

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO PARASITOLOGIA AGRICOLA

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE DNA Y RNA ASOCIADOS AL
CULTIVO DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.) EN
PLÁNTULAS OBTENIDAS *IN VITRO***

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

ISMAEL VELASCO CASTILLO



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

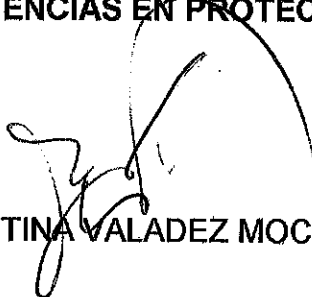


Chapingo, México. 2006.

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE DNA Y RNA ASOCIADOS AL
CULTIVO DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.) EN
PLÁNTULAS OBTENIDAS *IN VITRO***

Tesis realizada por ISMAEL VELASCO CASTILLO bajo la dirección de la
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma y Asesorada por la Dra. Elsa Ventura
Zapata y el Dr. Víctor Manuel Pinto y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

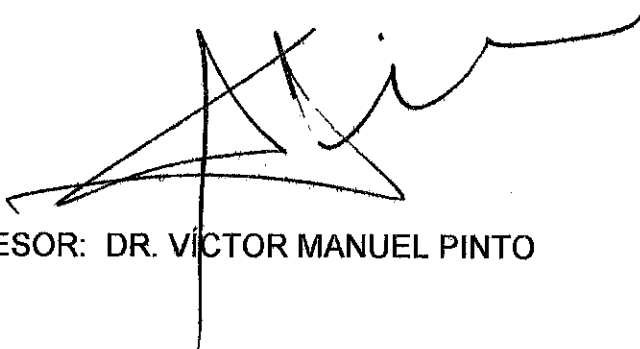
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



DIRECTOR: DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA



ASESOR: DRA. ELSA VENTURA ZAPATA



ASESOR: DR. VÍCTOR MANUEL PINTO

DEDICATORIA

A mi papá:

Domingo Velasco Montaña.† (qepd)

Que desde allá arriba compartas mis logros.

A mi madrecita:

Esperanza Castillo Hernández.

Por hacer de mi lo que soy gracias.

Con todo mi cariño.

A toda mi familia:

*que me ha dado todo su amor
y apoyo.*

A mis padrinos:

Prof. Erasto Velasco Velasco

Profra. Yola

Por sus valiosos consejos.

A mi Chaparrita

Por todo su apoyo, su

Cariño y comprensión.

Agradecimientos

A Dios por el regalo más grande que he recibido, la vida.

A la Universidad Autónoma Chapingo a través del departamento de Parasitología Agrícola por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de maestría.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por la dirección, asesoramiento y revisión de este trabajo pero sobre todo por sus consejos y amistad.

Al Dr. Victor Manuel Pinto por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Elsa Ventura Zapata por todo su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Uriel Maldonado por todo su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A todos mis maestros que con sus consejos y enseñanzas han contribuido en mi formación.

A la M.C. Lily Celaya Molina por sus valiosos consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo y a todos mis amigos de la maestría: Alonso, Juan Ramón, Oscar, Arturo, André, Chanco, Abimael, Sergio, Valita, Myriam, Lulu, Carmen, Lucy, Nelly, Imelda y los que llegaron a escapar en este momento de mi mente, por todos los momentos de alegría que compartimos y su apoyo.

Y a todas aquellas personas que han colaborado de alguna manera para la finalización de este trabajo.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació el 27 de abril del año de 1974 en México, D.F., fue en la escuela primaria “Héroes de Chapultepec” de la ciudad de Molango de Escamilla, del Estado de Hidalgo donde realizó sus estudios de primaria, la secundaria la curso en la escuela Sec. Fed. “Cecilio Ramírez Castillo” de la ciudad de Molango, Hgo., el nivel medio superior lo realizó en el Centro de Bachillerato Tecnológico agropecuario No. 6 (C.B.T.a. No. 6) “Ricardo Acosta Velasco” de la misma ciudad concluyendo sus estudios como Técnico Agropecuario, (Generación 88/91), en el año de 1993 ingresa a el Instituto Tecnológico Agropecuario No. 6 de la ciudad de Huejutla de reyes, Hidalgo, graduándose como Ing. Agrónomo Fitotecnista, en el año 2003 ingresa a la Universidad Autónoma Chapingo, para realizar estudios de maestría dentro del programa Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola,

A partir del año 2002 ingresa a laborar para la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria en el plantel del C.B.T.a. No. 6 del la ciudad de Molango, Hgo., donde a la fecha se desempeña como docente.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>v</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
ABSTRAC	<i>vi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos particulares	4
1.2 HIPÓTESIS	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Cultivo de tomate de cáscara	6
2.1.1 Importancia	6
2.1.2 Clasificación y descripción botánica	8
2.2 Virus	9
2.2.1 Definición	9
2.2.2 Características	10
2.2.3 Taxonomía	11
2.2.4 Virus descritos para el cultivo del tomate	13
2.2.5 Sintomatología	14
2.2.6 Virus de DNA que afectan a <i>P. ixocarpa</i> Brot.	17

2.2.7	Virus de RNA que afectan a <i>P. ixocarpa</i> Brot.	17
2.3	Técnicas moleculares en la detección viral	17
2.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
2.3.2	RT-PCR (Reversa transcriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa)	19
2.4	Cultivos <i>in vitro</i>	20
2.5	Iniciadores (oligonucleótidos)	20
2.5.1	Iniciadores (oligonucleótidos) degenerados	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1	Obtención de material vegetativo	22
3.2	Extracción de DNA.	24
3.3	Extracción de RNA.	25
3.4	Calidad de DNA y RNA.	27
3.4.1	Cuantificación de DNA y RNA	27
3.4.2	Calidad de DNA y RNA	28
3.5	Trascricpción inversa y reacción en cadena de la Polimerasa acoplado (RT-PCR) para los virus de RNA	29
3.6	Iniciadores (oligonucleótidos) utilizados en este trabajo	30
3.6.1	Detección de virus de DNA (Geminivirus) asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	30
3.6.2	Diseño de iniciadores para los virus de RNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	32
3.7	Evaluación de los iniciadores diseñados para detectar virus de RNA asociados a plantas de <i>Physalis ixocarpa</i>	

	Brot., con síntomas de virosis	34
3.8	PCR para la detección de virus de DNA y de RNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot., en los controles positivos	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1	Detección de geminivirus en plantas de diferentes especies con síntomas de virosis utilizando los iniciadores degenerados AC1048-AV494	39
4.1.1	Detección de geminivirus en plántulas de tomate de cáscara (<i>P. ixocarpa</i> Brot.) obtenidas con <i>cultivo in vitro</i>	47
4.2	Diseño de iniciadores específicos para la detección de virus de RNA asociados al cultivo del tomate <i>P. ixocarpa</i> Brot.	48
4.2.1	Detección específica de virus de RNAs asociados al tomate de cáscara <i>P. ixocarpa</i> Brot., en plantas hospederas de diferentes especies	49
V.	CONCLUSIONES	57
VI.	LITERATURA CITADA	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Superficie cultivada, producción y rendimiento de tomate de cáscara en los principales estados productores de México para el año 2003.	7
Cuadro 2.	Plantas de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot., obtenidas in vitro del Campo Experimental "Zacatepec"-INIFAP (CAZACA).	23
Cuadro 3.	Secuencias de los iniciadores diseñados para la detección de virus de DNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	32
Cuadro 4.	Secuencias de los iniciadores diseñados en el presente trabajo para la detección de virus de RNA asociados a <i>Physalis ixocarpa</i> Brot.	34
Cuadro 5.	Material vegetativo de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot., con síntomas de virosis del Campo Experimental "Zacatepec".	35
Cuadro 6.	Material vegetativo de Okra con síntomas de virosis colectado en los estados de Guerrero, Morelos y México.	35
Cuadro 7.	Material vegetativo de diferentes especies inoculados con distintos tipos de virus e identificados con ELISA.	36
Cuadro 8.	Iniciadores diseñados y utilizados para la detección específica de virus de RNAs asociados al cultivo del tomate <i>P. ixocarpa</i> Brot.	49
Cuadro 9.	Plantas de diferentes especies utilizadas como control positivo que mostraron productos de PCR para los diferentes pares de iniciadores.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores AC1048–AV494.	41
Figura 2.	Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores AC1048–AV494 y PAL1v1978-PAR1c496.	43
Figura 3.	Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores PAL1v1978-PAR1c496.	45
Figura 4.	Detección de los geminivirus PHV y TPV en plantas hospederas positivas para la presencia de geminivirus.	46
Figura 5.	Detección de geminivirus en plantas de <i>P. ixocarpa</i> Brot., obtenidas con cultivo de tejidos.	48
Figura 6A	Productos de PCR para el TSWV.	50
Figura 6B	Productos de PCR para el AMV.	51
Figura 6C	Productos de PCR para el CMV.	52
Figura 6D	Productos de PCR para el TEV	53
Figura 6E	Productos de PCR para el TMV.	54

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE DNA Y RNA ASOCIADOS AL CULTIVO DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.) EN PLÁNTULAS OBTENIDAS *IN VITRO*

MOLECULAR DETECTION OF DNA AND RNA VIRUS ASSOCIATED WITH THE TOMATO HUSK CROP (*Physalis ixocarpa* Brot.) IN SEEDLINGS OBTAINED *IN VITRO*

Velasco-Castillo, I.¹ y Valadez-Moctezuma, E.²

RESUMEN

En condiciones de campo el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) es afectado por enfermedades virales, lo que ocasiona pérdidas de hasta 100 % en el rendimiento. Como una alternativa a esta problemática, el campo experimental “Zacatepec” del INIFAP (CAZACA) obtuvieron plantas de tomate de cáscara “libres de virus” mediante cultivo *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue detectar con PCR la presencia de los virus más comunes tanto de DNA como de RNA que atacan al cultivo. Se utilizaron iniciadores previamente reportados para la detección de geminivirus y se diseñaron iniciadores específicos para virus de RNA. Los resultados indicaron la presencia del Virus Huasteco del Chile (PHV), Virus de la Marchites Manchada del Tomate (TSWV), Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus del Mosaico de las cucurbitáceas (CMV), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) y Virus Mosaico del Tabaco (TMV) en las plantas enfermas obtenidas de campo, pero no se detectó presencia viral en ninguna de las plántulas provenientes de cultivo *in vitro*.

Palabras clave: iniciadores específicos, detección, PCR

ABSTRACT

Husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) is affected by virus diseases under field conditions; this situation causes losses of up to 100% of the yield. As an alternative to solving this problem, the INIFAP experimental field “Zacatepec” (CAZACA) obtained seedlings of husk tomato using *in vitro* techniques. The aim of this work was to detect the presence of the main DNA and RNA viruses attacking this crop using PCR. Previously reported primers were used to detect geminivirus, and specific primers were designed in order to detect RNA viruses. The results showed the presence of Pepper Huasteco Virus (PHV), Texano Pepper Virus (TPV), Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Alfalfa Mosaic Virus (AMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Tobacco Etch Virus (TEV) and Tobacco Mosaic Virus (TMV) in diseased plants obtained from the field; however, no viral particles were detected in seedlings cultivated *in vitro*.

Key words: specific primers, detection, PCR

¹ Tesista. Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo.

² Director de tesis. Profesor-Investigador de la Universidad Autónoma Chapingo.

I. INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), es una hortaliza que se utiliza para elaborar salsas y guisos; ya que desde la época prehispánica los aztecas lo cultivaban extensamente (Pérez *et al.*, 1997).

En México, la producción de hortalizas es de los cultivos más sobresalientes en el sector agrícola (Jiménez *et al.*, 1992). De 1990 a 1999, la producción de hortalizas contribuyó con 18 a 20% del valor de la producción nacional, con 13.3% de la superficie total cosecha y con un crecimiento medio de 5% (Garza, 2002). De las hortalizas en el país, *P. ixocarpa* o también llamado tomate de cáscara, tomate verde, tomate de pesadilla, tomatillo y miltomate (Quiroz, 1984), ocupa el sexto lugar de la superficie cosechada (Garza, 2002).

