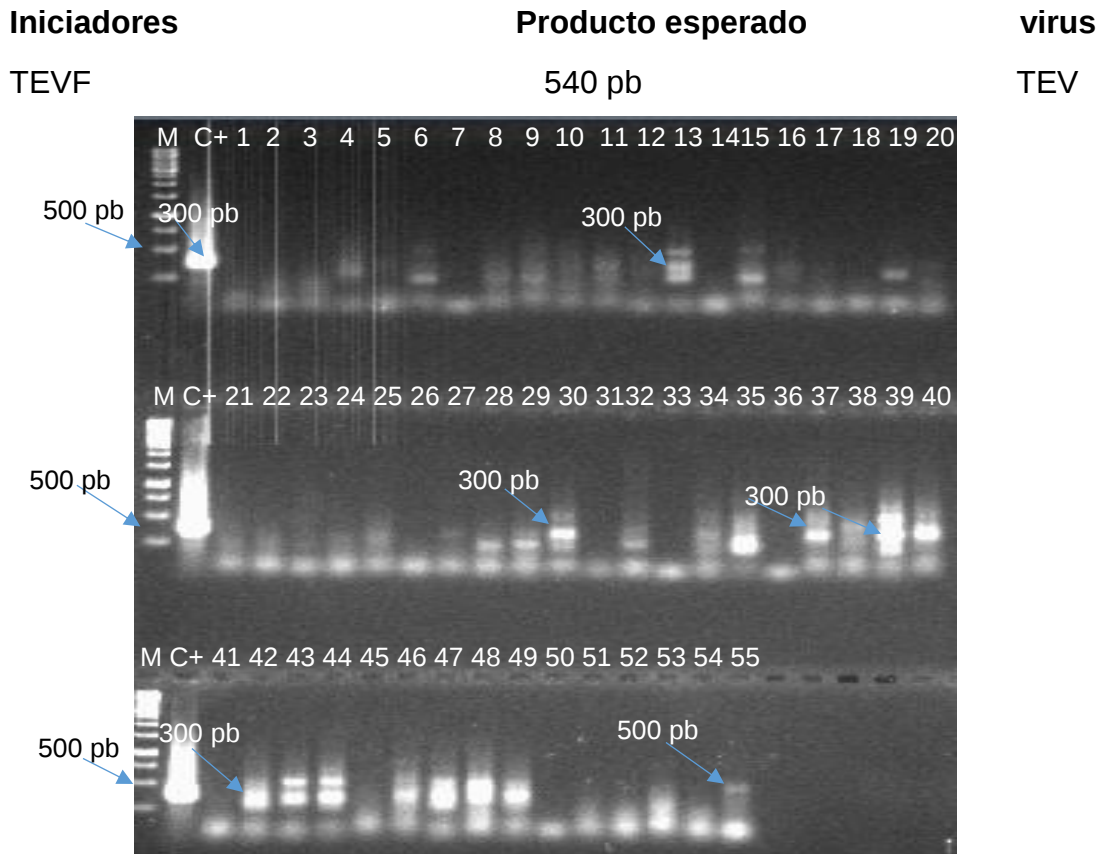


Figura 10. Gel de agarosa 2.2 % de muestras de tomate para la identificación de virus TEV. M: marcador de peso molecular 1kb. C+: control positivo.

La variabilidad genética se debe a la gran diversidad que puede ser encontrada en los virus. Durante el mecanismo de la replicación la variación genética puede surgir por una simple mutación y recombinación (Guitierrez *et al.*, 2004)

Durante la replicación, la polimerasa introducen errores puntuales en la nueva secuencia viral mediante la incorporación a la cadena hija de nucleótidos que no están presentes en el ácido nucleico molde, mediante el proceso de mutación.

Los virus compuestos por ARN, tienen una mayor frecuencia de errores en el mecanismo de replicación debido fundamentalmente, a que la polimerasa que utilizan (ARN polimerasa), carece de actividad correctora de lectura y no posee un sistema de reparación post-replicacional, lo que trae como resultado la obtención de mutantes (Drake y Holland, 1999; Drake y col., 1998)

En este proceso de recombinación el DNA de un virus llega a incorporarse dentro de otro virus durante la replicación en una misma célula. Este intercambio genético vía recombinación provee al virus de un mecanismo para evolucionar rápidamente (Posada *et al.*, 2002).

En muchos virus de DNA y RNA el intercambio genético es realizado durante la recombinación. Estos eventos de recombinación juegan un papel importante en la diversidad genética y evolución de los virus dando como resultado un incremento en la virulencia, ampliar el rango de hospedantes o generación de nuevos (García-Arenal y McDonald, 2003; Monci *et al.*, 2002).

Lo antes escrito puede ser las causas de lo obtenido en nuestros resultados. Sin embargo se requiere de la secuenciación de los productos amplificados o virus detectados para corroborar el origen de estas variaciones.

CONCLUSIONES

- Se identificaron en plantas de tomate de cáscara con síntomas de virosis los geminivirus PHV, TPV y los virus de RNA llamados AMV y TEV.
- Se identificaron los virus TPV, AMV y TEV en semilla de tomate
- Se comprobó que los iniciadores diseñados para la detección de los virus de RNA AMV y TEV en plantas de tomate fueron funcionales y que pueden proveer una buena herramienta para la detección de este tipo de organismos en el cultivo del tomate de cáscara.
- Se comprobó funcionalidad mediante PCR In Silico de primers previamente diseñados para detección de virus de DNA y RNA en plantas de tomate de cáscara

BIBLIOGRAFÍA

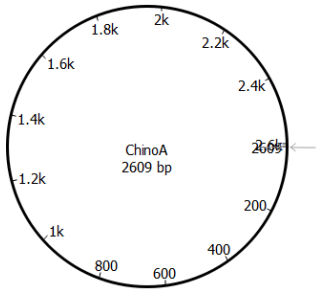
- Agrios, G. N. 2010. Fitopatología. Editorial, Limusa México. 712-714pp.
- Ahlawat YS. 2010. Diagnosis of plant viruses & allied pathogens. Studium Press (India), Pvt. Ltd., New Delhi, p 224.
- Ailbouyl, J. 2000. Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales. Ed. Mundi-prensa. México, DF. Pp 480.
- Anaya, R. S., Romero, N.J. 2011. Hortalizas: plagas y enfermedades. Editorial Trillas. México. 78-90pp.
- Bertolini, E. Olmos A, Martínez MC, Gorris MT, Cambra M. 2001. Single-step multiplex RTPCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. J Virol Methods 96:33–41.
- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L and Zurcher, E. 2010. Plant Viruses Online. Consultado el 2 de Junio del 2016 en: <http://sdb.im.ac.cn/video> Plant Viruses Online.
- Cepeda, S. M. y Gallegos, M. G. 2008. Manejo de plagas cuarentenadas. Trillas México 15-16pp.
- Conti, M. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Ed. Mundi prensa, Mexico. P. 206.
- De La Torre, A.; Valverde, R. A; Mendez, J.; Ascencio, J.T. Francisco, R.F. 2002. Caracterización preliminar de un geminivirus en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en la región centro de México. Revista Agrociencia, 36(004): 471- 481.
- Docampo, D. M y Lenardón, S. L. 2000. Métodos para detectar patógenos sistémicos (IFEIVE) INTA. 40-41pp.

- Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini. & M., Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch. Virol. 153: 783-821.
- Hassan, M, Rysanek P, Alioto D, Malfitano M. 2008. Identification and molecular characterization of peach latent mosaic viroid isolate infecting peach in Egypt. Acta Horticulturae 781:551–556.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Consultado el 17 de Mayo del 2016 en: [http:// www.ictvonline.org/](http://www.ictvonline.org/)
- Lee, JS, Cho WK, Choi HS, Kim KH. 2011. RT-PCR detection of five quarantine plant RNA viruses belonging to poty- and tospoviruses. Plant Pathol J 27:291–296.
- Glasa M, Malinowski T, Predajna L, Pupola N, Dekena D, Michalczuk L, Candresse T. 2011. Sequence variability recombination analysis and specific detection of the W strain of plum pox virus. Phytopathology 101:980–985.
- López, L.R., Arteaga, R.R., Vázquez, P. M.A., López, C.I.L., Sánchez, C.I. 2009. Producción de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) basado en láminas y acolchado plástico. Revista de Chapingo Serie Horticultura 15(1):83-89,2009.
- López, M.M, Bertolini E, Olmos A, Caruso P, Gorris MT, Llop P, Penyalver R, Cambra M. 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. Int Microbiol 6(4):233–243.
- Llácerr, G. 2000. Patología Vegetal. 2ed. Ed. Mundi-prensa, México, p 695.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J., Dunlap, V.P., Clark, P.D. 2009. Brock Biología de los microorganismos. Pearson educación, S.A. 275-299pp.

- Marín, S. J. 2010. Producción de semilla de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) libre de virus mediante el manejo de insectos vectores. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. p4.
- Martínez, B. J. La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana. Salud Pública Mex. 2007; 49: 64-6.
- Martínez, R. A. 2000. Estrategia para el combate de virosis en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, México. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo, Depto. Parasitología Agrícola, Chapingo, Méx. Pp. 63.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2016. Consultado el 5 de Junio del 2016 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> Genbank
- Ocampo, O. T. 2012. Identificación de virus asociados a la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* will.Ex Klotzch) en México. Colegio de postgraduados Campus Montecillo. 11-12pp.
- Peña, L.A. 2001. Situación actual y perspectivas de la producción y mejoramiento genético de tomate de cascara *Physalis ixocarpa* Brot. En México. Universidad Autónoma de Chapingo. 3-7pp.
- Q-bank. Comprehensive Databases on Quarantine Plant Pest and Diseases. Consultado el 25 de Mayo del 2016 en: <http://www.q-bank.eu/>
- Rao, G.P, Maneesha Singh. 2008. Techniques in diagnosis of plant viruses. In: Rao GP, Varverde RA, Dovas CI (eds) Techniques in diagnosis of plant viruses. Studium Press LLC, Houston, pp 1–47.

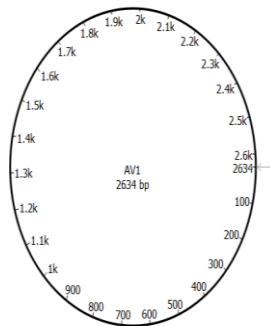
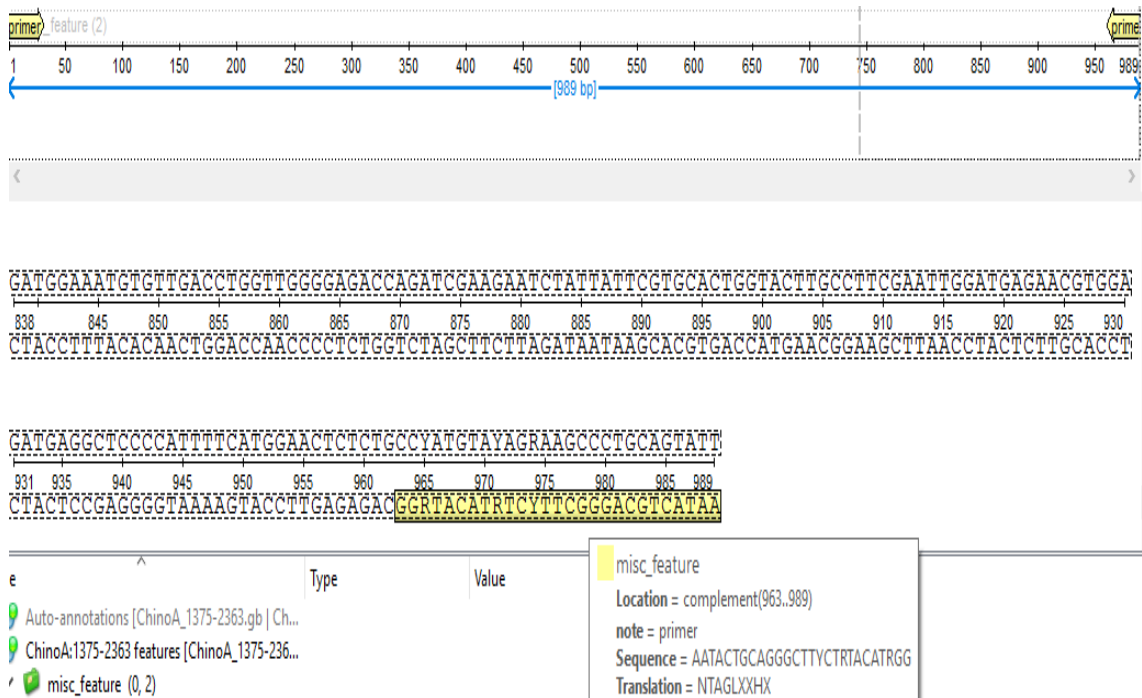
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J. & R.L. Gilbertson. 2005. Exploiting chinks in the plants armor: Evolution and emergence of Geminivirus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361-394.
- Rojas, R. M., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the Polymerase Chain Reaction to detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. *Plant Disease* 77:340-347.
- SIAP. 2014. Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 9 de mayo del 2014 en: <http://www.siap.gob.mx/>.
- SNICS. 2013. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Consultado el 13 de mayo del 2014 en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/Paginas/Inicio-SNICS.aspx>.
- Tapia, T. R., Magaña, G. J.A., Cortez, V. A., Higuera, C. I., Pérez, B. D. 2009. Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México. 10-39pp.
- Torres P. I., Garzón, Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra F, A., and Rivera B. R. F. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Velasco, C. 2006. Detección de virus DNA y RNA asociadas al cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en plantas obtenidas in Vitro. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento De Parasitología Agrícola. P 64.
- Yu U, Lee SH, Kim YJ, Kim S. Bioinformatics in the postgenome era. *J Biochem Mol Biol.* 2004; 37: 75-82.