El tomate de cáscara es un cultivo rustico y de ciclo de producción relativamente corto, se cultiva todo el año tanto en el ciclo otoño-invierno como en el de primavera-verano, por lo que genera gran demanda de mano de obra, en promedio 88 jornales por hectárea (Soldevilla *et al.*, 2002). En el año 2003 se tuvo una superficie total sembrada en el país de 56, 522.47 ha, en tanto que la superficie cosechada fue de 54, 044.19 ha, obteniéndose una producción de 726 218.26 ton con un rendimiento promedio de 13.44 ton-ha⁻¹. En este año

agrícola los principales estados productores por superficie cultivada, en orden de importancia, fueron: Sinaloa, Jalisco, Puebla, Estado de México, Michoacán, y Guanajuato (SAGARPA, 2004).

Esta hortaliza, como cualquier otro cultivo, es afectada por plagas y enfermedades que disminuyen su rendimiento y calidad; dentro de estas enfermedades destacan la ocasionadas por virus debido a los daños que producen a su hospedero a nivel microscópico es decir, celular y subcelular, que se manifiestan en síntomas externos o macroscópicos.

Dentro de los factores que contribuyen a la diseminación de estas enfermedades en el tomate de cáscara, además de las condiciones ambientales, es la amplitud de hospederos y la facilidad de transmisión por sus vectores. Los daños ocasionados disminuyen el rendimiento y calidad del producto, y en algunos casos pueden llegar a ocasionar perdidas de hasta un 100% (Ventura *et al.*, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) ha sido utilizada para la detección específica de virus, fitoplasmas, viroides, hongos, bacterias y nematodos. En general esta herramienta se ha empleado en el diagnóstico de enfermedades en plantas que no son fácilmente detectables por otros métodos, o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta.

La micropropagación es una alternativa para la obtención masiva de plantas mejoradas genéticamente con características agronómicas de interés,

incluyendo plantas libres de patógenos. En condiciones de campo el cultivo de tomate se ve afectado por enfermedades de tipo viral, lo que ocasiona pérdidas en la producción hasta del 100 %. En este contexto, el Campo Experimental "Zacatepec"-INIFAP (CAZACA), obtuvo plantas de tomate libres de virus mediante selección masal en varios ciclos (Ventura *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para detectar e identificar los virus de DNA y RNA de mayor importancia para el cultivo de *P. ixocarpa*, en plantas obtenidas por medio de cultivo *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Comprobar mediante PCR que plántulas de tomate de cáscara resistentes a virus (*Physalis ixocarpa* Brot.) y desarrolladas *in vitro* están libres de partículas virales.

1.1.2 Objetivos particulares

- Detectar los virus mas comunes de DNA y RNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot., en plantas con síntomas de virosis obtenidas de campo e inoculadas experimentalmente en invernadero, para utilizarlos como controles positivos.
- Utilizando iniciadores para PCR previamente reportados, detectar molecularmente la presencia de geminivirus; y de forma particular, al Virus Huasteco del Chile (PHV) y al Virus Texano del Chile (TPV) en plantas con síntomas de campo e invernadero.
- Utilizando iniciadores para PCR previamente reportados, detectar molecularmente la presencia de geminivirus; y de forma particular, al Virus Huasteco del Chile (PHV) y al Virus Texano del Chile (TPV) en plántulas de *Physalis ixocarpa* Brot., con resistencia viral obtenidas vía cultivo *in vitro*.

- Diseñar iniciadores específicos para detectar molecularmente los virus de ssRNA (RNA cadena sencilla): Virus mosaico de la alfalfa (AMV), Virus mosaico del pepino (CMV), Virus mosaico del tabaco (TMV), Virus jaspeado del tabaco (TEV), Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSWV) en plantas con síntomas de campo e invernadero.
- Utilizar los iniciadores diseñados para detectar los virus Virus Mosaico de la Alfalfa (AMV), Virus Mosaico del Pepino (CMV), Virus Mosaico del Tabaco (TMV), Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) y Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSWV), en plántulas con resistencia viral de *Physalis ixocarpa* Brot., obtenidas vía cultivo *in vitro*.

1.2 HIPÓTESIS

Comparando fragmentos específicos de DNA provenientes de virus aislados de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), se podrá hacer una rápida detección de los mismos en plántulas de tomate de cáscara provenientes de cultivo *in vitro*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo de tomate de cáscara

2.1.1 Importancia

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), es una hortaliza que ha cobrado importancia en México en los últimos años debido a su uso alimenticio. Su cultivo se caracteriza porque no requiere de cuidados excesivos, tiene grandes perspectivas por sus altos rendimientos, su ciclo de producción es relativamente corto y su relación beneficio/costo favorecen al productor. La importancia se debe a que la superficie cultivada se ha incrementado en función de la demanda (SAGARPA, 2004), porque su consumo per cápita también ha aumentado (Morales y Palacios, 1998; Peña, 1998).

En el año 2003, los principales estados productores (Cuadro 1) en orden de importancia fueron Sinaloa, Jalisco, Puebla, Estado de México, Michoacán y Guanajuato (SAGARPA, 2004).

Cuadro 1. Superficie cultivada, producción y rendimiento de tomate de cáscara en los principales estados productores de México para el año 2003.

Estado	Superficie cultivada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
Puebla	5, 255.00	55, 504.50	10.562
Jalisco	6, 614.50	73, 205.96	11.067
México	3, 573.50	44, 639.00	12.492
Sinaloa	14, 943.00	222, 867.00	14.914
Morelos	2,400.50	33, 947.50	14.142
Michoacán	2, 890.17	39, 842.46	13.785
Hidalgo	1, 238.00	11, 281.86	9.112
Guanajuato	2, 849.00	28, 750.50	10.091

Fuente: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA, 2004).

Desde hace tiempo el fruto del tomate es utilizado por la industria de alimentos envasados y para la fabricación de salsas, lo cual abre la posibilidad de aprovechar los excedentes de producción durante la temporada de mayor oferta, con lo que se mejoran los precios en el mercado (Peña y Márquez, 1990).

Por otra parte, el ciclo corto de producción de esta hortaliza favorece que se cultive en países donde su temporada de producción es corta, como en Polonia (Mulato *et al.*, 1985) y en regiones de Leningrado y Vladivostok, Rusia (Cartujano *et al.*, 1985). También, en la última década se ha mostrado interés por este cultivo en diferentes partes de Estados Unidos: por ejemplo, en Louisiana se realizaron evaluaciones del mismo, porque su desarrollo se adapta a esas latitudes; además tiene valor potencial debido a la demanda por parte de la comunidad mexicana que radica en ese país (Freyre y Brent, 2000).

2.1.2 Clasificación y descripción botánica del tomate de cáscara (Pérez *et al.*, 1997)

Reino.....Vegetal
División..... Spermatophyta
Clase..... Angiospermae
Subclase.....Dicotiledoneae
Orden.....Polymniales
Familia.....Solanaceae
Género.....*Physalis L.*
Especie.....*Physalis ixocarpa* Brot.

P. ixocarpa fue descrito por primera vez por Brotero en 1753 (Moriconi *et al.*, 1990). Es una planta herbácea, anual, de 40-120 cm de altura; su ciclo es de 85-90 días desde la siembra hasta la senescencia; presenta 3 tipos de hábitos de crecimiento: rastrero, erecto y semierecto; tiene hojas simples, erectas, alternadas, de forma ovalada y peciolada, cuyo pecíolo mide de 4 a 6.5 cm de longitud; el fruto es una baya amarilla o verdosa de 1 a 6 cm de diámetro (Saray, 1977; Saray *et al.*, 1978; Moriconi *et al.*, 1990). Las flores están solitarias en el eje axial de las hojas y algunas veces se encuentran en las ramas; tienen corola campanulada, con pétalos amarillos y usualmente con manchas de color púrpura oscuro cerca de la base; el cáliz está unido a manera de bolsa que se extiende y envuelve al fruto (Moriconi *et al.*, 1990). La raíz es

típica o columnar, las raíces laterales crecen superficialmente y de forma perpendicular al eje principal, encontrando la mayor cantidad de raíces en la superficie y cerca del eje central (Mulato *et al.*, 1985). El tallo es estriado, herbáceo o ligeramente leñoso en la base (Saray, 1977). De las especies de *Physalis* que se han reportado en México, sólo se cultiva *P. ixocarpa* (Pérez *et al.*, 1997).

2.2 Virus

2.2.1 Definición

Los virus se han definido como organismos acelulares debido a que carecen de organelos que les permitan realizar sus funciones básicas de seres vivos; es decir de células. Por esta razón requieren de un hospedante para reproducirse, lo que los califica como parásitos obligados. Los virus tienen diferentes tamaños (de 30 a 200 nm aproximadamente) y formas (alargadas, helicoidales, poliédricos, etc.), pero su composición es muy similar. Su estructura consiste principalmente de una cápside formada de proteínas del mismo tipo que envuelve al material genético, que puede ser de una o varias moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ribonucleico (RNA), en donde radican diferentes genes que controlan la expresión de pocas características; además presentan un tallo y una cola que sirve para adherirse a la célula banco (Balbas, 2002).

2.2.2 Características

Algunos virus poseen un recubrimiento externo de lipoproteínas y/o proteínas que facilitan su reproducción, o cuentan con algunas proteínas de actividad enzimática específica para cumplir esta misma función. Los virus reconocen proteínas específicas denominadas receptores en la superficie de las células a las que atacan. Una vez que el virus ha identificado a su célula blanco, se une al receptor e inyecta el material genético a través del tallo dejando la cápside afuera. El material genético así introducido, es capaz de redirigir el metabolismo normal de la célula hacia la producción masiva de copias virales idénticas.

No todos los virus se reproducen de la misma forma. Existen virus que simplemente se reproducen y se excretan de la célula sin causarle mayor problema. Pero otros pueden llegar a ser letales, ya que rompen o lisan a la célula que los hospeda con el fin de liberar las nuevas partículas virales para continuar la infección de otras células. Este modo de reproducción del virus se le conoce como **ciclo lítico**. En algunos casos el DNA del virus puede integrarse directamente en el DNA cromosomal de la célula hospedera, donde se replica pasivamente con cada ciclo celular y se hereda a la progenie sin causar mayor problema. Este ciclo de reproducción se conoce como **ciclo lisogénico**. Algunos virus son capaces de alterar ambos ciclos, sobre todo los virus que atacan a bacterias y que se les conoce con el nombre de **bacteriófagos** (Bálbaz, 2002).

Otra de las características, es que un mismo virus puede causar varios síntomas, debido a condiciones del ambiente, posición de hoja, nutrición, edad, etc. También diferentes virus pueden causar un mismo síntoma, lo que hace aun más difícil su identificación (Lorente, 1998).

Los virus pueden estar en cualquier parte de la planta, excepto en el floema, y hay algunos, muy pocos, limitados al xilema.

2.2.3 Taxonomía de los virus fitopatógenos

Según Bawden (1964) los virus están clasificados en dos grupos, los virus de DNA (ácido desoxirribonucleico) y los virus de RNA (ácido ribonucleico).

Virus de ácido desoxirribonucleico (DNA).

- Virus de DNA de cadena doble o double strand, en ingles (DNA_{ds}).

Virus tipo: caulimovirus, isométrico.

Virus amarillo de comelina (comelina yellow mottle virus, en ingles).

- Virus de cadena sencilla o single strand, en ingles (DNA_{ss}).

Virus tipo: Geminivirus I,II,III.

Virus de ácido ribonucleico (RNA).

- Virus de cadena sencilla (RNA_{ss}).

- Rhabdoviridae, tomato spotted wilt virus (TSWV), virus de la

marchitez manchada del jitomate.

- Bunyaviridae, tospovirus (ornamentales).

➤ Virus de doble cadena (RNA_{ds}) con cubierta proteica sencilla.

- Reoviridae.
- Plant reovirus 1, 2, 3.
- Cryptovirus I, II.