ANEXO 1. Genomas de virus

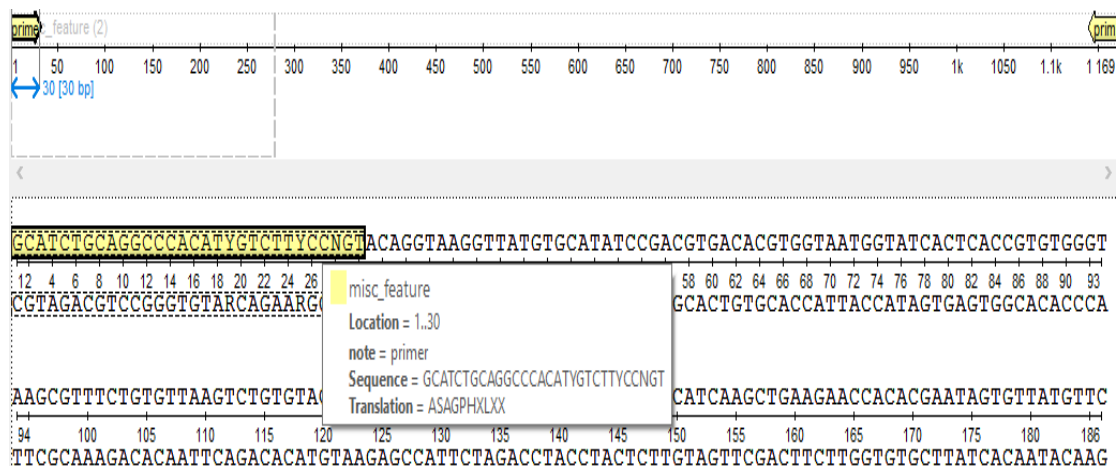


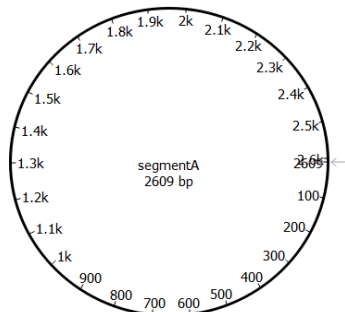
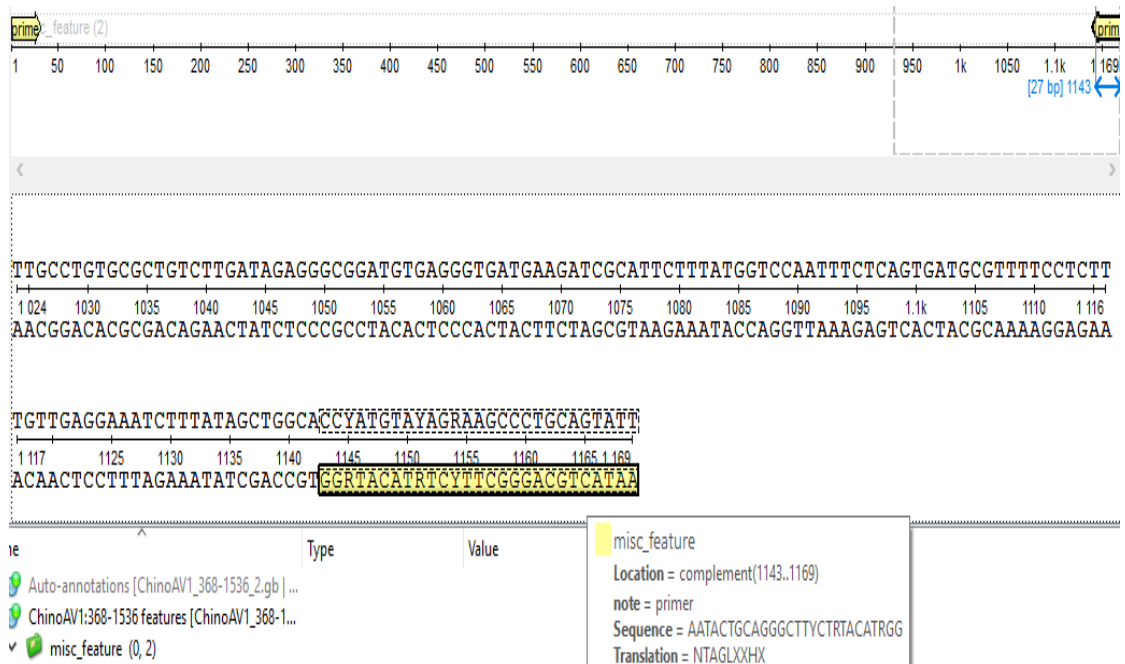
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers PAL1v1978- PAR1c496
Chino del tomate Segment A Accession DQ347945 2609 bp