➤ Virus de cadena sencilla (RNA_{ss}) sin cubierta proteica.

- Diacithovirus.
- Ilarvirus (tres partículas de diferentes tamaños).
- Cucumovirus, Bromovirus (tres partículas del mismo tamaño).
- Alfalfa mosaic virus (AMV), virus mosaico de la alfalfa, (con cuatro partículas baciliformes y de tamaños diferentes).
- Comovirus, Fabavirus, Nepovirus, Pea enation mosaic virus (PEMV), virus mosaico del enanismo del chícharo (son multipartitas o de genoma dividido).
- Isométricos o Poliédricos dentro de estos se encuentran los Carmovirus, Necrovirus, Tymovirus, Maize chlorotic dwarf virus, virus clorótico del enanismo del maíz (MCDV).
- Luteovirus (parecido a los isométricos, amplitud de hospedantes diferentes al igual que la información genética).
- Hordeivirus (de varilla).
- Tobravirus (Virus cascabelero del tabaco).

- Furovirus.
- Tobamovirus (Virus mosaico del tabaco, de varilla rígida).
- Virus de varilla flexible.
 - Potexvirus (virus de la papa VPX).
 - Capillavirus.
 - Carlavirus.

2.2.4 Virus descritos para el cultivo del tomate

La literatura relacionada con los virus que infectan al tomate de cáscara es limitada; además algunos autores consideran a la planta como reservorio de estos patógenos, pero la mayoría sólo la utilizan como planta diferencial para la identificación de un gran número de virus que infecta a otros cultivos de importancia económica (Horvath, 1970; Anónimo, 1976; Cdelark *et al.*, 1977), Virus Cascabelero del Tabaco (Tobacco Rattle Virus, TRV), Virus X de la Papa (Potato Virus X, PVX), Virus Y de la Papa (Potato Virus Y, PVY), Virus Falso Amarillento de la Remolacha (Beet Pseudo-Yellows Virus, BPYV), Virus Mosaico de *Physalis* (*Physalis* Mosaic Virus, PhMV), Virus Necrosis del Tabaco (Tobacco Necrosis Virus, TNV), Virus Mosaico de la Berenjena (Eggplant Mosaic Virus, EMV) y Virus Mosaico Aucuba de la Papa (Potato Aucuba Mosaic Virus, PAMV.) (Horvath. 1970). De acuerdo a De la Torre-Almaráz *et al.*, (2003) reportaron los siguientes virus asociados al cultivo: Virus Jaspeado del Tabaco (Tobacco Etch Virus, TEV), Virus Mosaico del Pepino (Cucumber Mosaic Virus,

CMV), Virus Mosaico de la Alfalfa (Alfalfa Mosaic Virus, AMV), Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV), Virus Mosaico del Tabaco (Tobacco Mosaic Virus, TMV), Virus Mancha Anular del Tabaco (Tobacco Ring Spot Virus, TRSV), Virus Huasteco del Chile (Pepper Huasteco Virus, PHV).

2.2.5 Sintomatología que presentan las plantas de *Physalis ixocarpa* Brot., al ser inoculadas con los diferentes virus

Cuando el CMV, se inoculó mecánicamente a las plantas de *P. ixocarpa* Brot., en las hojas se formaron lesiones locales muy intensas aunque no necróticas, después del quinto día de la inoculación; al hacerse sistémico, las hojas mostraron un aclaramiento de las venas y algunas hojas presentaron puntos ocreos que cubrían la superficie de las hojas nuevas (Anónimo, 1975).

El AMV que se inoculó en hojas de *P. ixocarpa* Brot., no indujo lesiones locales, pero en forma sistémica se produjo un aclaramiento venal y un mosaico intervenal severo (Horvath, 1970).

Con el TRV, se menciona que las plantas de *P. ixocarpa* Brot., mostraron susceptibilidad, pero no especificaron el tipo de síntomas provocados (Anónimo, 1975).

Las inoculación con el PVX en hojas de *P. ixocarpa* Brot., no provocaron lesiones locales, pero sistémicamente se observó la formación de puntos

necróticos con un mosaico ligero en las hojas nuevas (Horvath, 1970).

Los reportes que se tienen de plantas inoculadas de *P. ixocarpa* Brot., con el TEV mencionan que no hay formación de lesiones locales y sistemáticamente las plantas presentaron daños severos aunque no presentan síntomas (Greenleaf, 1953).

En hojas inoculadas con el PVY no se observaron lesiones locales en *P. ixocarpa* Brot., pero de forma sistémica se observó un mosaico severo y puntos necróticos (Horvath, 1970).

Cuando las hojas de *P. ixocarpa* Brot., fueron inoculadas con el BPYV, se observó que éstas no formaron lesiones locales, pero sistémicamente hubo un amarillamiento intervenal de las hojas, con puntos cloróticos y las plantas presentaron achaparramiento (Duffos, 1970-1981).

Cuando el PhVM fue inoculado a *P. ixocarpa* Brot., presentó susceptibilidad al patógeno, aunque no se menciona el tipo de síntomas que mostró (Horvath, 1970; Duffos, 1970-1981).

Con el TMV, en hojas inoculadas de *P. ixocarpa* Brot., se formaron lesiones locales de forma irregular entre los dos y tres días después de la inoculación, y a partir del sexto día se observaron lesiones sistémicas, presentando un aclaramiento de venas muy intenso, y enaciones de las hojas. Además, se

observó una reducción del desarrollo de las plantas infectadas hasta del 50% (Anónimo, 1975).

Al inocular el TNV en las hojas de *P. ixocarpa* Brot., se observó la formación de lesiones locales, circulares; las hojas inoculadas se tomaron de una coloración amarillenta y verde fuerte, sin llegar a presentarse síntomas sistémicos (Duffos, 1970-1981).

El TRSV, cuando fue inoculado en las hojas de *P. ixocarpa* Brot., se formaron lesiones locales concéntricas después de dos a tres días de haberse inoculado, la forma sistémica se presentó al sexto día, observándose un aclaramiento de las venas, deformación y puntos necróticos muy pequeños en las hojas (Anónimo, 1975).

En las plantas inoculadas con el EMV, las hojas de *P. ixocarpa* Brot., no mostraron lesiones locales, pero sistémicamente entre los cinco y seis días después de la inoculación apareció un mosaico; más tarde, se observó una reducción en el tamaño de las hojas y en la época de floración y fructificación las plantas fueron seriamente dañadas (Singh *et al.*, 1975).

Con el PAMV, se observaron las hojas de *P. ixocarpa* Brot., inoculadas sin lesiones locales, aunque de forma sistémica ocasionó un aclaramiento de las venas y un marcado mosaico intravenal moteado (Anónimo, 1975).

2.2.6 Virus de DNA que afectan a *P. ixocarpa*

Los virus de DNA que atacan *P. ixocarpa* de DNA son de cadena sencilla, dentro de los cuales se encuentran los *Geminivirus*, formado por los grupos I,II,III, donde se encuentran clasificados los virus huasteco del chile (PHV) y el virus texano del chile (TPV) reportados por De la Torre-Almaráz *et al.*, (2003) y Torres-Pacheco *et al.*, (1996).

2.2.7 Virus de RNA que afectan a *P. ixocarpa*

La mayoría de los virus que afectan a *P. ixocarpa* son de RNA de cadena sencilla, dentro de los más comunes están los siguientes: Virus mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV) de cadena positiva, Familia: Bromoviridae, Género: Cucumovirus; Virus mosaico de la alfalfa (Alfalfa mosaic virus, AMV) de cadena positiva, Familia: Bromoviridae, Género: Alfamovirus; Virus jaspeado del tabaco (Tobacco Etch Virus, TEV) de cadena positiva, Familia: Potyviridae, Género: Potyvirus; Virus Mosaico del Tabaco (Tobacco Mosaic Virus, TMV) de cadena positiva, Familia: Tobamovirus; Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (Tomato Spotted Wilt Virus TSWV) de cadena negativa, Familia: Bunyaviridae, Género: Tospovirus.

2.3 Técnicas moleculares en la detección viral

Las pruebas moleculares en comparación con las pruebas serológicas tienen la ventaja de poder emplear cualquier parte de genoma del virus o viroide con

fines de diferenciación, pero en algunos casos también para identificación; sin embargo, es posible utilizar todo el genoma del virus y compararlo mediante electroforesis de acrilamida (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003). Así mismo, el conocimiento de la secuencia del genoma de ellos, ha permitido el desarrollo de pruebas en un espectro general y específico (Hernández, 2003). El diagnóstico de fitopatógenos por medio de la identificación de sus ácidos nucleicos es un concepto que se ha desarrollado en las últimas dos décadas, por lo que nuevas aplicaciones, protocolos y modificaciones de las técnicas descritas están siendo reportadas continuamente en revistas de divulgación científica (Aguilar, 2004).

2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR ha sido aplicada a la detección e identificación de fitoplasmas, virus, viroides, hongos, bacterias y nemátodos. En general el uso de esta herramienta al diagnóstico de enfermedades en plantas se ha centrado en organismos que no son fácilmente detectados por otros métodos o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta.

Entre las ventajas que presenta esta técnica destacan su sensibilidad (100 a 1000 veces más sensible que ELISA), la rapidez en la obtención de resultados y el potencial para detectar varios patógenos simultáneamente. Las desventajas son el alto costo de sus reactivos y equipos, además de la necesidad de un entrenamiento adecuado para su ejecución debido a la posibilidad de contaminación y la consecuente obtención de falsos positivos.

2.3.2 RT-PCR (Reversa transcriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa)

La PCR se caracteriza porque durante todo su proceso requiere DNA de doble cadena (molde), DNA polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$, iniciadores y un amortiguador apropiado. Para el caso de la detección de virus de RNA es necesario realizar como primer paso una transcripción inversa para sintetizar en un primer tiempo una molécula de DNA a partir del RNA; posteriormente ésta cadena de DNA recién sintetizada conocida como cDNA, servirá de molde para sintetizar la doble cadena de DNA a partir del cual se podrán realizar las reacciones de PCR que se definan con base a los iniciadores utilizados (Aguilar, 2004).

El procedimiento de RT-PCR consta de tres pasos: 1) desnaturalización de RNA e hibridación del iniciador complementario, 2) síntesis de cDNA y 3) amplificación por PCR. Dichos pasos se realizan normalmente como dos procesos desacoplados; es decir, primero se realiza la desnaturalización de RNA, hibridación y síntesis de cDNA y posteriormente la PCR; sin embargo en 1995 Mellet y Cols citado por Hernández (2002) diseñaron un procedimiento de RT-PCR en donde se colocan todos los componentes en un solo tubo, a lo que se le llamo RT-PCR continuo o acoplado.

Sin duda, el descubrimiento y descripción de nuevos genes, moléculas o secuencias son la base para el diagnóstico rápido y preciso de enfermedades en plantas. Estos resultados serán también de vital importancia en la comprensión de las relaciones globales e interacciones existentes entre las plantas y sus patógenos u otros microorganismos asociados.

2.4. Cultivos *in vitro*

Las técnicas de propagación *in vitro* de plantas por medio de tejidos o partes vegetativas han permitido desde hace décadas obtener plantas libres de patógenos, siendo una herramienta para la propagación masiva de plantas sanas. Uno de los objetivos de este trabajo es corroborar que plantas de *P. ixocarpa* “resistentes a virus” obtenidas por medio de cultivos *in vitro*, estén libres de virus.

2.5. Iniciadores (oligonucleótidos)

Los iniciadores (Primers) son oligonucleótidos que complementan una región corta o larga de moléculas de DNA o RNA; estos oligonucleótidos proveen el extremo 3'-OH como sustrato al que cualquier enzima DNA polimerasa puede adicionar nucleótidos en dirección 5'-3'. En procariontes una enzima RNA específica (RNA primasa) cataliza la síntesis de iniciadores de RNA para la duplicación del DNA (especialmente de los fragmentos de okazaki de la cadena retardada). Los iniciadores son también necesarios para las enzimas polimerasas dependientes de RNA. *In vitro*, los iniciadores sintéticos generalmente de alrededor de 10 bases de longitud, son necesarios para cualquier reacción de polimerización de DNA con DNA polimerasa o transcriptasa reversa (Valadez y Khal, 2005).