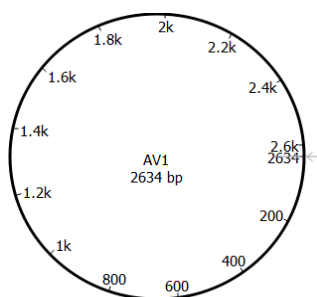
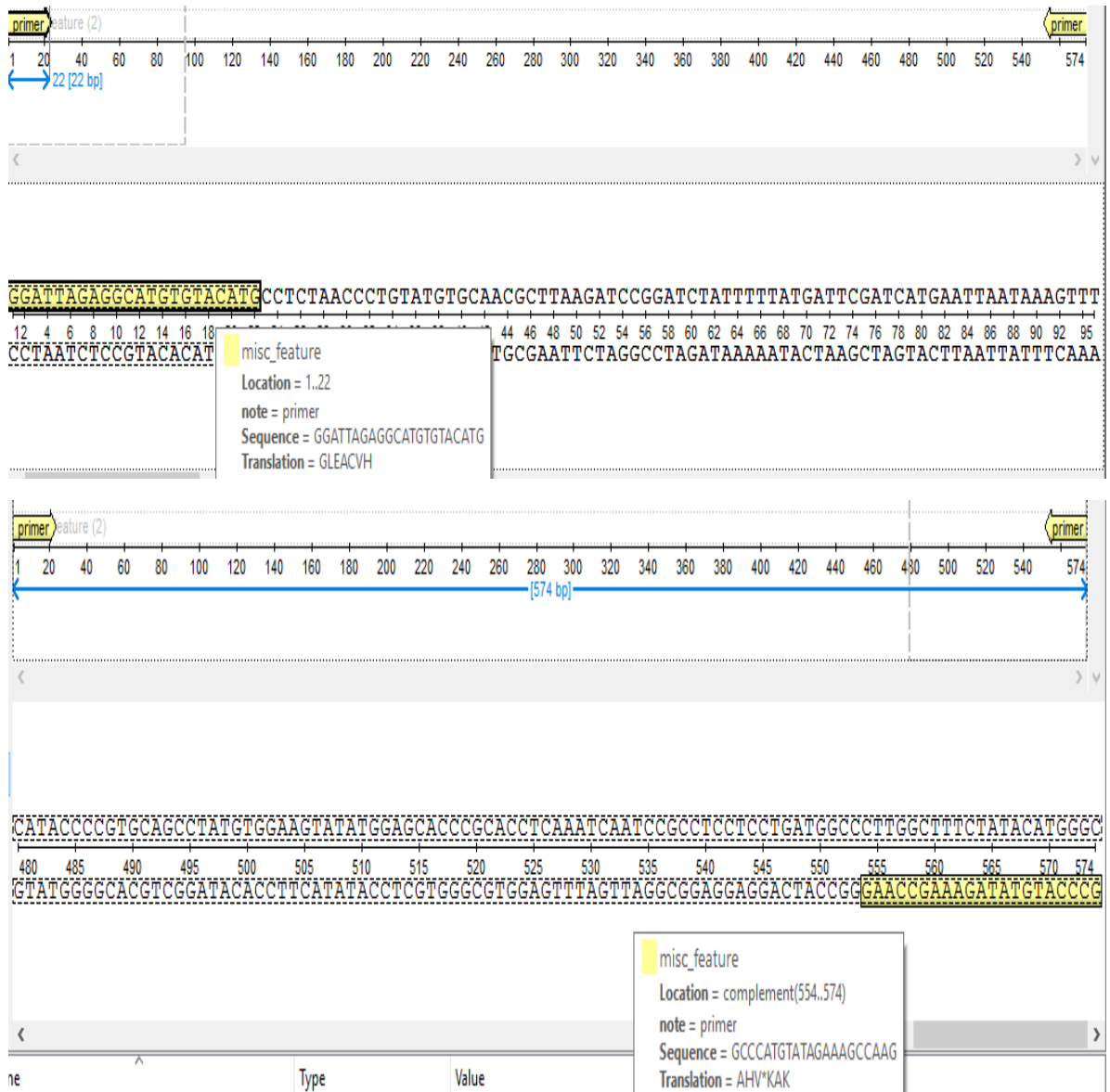


Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers PAL1v1978- PAR1c496 Chino del tomate virus AAV1 Accession AF101476 2634 bp