2.5.1. Iniciadores degenerados

Los iniciadores degenerados son mezclas de secuencias de oligonucleótidos específicas que tienen el mismo número de bases, pero que varían en la secuencia de una de ellas; estos oligonucleótidos se generan del conocimiento previo de una región de DNA de interés, o se deduce a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Este tipo de mezclas de iniciadores se utilizan para detectar otra secuencia similar en un organismo anónimo, y asumiendo que no necesariamente debe tener la misma información genética (secuencia de bases) de la cual se generó la información inicial; entonces, el uso de secuencias similares que varían en las regiones menos conservadas, incrementa la posibilidad de detectar la región anónima buscada. Cuando se diseñan los iniciadores degenerados a partir de las secuencias de proteínas, se considera que el código genético es degenerado, por lo que muchos aminoácidos pueden estar codificados por más de un codón. Por lo tanto, un subgrupo de oligonucleótidos con el mismo número de bases pero de secuencia diferente, son los que servirán como iniciadores alternativos para amplificar la secuencia codificadora de esa proteína particular (Valadez y Khal, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1 Obtención de material vegetativo

Se obtuvieron plantas de tomate de cáscara con síntomas de enfermedades virales en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo y en el campo experimental "Zacatepec" del INIFAP. Se consiguieron muestras de plantas enfermas con los virus de AMV, TMV, CMV, del laboratorio de virus del Departamento de Parasitología Agrícola previamente identificados por técnicas de ensayo inmunoabsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); tanto las plantas de campo como las analizadas con ELISA se utilizaron como controles positivos. Las plantas de cultivos *in vitro* se obtuvieron del Campo Experimental "Zacatepec"-INIFAP (CAZACA) (Cuadro 2). Las semillas de tomate libres de enfermedades virales, proporcionadas por el Campo Experimental Zacatepec, se desinfectaron y se germinaron *in vitro*, en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, donde posteriormente se sembraron secciones de hipocotilo cercano a la raíz (HR), hipocotilo cercano al tallo (HT) y cotiledón en medio de cultivo (MS), adicionado con la combinación de los reguladores de crecimiento: bencilaminopurina-ácido indolacético (BAP-AIA), en concentraciones de 1.5-1.5

mg/L y 2.0-1.5 mg/L, respectivamente. Los cultivos fueron incubados a 25 °C, con 16 horas/luz.

Cuadro 2. Plantas de *Physalis ixocarpa* Brot., obtenidas *in vitro* del Campo Experimental "Zacatepec"-INIFAP (CAZACA).

No. de muestra	Primeras Muestras	Segundas Muestras
1	2.1 COT	2.10 COT
2	2.10 COT	2.10 COT MER
3	2.10 MER	2.1 COT F2
4	2.2 COT	2.1 COT F1
5	2.3 COT	2.2 COT
6	2.5 COT	2.2 COT F1
7	3.10 COT	2.5 HIP MER
8	3.3 COT	2.5 COT MER
9	3.3 MER	2.5 COT
10	3.5 HIP	3.10 HIP F3
11	3.6 COT	3.10 HIP
12	4.5 COT	3.3 COT
13	4.6 HIP	3.3 COT F1
14	4.6 COT	3.6 COT F2
15	4.9 COT	3.6 COT
16	5.8 COT	3.8 COT MER
17	6.2 COT	4.1 COT F1
18	6.3 COT	4.1 COT
19	6.4 COT	4.3 HIP F1
20	6.5 COT	4.6 COT
21	6.6 COT	4.6 COT MER
22	6.6 MER	6.2 COT F1
23	-	6.3 COT
24	-	6.3 COT F1
25	-	6.4 MER

COT = Cotiledón, MER = Meristemo, HIP = Hipocotilo.

3.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA de las diferentes muestras se realizó con el método Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) con algunas modificaciones para estandarizar la calidad del DNA. Primero se lavaron y desinfestaron las partes vegetativas con Dextran®, se congelaron 2 gr de tejido (hoja jóvenes o brotes con síntomas iniciales de virosis, en el caso de las plantas utilizadas como controles positivos; para el caso de las plántulas provenientes de cultivo de tejidos, se utilizó toda la estructura) en Nitrógeno líquido (N_2) y se molieron en un mortero (pre enfriado con N_2 líquido) hasta convertirlo en polvo (sin permitir que se descongelara); después, el polvo se transfirió a un tubo estéril de 35 mL, se añadieron 15 mL de buffer de extracción, mezclándolo muy bien por inversión durante unos segundos, y se incubó a 65 °C en baño de agua por 10 min con inversión ocasional del tubo; una vez que el tubo se retiró y se enfrió se le añadieron 4 mL de acetato de potasio 5 M mezclándolo nuevamente por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente los tubos de las muestras se centrifugaron a 15000 gravedades por 20 min y se filtró el sobrenadante con una tela de gasa o Magitel® estéril a un tubo que contenía 10 mL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó durante 30 min a - 20 °C, después de ese tiempo el DNA apareció como una nube blanquecina, la cuál se transfirió con una asa de vidrio (puede usarse una pipeta Pasteur) a otro tubo de micro centrifuga con 500 µL de buffer de dilución, se le añadieron 2 µL de RNAasa y se incubó a 37 °C durante una hora, una vez transcurrido el

tiempo se le agregaron 50 μ L de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 500 μ L de isopropanol frío, se mezcló y se incubó a -20°C por 2 h, se colectó el DNA con el asa de vidrio y se lavó en etanol al 70 %, la pastilla se resuspendió finalmente en 200 μ L de buffer TE y se almacenó a 4°C .

Para esta extracción se utilizaron los siguientes reactivos:

- A) Buffer de extracción (Tris-HCL pH de 8.0, 100 mM, EDTA pH 8.0, 50 mM, NaCl_2 , 500 mM SDS 1.3% y β -mercaptoetanol 10 mM).
- B) Acetato de potasio 5 M pH 8.0 (ajustado con ácido acético glacial).
- C) Buffer de dilución (Tris-HCL pH 8.0, 50 mM; EDTA pH 8.0, 10 mM).
- D) Acetato de sodio 3 M pH 5.2 (ajustado con ácido acético glacial).
- E) RNAasa 10 mg/mL en Tris-HCL 10 mM.
- F) TE (Tris-HCL pH 8.0 10 mM; EDTA pH 8.0, 1 mM).

3.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA tanto de las plantas con síntomas (testigos positivos) como de las plántulas de cultivo de tejidos, se llevo a cabo utilizando el método de extracción de RNA de Trizol[®] Reagent, Invitrogen/Life technologies. Se pesó 50 – 100 mg de tejido y se homogenizó en un mortero previamente estéril con Nitrógeno líquido hasta pulverizarlo completamente, el homogenizado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contenía 1mL de la solución Trizol[®] Reagent, se mezcló vigorosamente por inversión durante 20

seg y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas, se centrifugó a 12 000 gravedades por 10 min, se tomó todo el sobrenadante y se pasó a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se agrego 0.2 mL de cloroformo (SIGMA) por 1 mL Trizol[®] Reagent, se mezcló vigorosamente por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12 000 gravedades durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y estéril. El RNA se precipitó de la fase acuosa mezclándolo por inversión con 0.25 mL de isopropanol (SIGMA) y 0.25 mL de solución de precipitación con alto contenido de sales (0.8 M de Citrato de Sodio y 1.2 M de NaCl) por cada 1 mL de Trizol[®] Reagent usado. La muestra se incubo por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 gravedades por minuto, se retiro el sobrenadante y se lavo con 1 mL de etanol por cada 1 mL de Trizol[®] Reagent, se agitó con vortex, se centrifugó a 7 500 gravedades por 5 min más, se retiró nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 5 a 10 min. Finalmente el RNA se disolvió en agua libre de RNAasa (GIBCO BRL) y se almacenó a -20 °C.

Las soluciones utilizadas durante la extracción de RNA total se prepararon de la siguiente manera: La solución de Trizol[®] Reagent se adquirió en la casa comercial Invitrogen/Life Technologies. Se utilizó el cloroformo de la casa comercial GIBCO BRL[®], y el isopropanol de la casa comercial SIGMA, la

solución de precipitado se hizo colocando citrato de sodio al 0.8 M agregándole cloruro de sodio al 1.2 M.

3.4 Calidad de DNA y RNA

La calidad y cantidad de DNA y RNA se midieron determinando la concentración de cada uno, así como la integridad de los mismos, los procedimientos se describen a continuación.

3.4.1 Cuantificación de DNA y RNA

La cantidad de DNA y RNA se determinó por medio de un espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER LAMBDA BIO 2.1. Se utilizó una dilución de 1:20 tanto del DNA como del RNA. Ambas moléculas se leyeron a 260 nm. Para determinar la concentración final de DNA, se utilizó la fórmula:

$$\text{Concentración de DNA } \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{DO 260} \times \text{Factor de dilución} \times 50}{1000}$$

en donde el Factor de dilución fue 20 (para este caso) y 50 que es un valor constante.

Para determinar la concentración de RNA la lectura de absorbancia obtenida a 260 nm fue multiplicada por 20 (factor de dilución) y por 40 que es un valor

constante.

Para ambas moléculas se realizaron diluciones de 20 ng/μL que fueron las concentraciones utilizadas para las reacciones de PCR.

3.4.2 Calidad de DNA y RNA

La integridad del DNA y RNA se determinó en geles de agarosa (Invitrogen Life Technologies) al 1.0 % con buffer de corrida TBE 1X (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM) (Sambrook *et al.*, 1989). Se cargaron en los geles 100 ng de RNA o 500 ng de DNA mezclados con 1/3 de volumen de buffer de carga 10X (0.1% de azul de bromofenol (p/v); 0.1% de xileno cianol (p/v); 40% de glicerol y 60 mM de EDTA pH 8.0). Se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales y distintas para cada caso, ya que el RNA es muy susceptible de degradación por contaminación de DNAsas. Los geles se corrieron a 90 voltios (V) durante 45 min y después de la corrida se tiñeron con bromuro de etidio (0.4 a 1.0 μg·mL⁻¹). Posteriormente se visualizaron en un transiluminador de luz UV de la marca Dual-Intensity y se documentaron con un analizador de imágenes Kodak Digital Science.

3.5 Transcripción inversa y reacción en cadena de la Polimerasa acoplado (RT-PCR) para los virus de RNA

Para esta reacción se llevó a cabo la formación del DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mediante el uso de una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA (reverso transcriptasa). Existen varias enzimas de este tipo en el mercado siendo las mas conocidas la AMV obtenida del Virus de Mieloblastosis Aviar, la M-MLV purificada del Virus de la leucemia Murina de Maloney, la Ruth procedente de *Thermus thermophyllus* y la SuperScript II. Para la síntesis del cDNA de los diferentes virus de interés, se utilizaron tubos de PCR de 200 µL, prepararon mezclas (25 µL) que contenían 8.5 µL de agua libre de nucleasas, 5 µL del buffer de reacción AMV/Tfl (5X), 0.5 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM de cada dNTP), 2 µL del iniciador "Downstream" (100 pmol), 2 µL del iniciador "Upstream" (100 pmol) y 1 µL de MgSO₄ (25 mM). Estos reactivos se mezclaron con la micropipeta y se le añadieron los siguientes componentes: 0.5 µL AMV reversa transcriptasa (5 u/µL) y 0.5 µL Tfl DNA polimerasa (5 u/µL); el tubo de microcentrifuga se agitó con vortex durante 10 seg, se le adicionaron 5 µL de RNA blanco, para cada uno de los aislamientos y al final se le añadieron 25 µL de aceite mineral libre de nucleasas y estéril para evitar la evaporación y condensación. Los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (9700 de Applied Biosystems) con los siguientes tiempos y temperaturas, para la síntesis de la primer cadena de cDNA, 1 ciclo de 45 °C durante 45 min (transcripción reversa), y 1 ciclo de 94 °C por 2 min

(inactivación de la AMV RT y primer desnaturalización de RNA/cDNA). Para la síntesis de la segunda cadena cDNA y amplificación por PCR, 40 ciclos de 94 °C por 30 seg (desnaturalización), 60 °C por 1 min (alineamiento) y 68 °C por 2 min (extensión), 1 ciclo de 68 °C por 7 min (extensión final), 1 ciclo de 4 °C por tiempo indefinido. Todos los reactivos utilizados para estas reacciones de RT-PCR fueron de la marca Promega.

3.6 Iniciadores (oligonucleótidos) utilizados en este trabajo

Para este trabajo se utilizaron dos tipos de iniciadores, los específicos y los degenerados. Para los virus de DNA se emplearon iniciadores previamente utilizados por otros autores; para los virus de RNA, se diseñaron y sintetizaron iniciadores específicos para cada uno de los diferentes virus que se consideraron en este trabajo.

3.6.1 Detección de virus de DNA (Geminivirus) asociados a *Physalis ixocarpa* Brot.

En el Cuadro 3 se indican las secuencias correspondientes a los pares de iniciadores utilizados en el presente trabajo.

Para la detección de posibles Geminivirus en las plántulas de *P. ixocarpa* obtenidas *in vitro*, se utilizaron dos pares de iniciadores; el par PAL1v1978-

PAR1c496 que detecta un fragmento de 1100 pb del componente A y, que abarca desde parte del gen AC4 que codifica para la proteína de los síntomas de expresión, hasta parte del gen AV1 que codifica para la proteína de la cápside (Rojas *et al.*, 1993). El segundo también dirigido al componente A, AV494-AC1048, detecta un fragmento de 550 pb ubicado entre el gen de la proteína de la cápside (AV1) y el gen AC2 que codifica para la proteína de activación de la transcripción (Wyatt y Brown, 1996). Para la detección específica del Virus Huasteco del Chile (PHV) y del Virus Texano del Chile (TPV) se utilizaron los iniciadores específicos 240-241 y 425-426 reportados por (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). El primer par de secuencias amplifican una región de 350 pb correspondiente a la región “común” del componente A del PHV, mientras que el segundo reconoce también la región común y amplifican prácticamente todo el componente A del TPV.

Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores diseñados para la detección de virus de DNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot.

Iniciadores ^a	Secuencia de los nucleótidos	Producto esperado	Virus
PAL1v1978	5'-gCATCTgCAggCCCACATYgTCTTYCCNgT- 3'	1100 pb	Geminivirus
PAR1c496	5'-AATACTgCAgggCTTYCTRTACATRgg-3'		
AV494	5'-gCCCATgTATAgAAAgCCAAg -3'	550 pb	Geminivirus
AC1048	5'- ggATTAgAggCATgTgTACATg -3'		
240	5'-ggCTTATTTgTAATAAgAgAggTgT -3'	350 pb	PHV
241	5'-gAATTAAAggTACATggACCACTT -3'		
425	5'- ggAgTCCCCAAgAggCTTTA -3'	2600	TPV
426	5'- ACAATAgAgggCTgAgATTA -3'		

^a Las nomenclaturas corresponden a lo siguiente: P = Primer o Iniciador, AL1 y AR1 = marco de lectura abierta para el componente A del Geminivirus, y la dirección en que se alinea con respecto a la región común (Left) izquierda, (Right) derecha, v = sentido de la iniciador viral, numero = posición dentro del componente A del Geminivirus, AV = secuencia viral del componente A del Geminivirus, AC = secuencia complementaria del componente A del Geminivirus, PHV y TPV= nombre abreviado de los geminivirus; los nucleótidos son representados por letras simples, a = adenina, t = timina, c = citosina, g = guanina, y = c,t; n = a,c,g,t.

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

Debido a que la gran parte de los genomas de los virus fitopatógenos es conocido, el diseño de los iniciadores de virus de RNA asociados al cultivo del tomate, se basó en las secuencias reportadas en el banco de genes

(¹GENBANK versión 105.0+) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de la Biblioteca de Medicina, dependiente del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica. Se hizo un consenso de las secuencias correspondientes al gen de la proteína de la cápside para los virus de interés en este estudio, incluyendo las variantes de los virus reportadas. A partir de las zonas consenso de este gen, se diseñaron los pares de iniciadores específicos utilizando los programas PRIMER 3 y FASTPCR (Cuadro 4). Todos los iniciadores diseñados fueron sintetizados por SIGMA-GENOSYS.

Los iniciadores (AMVF-AMVR) para el Virus Mosaico de la Alfalfa (AMV), detectan un fragmento de 554 pb. El par CMVF-CMVR detecta un fragmento de 407 pb en el Virus Mosaico del Pepino (CMV); los iniciadores diseñados para la detección del Virus Mosaico del Tabaco (TMV) fueron el par TMVF-TMVR que detectan un fragmento de 436 pb; y finalmente los pares TEVF-TEVR y TSWVF-TSWVR que detectan a los Virus Jaspeado del Tabaco (TEV) y al Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSWV), amplifican un fragmento de 540 pb y uno de 660 pb respectivamente.

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores diseñados en el presente trabajo para la detección de virus de RNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot.

Iniciadores ^a	Secuencia de los nucleótidos	Producto esperado	Virus
AMVF	5'-TggTgggAAAgCTggTAAAC -3'	554 pb	AMV
AMVR	5'-CgACCCAAACTTCgTTgAAT -3'		
CMVF	5'-ggATgCgCgCTgATAATgCT -3'	407 pb	CMV
CMVR	5'-gCCAATTACTACACACgCTA -3'		
TMVF	5'-TTAgCCggTTTggTCgTCACg -3'	436 pb	TMV
TMVR	5'-TCgAgATCgAAACTTTgCAAgC -3'		
TEVF	5'-ACTgCggCATCggTTgCCAgC -3'	540 pb	TEV
TEVR	5'-ACATCggCgTTggCACCTgTC 3'		
TSWVF	5'-TTAgCCggTTTggTCgTCACg 3'	660 pb	TSWV
TSWR	5'-TCgAgATCgAAACTTTgCAAgC 3'		

^a El código es el siguiente: AMV, CMV, TMV, TEV, TSWV = nombre abreviado del virus, F y R= la dirección del iniciador, (Forward = adelante, sentido viral del iniciador y Reverse = reverso o iniciador complementario), los nucleótidos son representados por letras simples, a = adenina, t = timina, c = citosina, g = guanina,

3.7 Evaluación de los iniciadores diseñados para detectar virus de RNA asociados a plantas de *Physalis ixocarpa* Brot., con síntomas de virosis.

Cada par de los iniciadores indicados en el Cuadro 4, se evaluaron con plantas de diferentes especies, entre ellas, de tomate de cáscara, que presentaron

síntomas de virosis. En las plantas que fue posible detectar el fragmento buscado, se consideró como un control positivo para ese virus en particular. En los cuadros 5, 6 y 7 se indican las plantas con síntomas utilizadas, la nomenclatura utilizada en el presente estudio y su procedencia.

Cuadro 5. Material vegetativo de *Physalis ixocarpa* Brot., con síntomas de virosis del Campo Experimental "Zacatepec".

Plantas de campo		Ramas de invernadero		Plantas de campo	
2-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	2-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	1E	<i>P. ixocarpa</i> Brot.
4-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	4-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	2E	<i>P. ixocarpa</i> Brot.
7-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	7-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	3E	<i>P. ixocarpa</i> Brot.
8-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	8-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	4E	<i>P. ixocarpa</i> Brot.
				5E	<i>P. ixocarpa</i> Brot.

Cuadro 6. Material vegetativo de Okra con síntomas de virosis colectado en el estado de Guerrero, Morelos y México.

Muestra	Planta	Procedencia
PE	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Okra enferma. Mor.
2A	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Tetecalitla, Mor.
2Co	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Tetecalitla, Mor.
3	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Tetecalitla, Mor.
5B	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Tetecalitla, Mor.
8	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Santa Teresa, Gro.
9A	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Santa Teresa, Gro.
9B	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Santa Teresa, Gro.
12A	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	Santa Teresa, Gro.

Cuadro 7. Material vegetativo de diferentes especies inoculados con distintos tipos de virus e identificados con ELISA.

Muestra	Planta	Procedencia
A	Toloache (<i>Datura stramonium</i>)	Invernadero UACH.
B	Jitomate (<i>Lycopersicum sculentum</i> L.)	Invernadero UACH.
C	Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	Invernadero UACH.
D	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Invernadero UACH.
E	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Invernadero UACH.
F	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Invernadero UACH.
G	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Invernadero UACH.
H	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Invernadero UACH.
I	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Invernadero UACH.

3.8 PCR para la detección de virus de DNA y de RNA asociados a *Physalis ixocarpa* Brot., en los controles positivos.

Todas las reacciones de PCR realizadas en el presente trabajo se realizaron con los mismos volúmenes y concentraciones de los reactivos respectivos. Para la detección de geminivirus se preparó una mezcla de reacción con 100 ng del DNA proveniente del control positivo seleccionado, 1.5 U de DNA polimerasa *Taq* (Fermentas), 200 μ M de cada dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 50 pM del iniciador de cada par (PAL1v1978-PAR1c496; AC1048-AV494) (Cuadro 4), 1X buffer de reacción, agua libre de nucleasas (a un volumen final de 25 μ L); al final se colocaron de 1 a 2 gotas de aceite mineral estéril para evitar la evaporación y condensación. La PCR se realizó en un termociclador (Gene Amp® PCR System 9700) con las siguientes condiciones de ciclaje: 1 ciclo de pre-

desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos [94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 3 min], 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min y 4 °C por tiempo indefinido para mantener la reacción. Las muestras de los controles positivos fueron las siguientes: PE, PS, 2A, 2Co, 3, 5B, 8, 9A, 9B, 12A, 1E, 2E, 3E, 4E, 5E, 2Ct, 2I, 4C, 4I, 7C, 7I, 8C, 8I, A, B, C, D, F, G y H. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1.2 %, se tiñeron con Bromuro de Etidio y se fotodocumentaron para su análisis con un equipo Kodak Digital Science 1D® V.2.0.3. Se incluyó un testigo (PE) previamente identificado de una planta de okra (*Abelmoschus esculentus* L.) afectada por un Geminivirus recientemente reportado (Díaz-Rivera *et al.*, 2006) y un testigo de planta sana (PS).

La detección específica de los Virus Huasteco del Chile (PHV) y Virus Texano del Chile (TPV), se realizó solo con las muestras que resultaron positivas para geminivirus, que fueron: PHV (control positivo) ,5B, 2Ct, 4C, 4I, 2I, 8I, F, H, PE. Las mezclas de reacción fueron las ya indicadas anteriormente y las condiciones de ciclaje utilizadas para la detección del PHV fueron: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos [94 °C, 1 min; 45 °C, 2 min; 72 °C, 3 min], 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min y 4 °C por tiempo indefinido para mantener la reacción; mientras que para la detección del TPV fueron: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos [94 °C, 1 min; 55 °C, 2 min; 72 °C, 3 min], 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min y 4 °C por tiempo indefinido para mantener la reacción. El control positivo consistió de DNA proveniente de planta de chile afectada por PHV, proporcionado por el Centro

Nacional de Referencia Fitosanitaria, DGSV). Los productos amplificados se separaron, se tiñeron y se documentaron de la misma manera ya indicada.