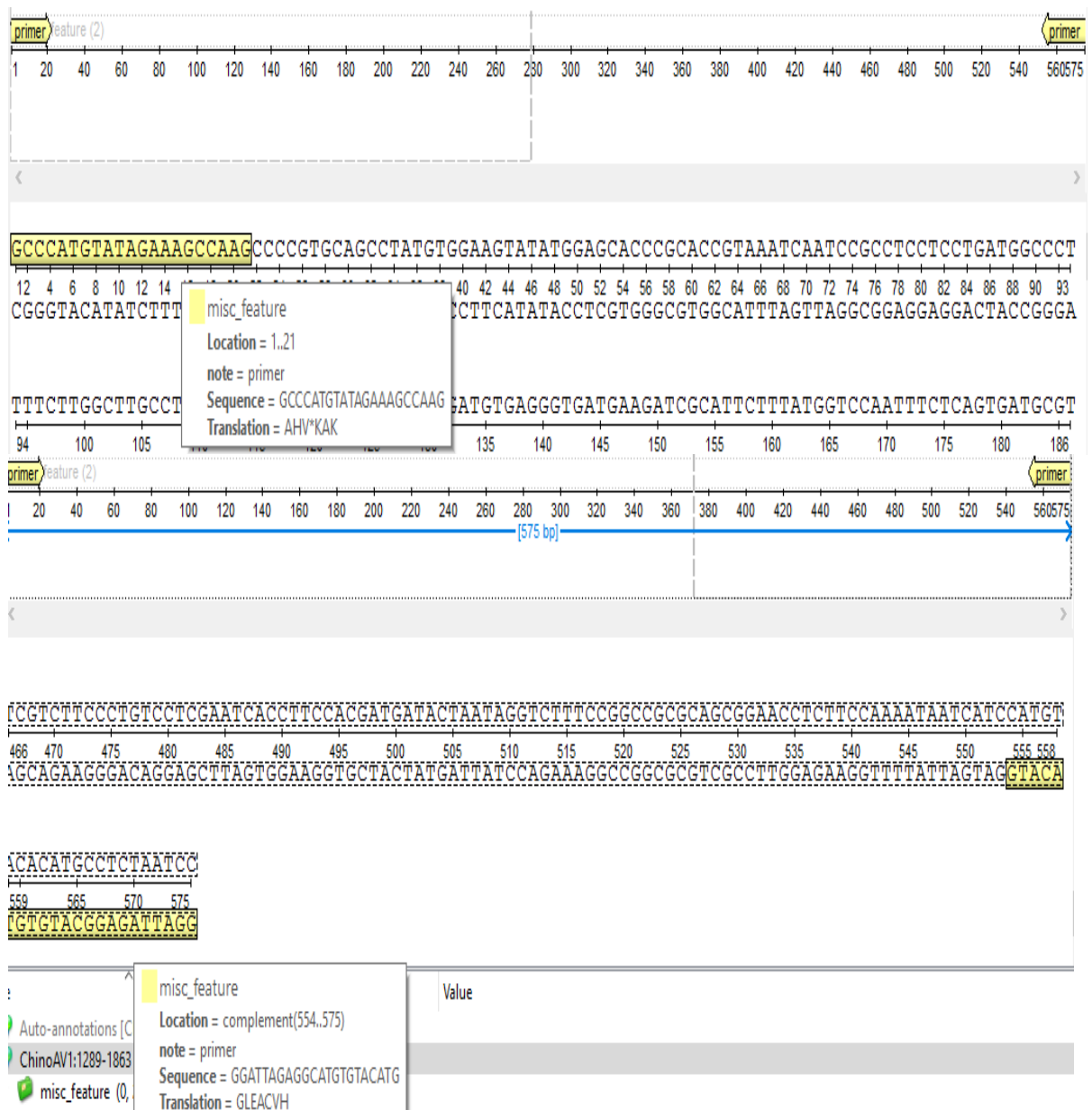




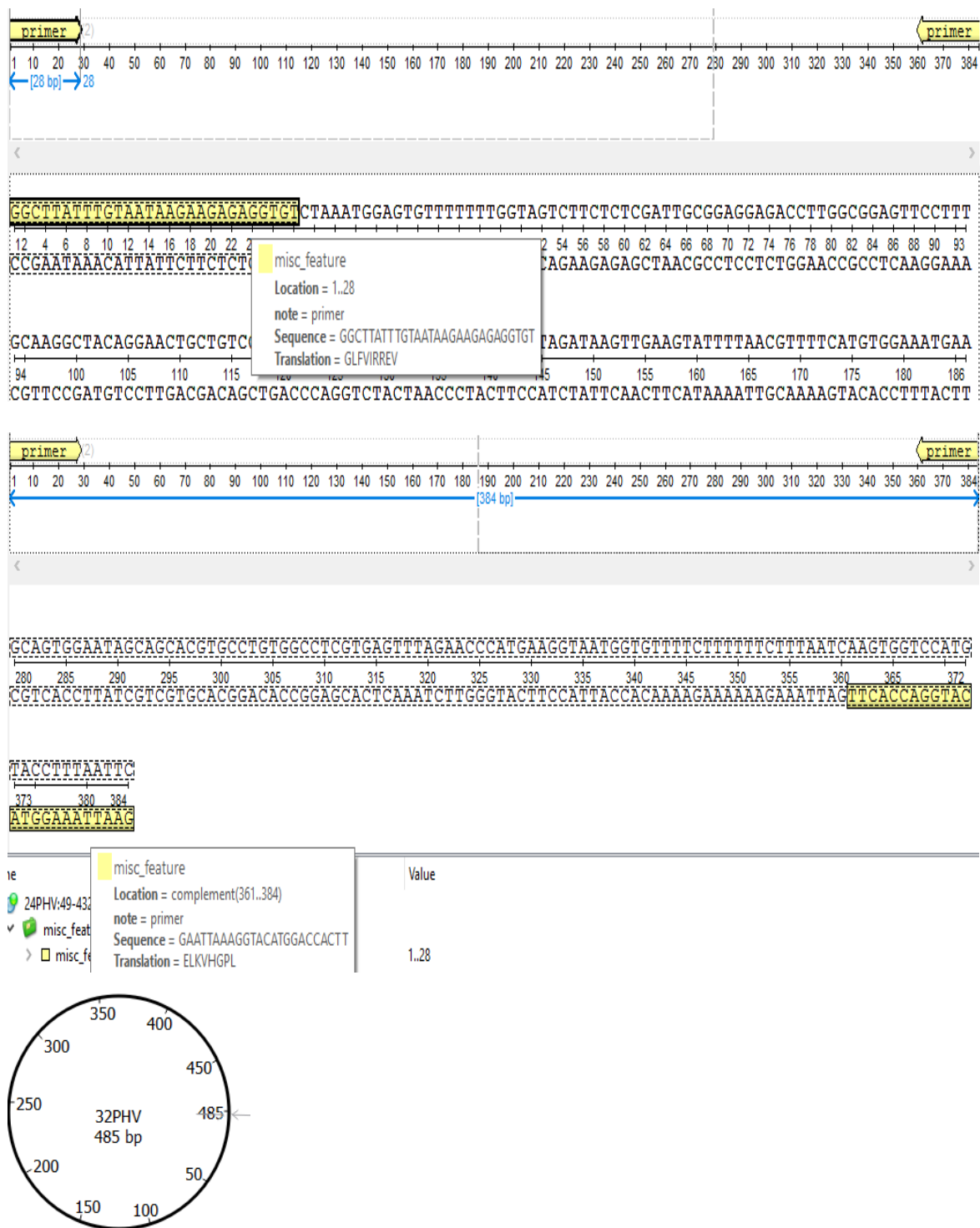
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers AV494 AC1048 Chino del tomate segment A Accession DQ347945 2609 bp



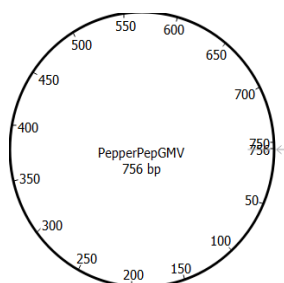
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers AV494 AC1048 Chino del tomate AAV1A Accession AF101476 2634 bp



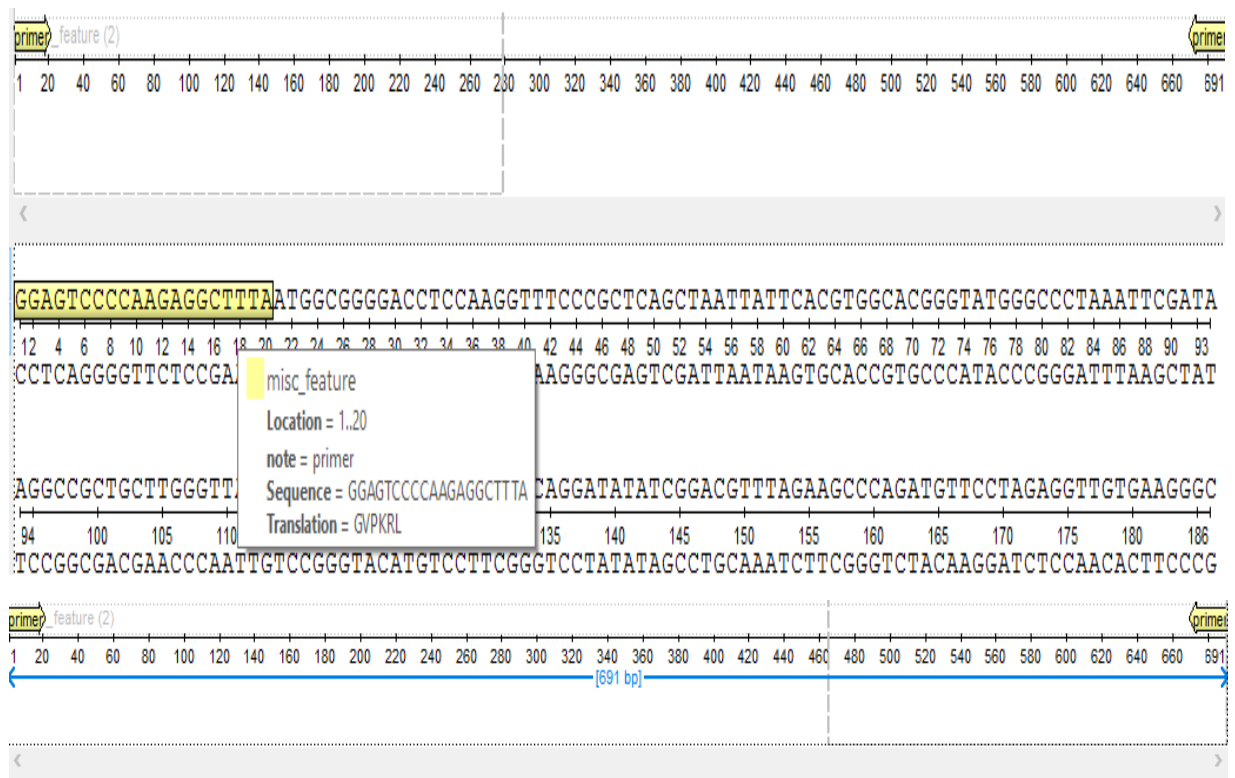
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers 240 241 PHV 01 PHV
Accession EU550683 485 bp



Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers 240 241 PHV
Accession EU550684 485 bp DNA



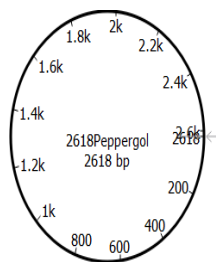
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers 425 426 TPV Pepper
PegAccession AF077025 756 bp



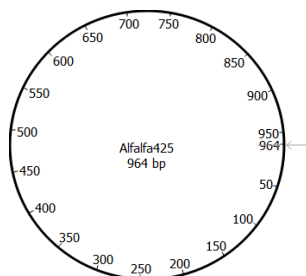
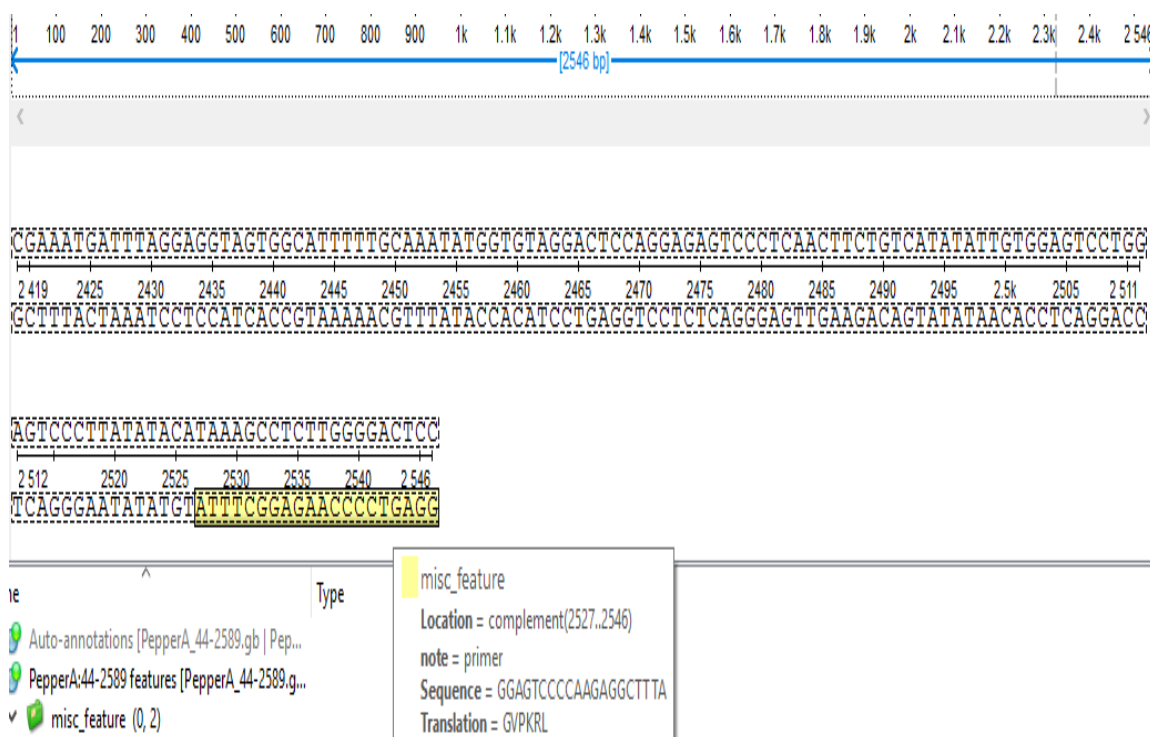
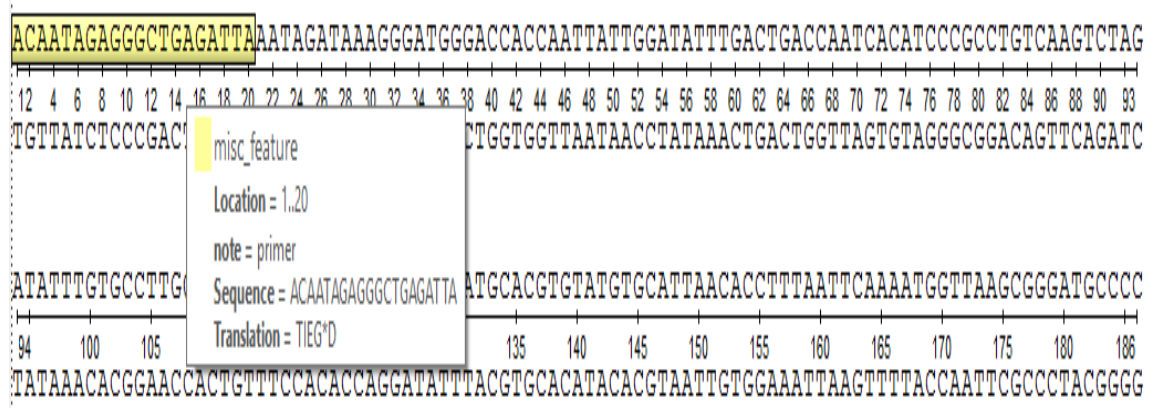
AGCAGGCGTTGGTTAGGCGCTTCTGGAAGGTGAACAACCTACGTCGTGTACAACCACCAGGAAGCTGGCAAATACGAGAATCATACTGAGAACC
 TCGTCCGCAACCAATCCGCGAAGACCTTCCACTTGTGTGATGCAGCACATGTTGGTGGTCTTCGACCGTTTATGCTCTTAGTATGACTCTTGG