Las reacciones de PCR para los virus AMV, CMV, TSWV, TEV y TMV se realizaron una vez obtenido el cDNA mediante la RT-PCR. Las mezclas de reacción para PCR se prepararon de la misma manera indicada previamente; pero las condiciones de termociclaje variaron dependiendo del par de iniciadores. Para los iniciadores (AMVF-AMVR), (CMVF-CMVR) y (TSWVF-TSWVR) se utilizó el programa: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 45 ciclos [94 °C, 1 min; 63.7 °C, 1 min; 72 °C, 3 min], 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min y 4 °C por tiempo indefinido. Para los pares de iniciadores (TEVF-TEVR) y (TMVF-TMVR) las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 2 min; 45 ciclos [94 °C, 1 min; 70 °C, 1 min; 72 °C, 3 min], 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min y 4 °C por tiempo indefinido para mantener la reacción. Las muestras de los controles positivos fueron las siguientes: A, B, C, D, E, F, G, H, I, MT1, MT2, MR1, MR2, MF1, MF2. Para estos casos los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 19:1 en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con AgNO₃ 0.2% de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2005). Para la documentación se utilizó el mismo sistema Kodak Digital Science 1D® V.2.0.3

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Detección de geminivirus en plantas de diferentes especies con síntomas de virosis utilizando los iniciadores degenerados AC1048-AV494.

Es difícil presuponer que un determinado virus fitopatógeno está asociado a un síntoma particular. Esto se debe a que un solo virus puede ocasionar distintos síntomas; o bien, varios virus colaborar en la manifestación de un síntoma típico de virosis (Lorente, 1998). Por esta razón, para lograr el objetivo el presente estudio referente a la aplicación de técnicas moleculares para detectar virus específicos en plantas de tomate de cáscara, sobre todo calificadas como “libres de virus” fue necesario diseñar herramientas moleculares para lograr lo propuesto. Una vez diseñadas estas herramientas, fue necesario coleccionar plantas reservorias y afectadas de virus fitopatógenos (referidas en los Cuadros 5, 6 y 7), para identificar aquellos reportados en la literatura para el cultivo del tomate (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003) y utilizar esas plantas como controles positivos.

Para la búsqueda de las plantas positivas para geminivirus en general, se utilizaron los iniciadores AC1048-AV494 dirigidos al componente A, que flanquean parte del gen de la proteína de la cápside y parte del gen AC4 que codifica la proteína de expresión de síntomas. En la Figura 1, se muestra el fragmento esperado de 550 pb pero solamente en los carriles 2 (testigo positivo)

y 7 (5B); ambas plantas corresponden a okra y provienen de la región de Tetecalitla, Gro., en donde recientemente se identificó (Díaz-Rivera *et al.*, 2006) el geminivirus “Okra yellow mottle Iguala Virus” en este cultivo (NCBI Acceso número AY751753. Diciembre de 2005), por lo que se consideraron **positivas para geminivirus**. El resto de las plantas evaluadas en este experimento (okra y tomate de cáscara con síntomas de virosis) se consideraron negativas por carecer de este marcador. Sin embargo, en la misma Figura, también se observan dos fragmentos más, uno de alrededor de 350 pb presente en la mayoría de los carriles, a excepción del 4, 5, 12, 13, 15 y 16. Este fragmento también está presente en los carriles 2 y 7, por lo que pudiera estar asociado a la presencia de geminivirus. El segundo fragmento de alrededor de 300 pb correspondiente a la dimerización de los iniciadores. Este par de iniciadores se han caracterizado porque 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), lo que concuerda totalmente con los resultados obtenidos.

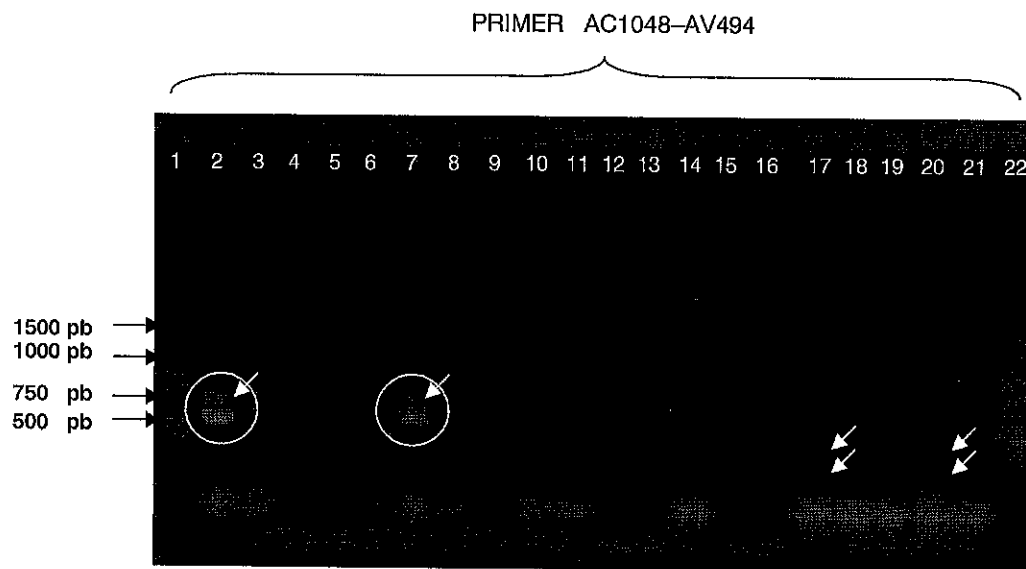


Figura 1. Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores AC1048-AV494.

1 y 22 = marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas), 2 = control positivo (PE), okra enferma con geminivirus, 3= control negativo (PS), planta sana; carriles 4, 5, 6 y 7= muestras de plantas de okra (2A, 2Co, 3, 5B) provenientes de Tetecalitla, Mor.; carriles 8, 9, 10 y 11= muestras de plantas de okra (8, 9A, 9B, 12A) provenientes de Santa Teresa, Gro.; carriles 12, 13, 14, 15 y 16= muestras de plantas de *P. ixocarpa* (1E, 2E, 3E, 4E y 5E) provenientes de campo en Zacatepec; carriles 17, 19 y 21= muestras de plantas de *P. ixocarpa* (2C, 4C y 7C) provenientes del campo experimental "Zacatepec"; 18 y 20= muestras de ramas de *P. ixocarpa* (2I y 4I) provenientes del invernadero del campo experimental "Zacatepec".

Los círculos señalan los fragmentos de DNA esperados y las flechas sin círculo señalan algunos fragmentos de distinto peso molecular detectados, pero casi imperceptibles.

En la primera mitad de la Figura 2, se muestran los resultados de las plantas restantes analizadas con los iniciadores AC1048-AV494. Solamente en el carril 4 de esta Figura, se puede observar el mismo fragmento de 350 pb (muestra 8I: de rama de tomate de cáscara); mientras que los carriles 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 resultaron negativos, a excepción de un barrido en los carriles 2 y 11. La segunda parte del gel, en los carriles 13 a 23, contiene los análisis moleculares con el par de iniciadores PAL1v1978–PAR1c496 reportados por Rojas *et al.*, (1993), que detectan un fragmento de alrededor de 1100 pb en el componente A de cualquier geminivirus (los iniciadores flanquean parte del gen 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 solamente en los carriles 13 y 19 que corresponden a las mismas muestras PE y 5B, que resultaron positivas con los iniciadores AC1048-AV494. El resto de las muestras (14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 y 23) analizadas con estos mismos iniciadores fueron negativas. Con estos resultados se confirma la presencia de geminivirus en las muestras señaladas y de acuerdo a lo antes mencionado por los autores.

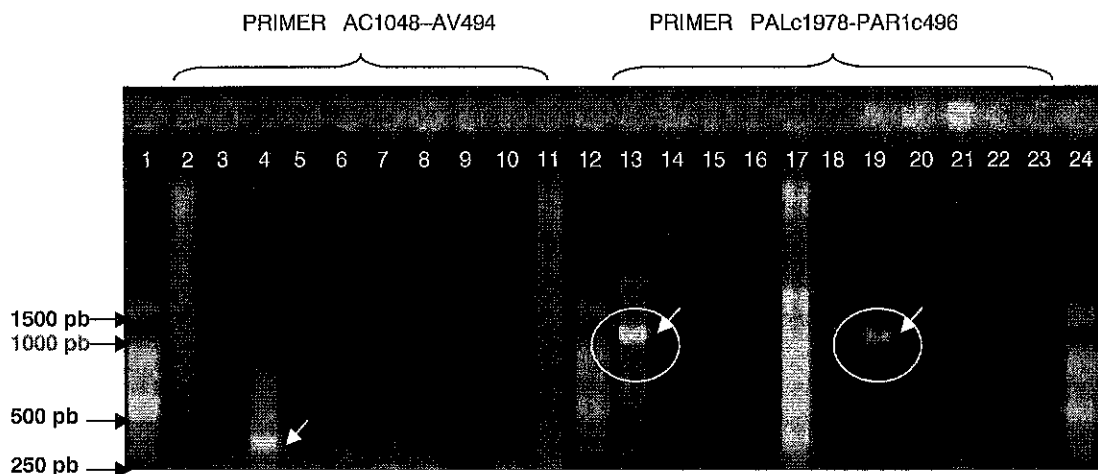


Figura 2. Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores AC1048-AV494 y PAL1v1978-PAR1c496.

Carriles 1, 12 y 24= marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); carriles 2 al 11= productos de PCR amplificados con los iniciadores AC1048-AV494; carriles 13 al 23= productos de PCR amplificados con los iniciadores PAL1v1978-PAR1c496. Las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: carriles 2 y 4= muestras de ramas de *P. ixocarpa* Brot. (7I y 8I) provenientes del invernadero del campo experimental "Zacatepec"; carril 3= muestra de *P. ixocarpa* Brot. (8I) proveniente del campo experimental "Zacatepec"; carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11= muestras de plantas dañadas por virus de diferentes especies (A, B, C, D, F, G, Y H). Para los productos de PCR con los iniciadores PAL1v1978-PAR1c496: carril 13= Control positivo (PE), de planta de okra enferma con Geminivirus; 14= Control negativo (PS) planta sana; carriles 15, 16, 17, 18 y 19= muestras de plantas de okra (2A, 2Co, H, 3, y 5B) provenientes de Tetecalitla, Mor.; carriles 20, 21, 22 y 23 = Muestras de plantas de okra (8, 9A, 9B, 12A) provenientes de Santa Teresa, Gro.

Los círculos señalan los fragmentos de DNA esperados y las flechas sin círculo señalan algunos fragmentos de distinto peso molecular detectados.

En la Figura 3 se complementa el análisis realizado con los iniciadores PALc1978-PAR1c496. El carril 1 y 22 contienen el marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas), en los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 15, 16, 17 y 18, no se detectó ninguna amplificación; pero en los carriles 7, 8, 9, 10 y 14 se observó un fragmento de 1100 pb aproximadamente, similar al amplificado en el control positivo. Si se reconsideran estas muestras que refieren a las plantas 2C, 2I, 4C y 4I y que aparentemente fueron negativas para la primera detección con los iniciadores AC1048-AV494 en la Figura 1, puesto que solo presentaron el fragmento de 350 pb “asociado” con la presencia de geminivirus; en esta segunda evaluación, fue posible detectar el fragmento de 1100 pb indicativo de la presencia de geminivirus. De la misma manera, las muestras de los carriles 19, 20 y 21, mostraron distintos fragmentos (plantas F, *Nicotiana tabacum*: 1000 pb) (G, *Phaseolus vulgaris*: 1100 pb y 600 pb) y (H *Hordeum vulgare*: 900pb y 500 pb). Estos últimos fragmentos aún cuando no indican la presencia de un geminivirus del mismo tipo presente en las muestras PE y 5B, es posible que contengan otro tipo de molécula viral reconocida por los mismos iniciadores, de acuerdo a lo señalado por Rojas *et al.*, (1993).