CCCTGTTATTGTATATGGCATAATCTCAGCCCTCTATTGT
 GGGACATAACATATACCGTATTAGAGTCGGGAGATAACA

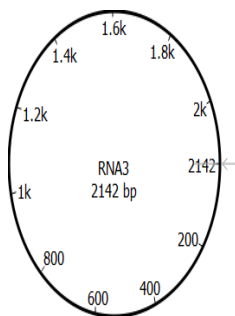
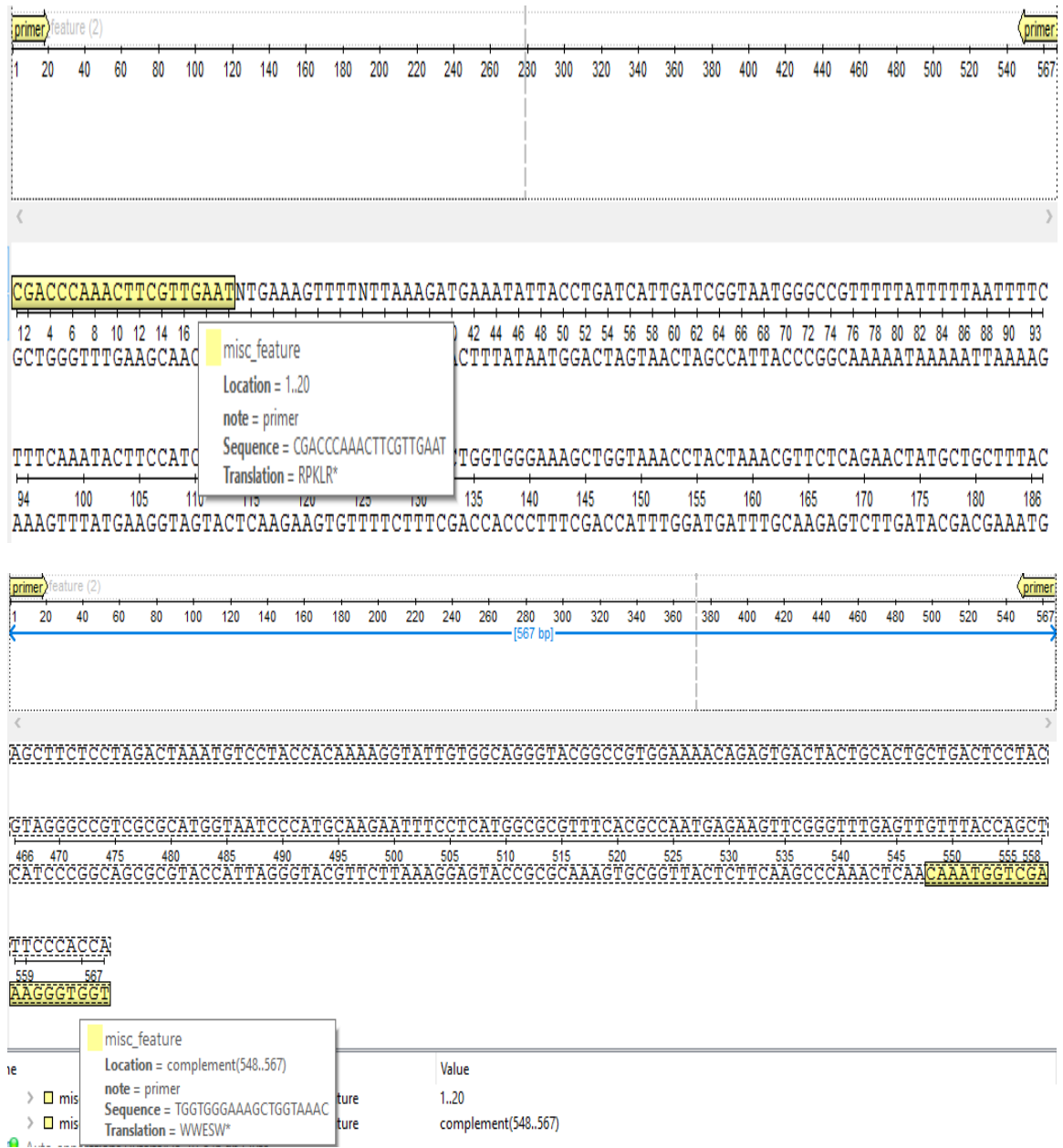
e	Type	misc_feature
Auto-annotations [TexasAV1_11-701.gb Texas...		Location = complement(672..691)
TexasAV1:11-701 features [TexasAV1_11-701.gb]		note = primer
misc_feature (0, 2)		Sequence = ACAATAGAGGGCTGAGATTA
		Translation = TIEG*D



Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers 425 426 TPV Pepergol
 Accession AY928514 2546 bp

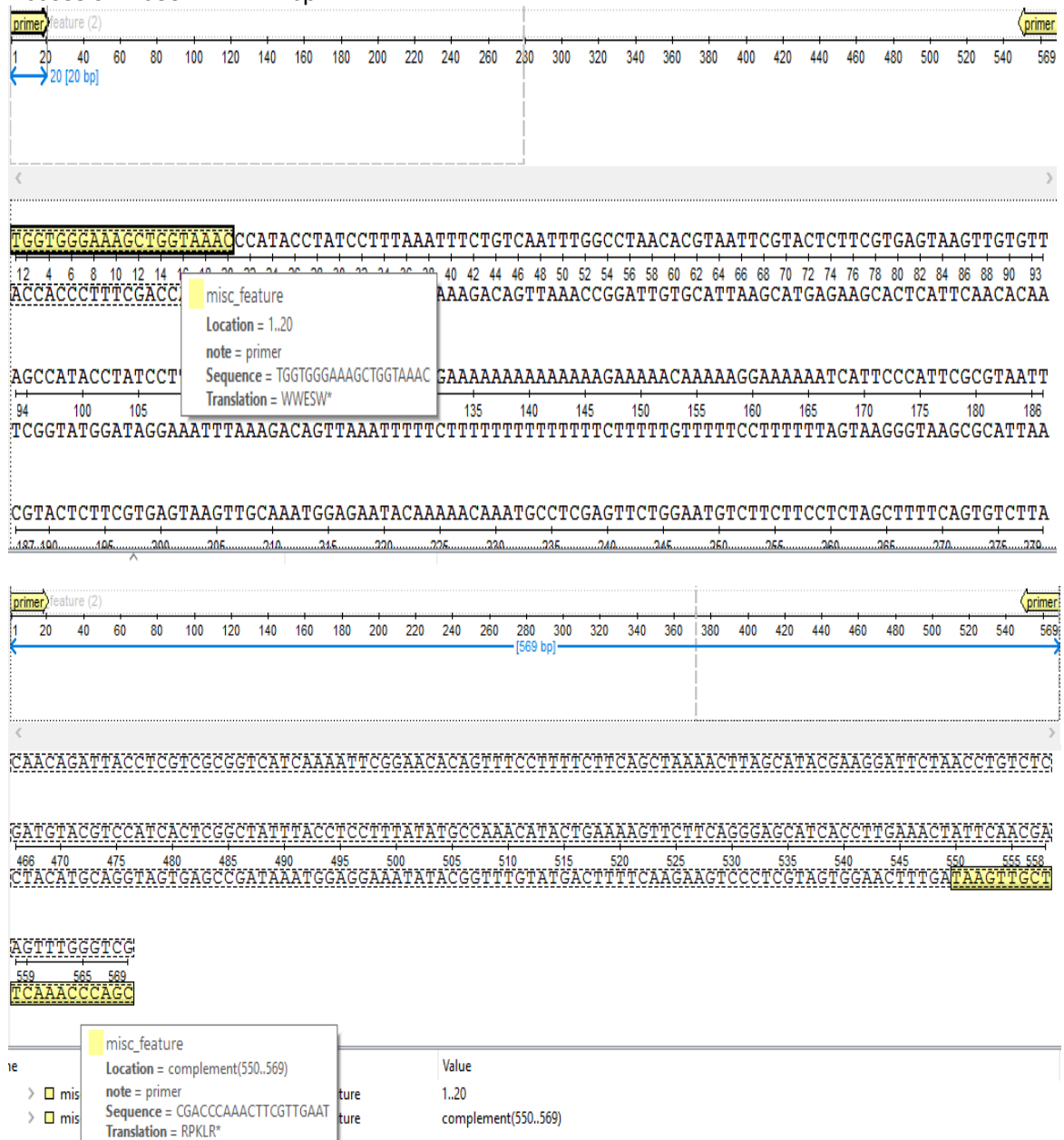


Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers AMVF AMVR Alfalfa 425
Accession L00162 964 bp



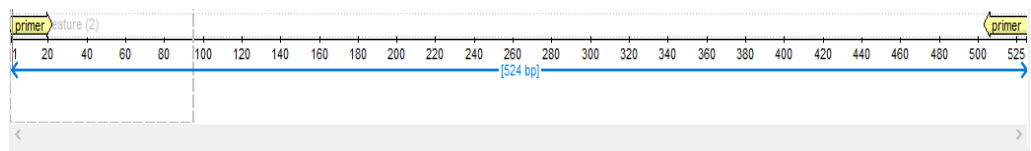
Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers AMVF AMVR

Accession K03542 2142 bp

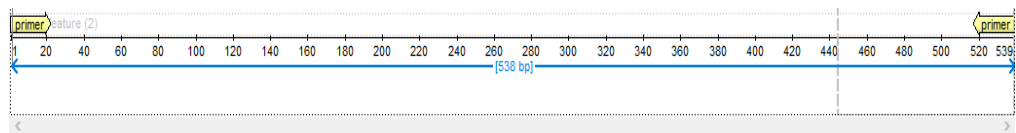


Genomas de Geminivirus obtenidos del Gen Bank con los Primers TEVF

Accession TEVR 9494 bp



ACTGCGGCATCGGTGCCAGGAGATATCACAATCACCCTGCAAGAGATTTCTTGTGAGAGGTCTGTTGGATCTGGAAAATCCACAGGACTTC
 12 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
 TCACCCCTAGCCCAACGGTCGCTCTATAGTGTGAGTGGGCGTTCTCTAAAAGAACACTCTCCACGACAACCTAGACCTTTAGGTGTCTCTGAAG



TTTACAACCCAGTTCCCGTGAAACTTAAGATAGAGAGACTCTCAGCTTTTCAGGAATTTGTAAGTTTACAAGGGACAGGTGCCAAGCCCGATG
 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 539
 AAATGTTGGGTCAAGGGGCACTTTGAATTCATCTTCTCTGAGAGTCGAAAGTCCTTAAACATTCAAATGTTCCCTGTCCACGGTTCGGGCTAC