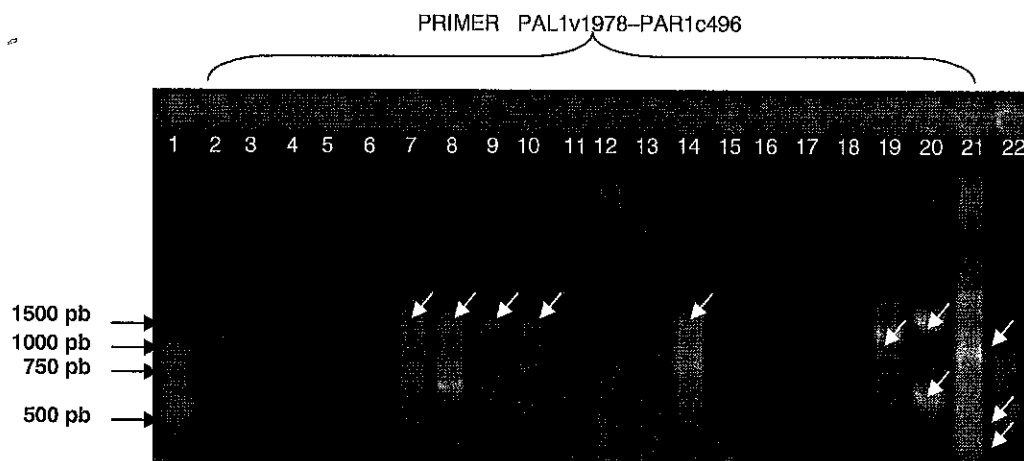


Figura 3. Detección de geminivirus en plantas hospederas de diferentes especies con los iniciadores PAL1v1978-PAR1c496.

Carriles 1 y 22= marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carriles 2, 3, 4, 5 y 6= muestras de *P. ixocarpa* Brot. (1E, 2E, 3E, 4E Y 5E) provenientes de campo de Zacatepec; carriles 7, 9, 11 y 13= muestras de *P. ixocarpa* Brot. (2C, 4C, 7C y 8C) del campo experimental de Zacatepec; carriles 8, 10, 12 y 14= muestras de ramas de *P. ixocarpa* Brot. (2I, 4I, 7I y 8I) provenientes del invernadero del campo experimental Zacatepec; carriles del 15 al 21= muestras de plantas dañadas por virus de diferentes especies (A, B, C, D, F, G, H) provenientes del Invernadero de Parasitología de la UACH.

Las flechas señalan los fragmentos esperados de 1100 pb; pero también señalan otros fragmentos de menor peso molecular.

Con la finalidad de detectar específicamente la presencia de los geminivirus PHV y TPV en las plantas que resultaron positivas con los dos pares de iniciadores degenerados; estas mismas muestras (PE, 5B, 2C, 2I, 4C, 4I, 8I, F y H) se amplificaron con los iniciadores 240-241 y 425-426 diseñados por Torres-Pacheco *et al*, (1996). Los resultados se muestran en la Figura 4. Como se observa, solo en los carriles 2 (control positivo) y 11 (PE) se detectó el fragmento esperado de 350 pb propio del PHV (control positivo proporcionado por el Centro de Referencia Fitosanitaria, DGSV). Las muestras 2C, 2I, 4I y 8I

fueron positivas para TPV porque se amplificó el fragmento de 2.6 kb reportado por Torres-Pacheco *et al.*, (1996). Estos resultados demuestran la utilidad de la detección molecular y confirman la presencia de geminivirus tipo PHV y TPV en los controles positivos.

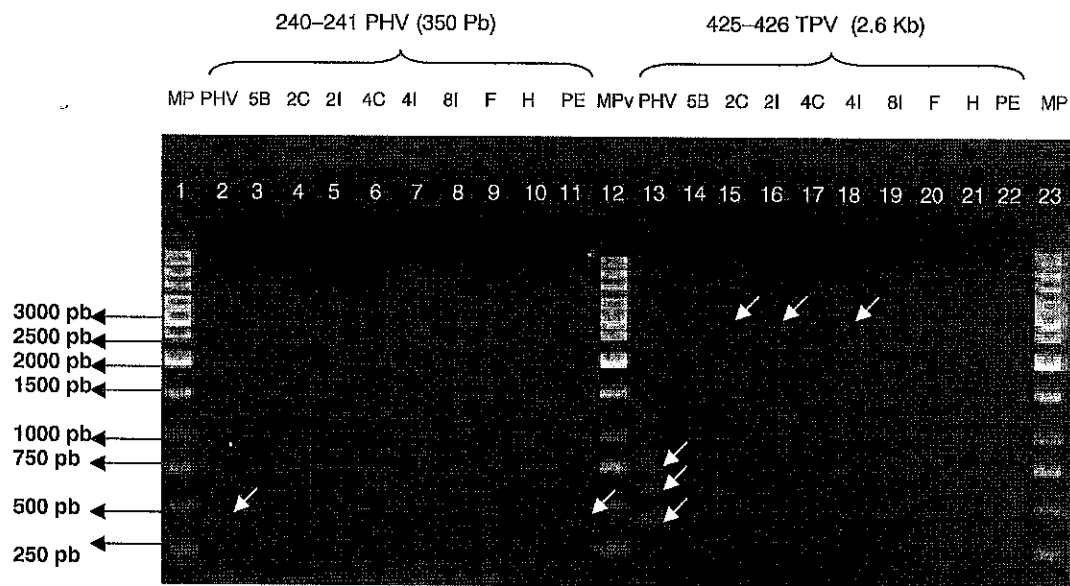


Figura 4. Detección de los geminivirus PHV y TPV en plantas hospederas positivas para la presencia de geminivirus.

Productos amplificados con los iniciadores específicos 240-241 y 425-426. Las muestras se cargaron en el gel de la siguiente manera: del carril 2 al 11= PCR para el PHV, del carril 13 al 22= PCR para el TPV. En los carriles 1, 12 y 23= marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Carril 2= control positivo (PHV) de Planta de Chile; carril 3= muestra 5B; carril 4= 2C; carril 5= 2I; carril 6= 4C; carril 7= 4I; carril 8= 8I; carril 9= F; carril 10= H; carril 11= PE. Para TPV: carril 13= control positivo (PHV) de Planta de Chile; carril 14= 5B; carril 15= 2C; carril 16= 2I; carril 17= 4C; carril 18= 4I; carril 19= 8I; carril 20= F; carril 21= H y carril 22= PE.

Las flechas señalan los fragmentos esperados de 350 pb y 2.6 kb; pero también señalan otros fragmentos de menor peso molecular.

4.1.1 Detección de geminivirus en plántulas de tomate de cáscara (*P. ixocarpa* Brot.) obtenidas con cultivo *in vitro*.

Una vez identificados los controles positivos para los diferentes virus de DNA, se realizaron las reacciones de PCR correspondientes para detectar geminivirus en general y particularmente los virus PHV y TPV en las plántulas de tomate obtenidas por medio de cultivo *in vitro* ("libres de virus"). Los resultados obtenidos con los iniciadores AC1048-AV494 y PAL1v1978–PAR1c496 se muestran en la parte superior e inferior de la Figura 5, respectivamente. Como se observa en ambos casos, solamente se detectó la presencia de geminivirus en los carriles 2, 25 y 35, que contenían DNA de la planta utilizada como control positivo (5B); en donde se amplificaron los fragmentos de 550 pb (par AC1048-AV494) y el de 1100 pb (par PAL1v1978–PAR1c496). El resto de los carriles conteniendo las muestras de DNA de las plántulas obtenidas vía cultivo *in vitro*, mostraron resultados negativos. Con base en estos resultados negativos, se puede demostrar ampliamente que las plántulas de tomate de cáscara *obtenidas in vitro*, estuvieron "libres de geminivirus". La aplicación de esta herramienta molecular basada en marcadores, como se ha demostrado, es extremadamente sensible (de 100 a 1000 veces respecto a la detección con ELISA) tal como lo menciona (Aguilar, 2004).

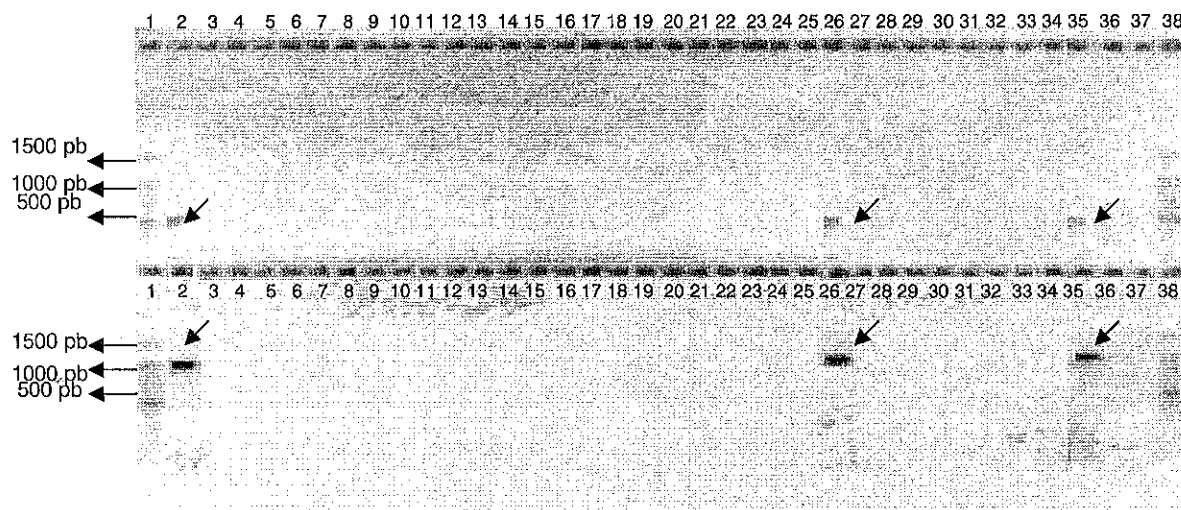


Figura 5. Detección de geminivirus en plantas de *P. ixocarpa* Brot., obtenidas con cultivo de tejidos.

Productos amplificados para detección de geminivirus con los iniciadores degenerados AC1048-AV494 (parte superior del gel) y PAL1v1978-PAR1c496 (parte inferior del gel). Carriles 1 y 38= marcador de peso molecular de 1Kb (Promega); carriles 2, 26 y 35 controles positivos (5B); carriles 3= 2.1 COT; 4= 2.10 COT; 5= 2.10 MER; 6= 2.2 COT; 7= 2.3 COT; 8= 2.5 COT; 9= 3.10 COT; 10= 3.3 COTa; 11= 3.3 MER; 12= 3.5 HIP; 13= 3.6 COT; 14= 4.5 COT; 15= 4.6 HIP; 16= 4.6 COTa; 17= 4.9 COT; 18= 6.2 COT; 19= 6.3 COT; 20= 6.4 COT; 21= 6.5 COT; 22= 6.6 COT; 23= 6.6 MER; 24= 5.8 COT; 25= 3.6 COT F2a; 27= 3.3 COTb; 28= 3.3 COT F1a; 29= 3.8 COT MERa; 30= 4.6 COTb; 31= 4.6 COT MERa; 32= 3.6 COT F2b; 33= 3.3 COTc; 34= 3.3 COT F1b; 36= 3.8 COT MERb; 37= 4.6 COTc.

Las flechas señalan los fragmentos detectados.

4.2. Diseño de iniciadores específicos para la detección de virus de RNA asociados al cultivo del tomate *P. ixocarpa* Brot.

Los resultados más significativos que se obtuvieron de este trabajo fueron en primer lugar, los iniciadores que se diseñaron y se utilizaron para la detección específica de los virus de RNA asociados al cultivo del tomate *P. ixocarpa*, a

través de una región del gen de la proteína de la cápside. Estas secuencias fueron capaces de detectar 5 diferentes virus de RNA de cadena sencilla, en función del peso molecular del fragmento esperado, Cuadro 8.

Cuadro 8. Iniciadores diseñados y utilizados para la detección específica de virus de RNAs asociados al cultivo del tomate *P. ixocarpa*.

Iniciadores específicos	Secuencia de nucleótidos	Producto esperado	Virus identificado*
TSWVF	5'-TTAGCCGGTTTGGTCGTCACG 3'	660 pb	TSWV
TSWVR	5'-TCGAGATCGAACTTTGCAAGC 3'		
AMVF	5'-TGGTGGGAAAGCTGGTAAAC 3'	554 pb	AMV
AMVR	5'-CGACCCAACTTCGTTGAAT 3'		
CMVF	5'-GGATGCGCGCTGATAATGCT 3'	407 pb	CMV
CMVR	5'-GCCAATTACTACACACGCTA 3'		
TEVF	5'-ACTGCGGCATCGGTTGCCAGC 3'	540 pb	TEV
TEVR	5'-ACATCGGCGTTGGCACCTGTC 3'		
TMVF	5'-TTAGCCGGTTTGGTCGTCACG 3'	436 pb	TMV
TMVR	5'-TCGAGATCGAACTTTGCAAGC 3'		

* AMV = Alfalfa Mosaic Virus (Virus Mosaico del Alfalfa), CMV = Cucumber Mosaic Virus (Virus Mosaico del Pepino), TMV = Tobacco Mosaic Virus (Virus Mosaico del Tabaco), TEV = Tobacco Etch Virus (Virus Jaspeado del Tabaco), TSWV = Tomato Spotted Wilt Virus (Virus de la Marchitez Manchada del Tomate).

4.2.1 Detección específica de virus de RNAs asociados al tomate de cáscara *P. ixocarpa* Brot., en plantas hospederas de diferentes especies.

Al realizar la PCR en los controles positivos y en las plántulas de cultivo *in vitro*, con los iniciadores diseñados para detección de los virus de RNA considerados,

los resultados obtenidos se aprecian en los diferentes fragmentos de la Figura 6. En la Figura 6A se presentan las amplificaciones para el TSWV; donde se obtuvo el fragmento esperado de 650 pb en los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 10 que corresponden a las plantas de diferentes especies (Cuadro 7) utilizadas como control positivo (A, B, C, D, E y H); y los carriles 12 al 17 que contienen muestras de las plántulas de cultivo *in vitro* carentes de amplificación.

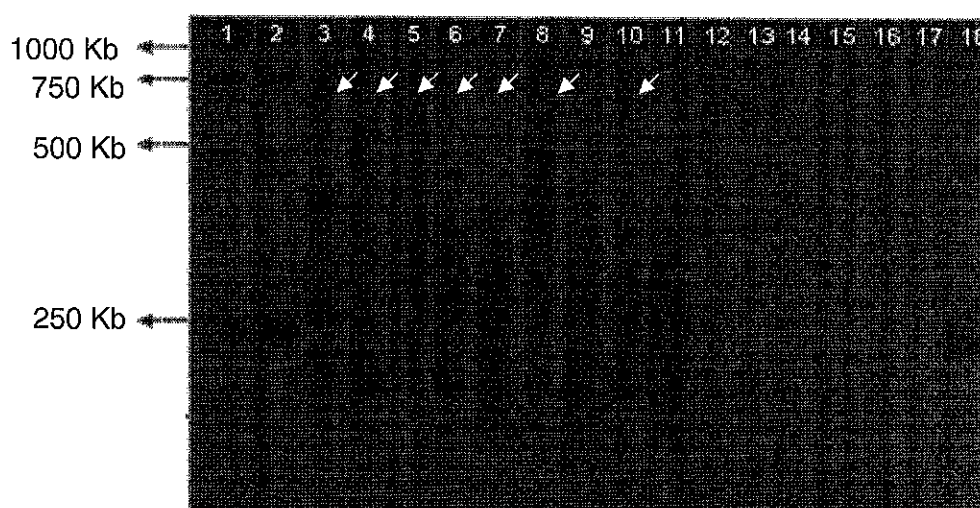


Figura 6A. Productos de PCR para el TSWV

Carriles: 1, 2 y 18= marcador de peso molecular de 1 kb (FERMENTAS); carriles 3 al 11= controles positivos (3= A, 4= B, 5 = C, 6 = D, 7 = E, 8 = F, 9= G, 10= H, 11= I); carriles 12 al 17= muestras de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (12 = 3.10 HIP F3; 13= 3.6 COT; 14 = 3.10 HIP; 15= 4.1 COT F1; 16 = 4.1 COT y 17 = 6.4 MER).

La Figura 6B contiene los resultados para el AMV, donde se observa el fragmento amplificado de 550 pb en los carriles 19, 20, 22, 23, 26 y 27 que corresponden a las plantas (A, B, D, E, H e I) utilizadas como control positivo (Cuadro 7). La muestra del carril 25 (controles positivos) que corresponde a *P.*

vulgaris L., no muestra amplificación; de igual manera que los carriles 28 al 33 que contienen muestras de las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro*.

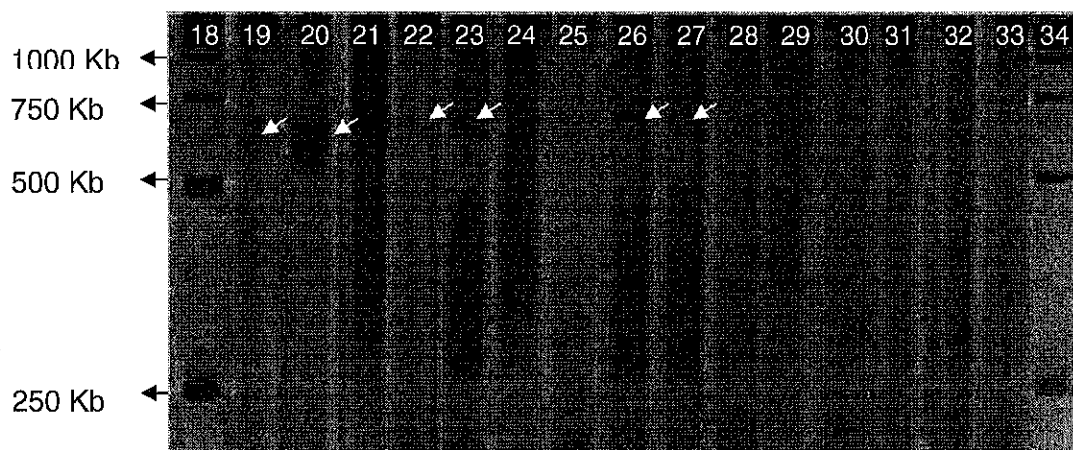


Figura 6B. Productos de PCR para el AMV

Carriles 18 y 34 = marcador de peso molecular de 1 kb (FERMENTAS); carril es 19 al 27= controles positivos (19 = A; 20 = B; 21 = C; 22 = D; 23 = E; 24 = F. 25= G; 26 = H y 27 = I); carriles 28 al 33= muestras de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (28 = 3.10 HIP F3; 29= 3.6 COT; 30 = 3.10 HIP; 31= 4.1 COT F1; 32 = 4.1 COT y 33 = 6.4 MER).

La Figura 6C contiene los resultados para el CMV. Los carriles 35 al 43 corresponden a los controles positivos (Cuadro 7); solamente en la muestra del carril 35 que corresponde a la planta A (*D. stramonium*) presenta un fragmento muy tenue de aproximadamente 400 pb que corresponde al peso molecular del fragmento esperado (407 pb). Las plántulas de cultivo *in vitro* de los carriles 44 al 49 no mostraron esa amplificación; sin embargo, en los carriles 35, 36, 38, 41, 42 y 43 se nota la presencia de otro fragmento de mayor peso molecular ($\approx$ 600 pb) que se consideró como inespecífico; pero que también podría estar representando una variante del virus CMV.

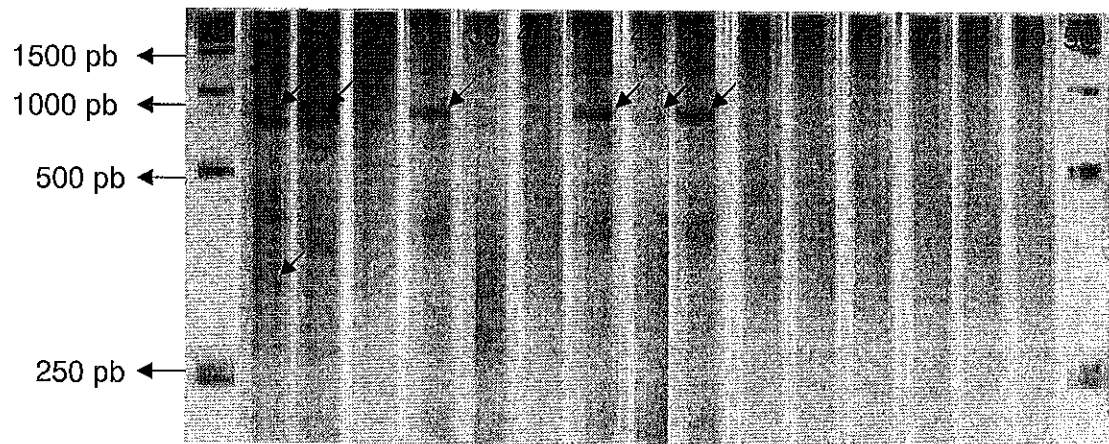


Figura 6C. Productos de PCR para el CMV

Carriles 34 y 50 = marcador de peso molecular de 1 Kb (FERMENTAS); carriles: 35 al 43= controles positivos (35 = A; 36 = B; 37 = C; 38 = D; 39 = E; 40= F; 41 = G; 42 = H y 43 = I); carriles 44 al 49= muestras de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (44 = 3.10 HIP F3; 45 = 3.6 COT; 46 = 3.10 HIP; 47 = 4.1 COT F1; 48 = 4.1 COT y 49 = 6.4 MER).

La Figura 6D que muestra las amplificaciones para el TEV, se aprecia un fragmento de 540 pb, que corresponde al peso molecular del fragmento esperado. Este marcador solo se presentó en los carriles 52 y 53 que corresponden a las plantas utilizadas como control positivo (B: *L. sculentum* L y C: *C. pepo* L.); en las plántulas de cultivo *in vitro* de los carriles 60 al 65 no mostraron amplificación alguna.

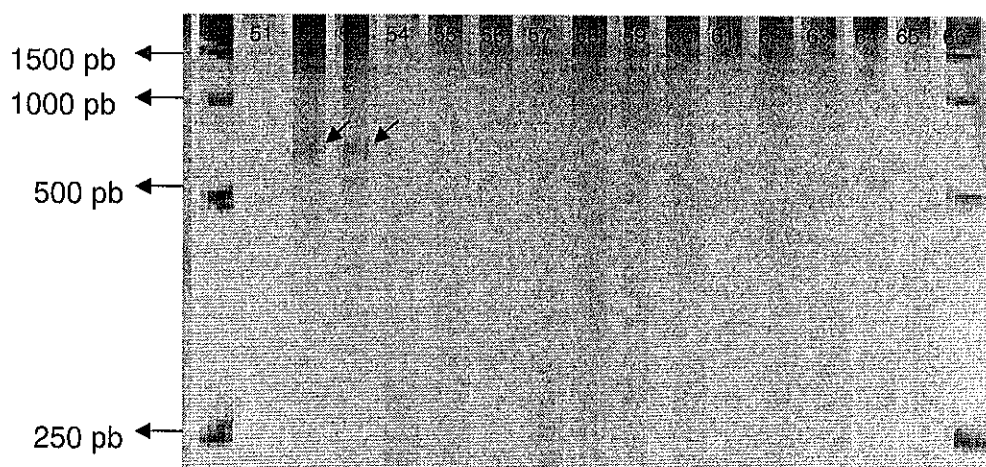


Figura 6D. Productos de PCR para el TEV

Carriles 50 y 66 = marcador de peso molecular de 1 Kb (FERMENTAS); carriles 51 al 66= controles positivos (51= A; 52 = B; 53 = C; 54 = D; 55 = E; 56= F; 57= G; 58 = H y 59 = I); carriles 60 al 65= muestras de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (60= 3.10 HIP F3; 61= 3.6 COT; 62 = 3.10 HIP; 63 = 4.1 COT F1; 64 = 4.1 COT y 65 = 6.4 MER).

En la Figura 6E se presentan las amplificaciones detectadas para el TMV. En la Figura se observa un fragmento muy tenue del tamaño esperado (436 pb) solamente en el carril 67 que contiene la muestra A (*D. straminium*). Pero se pueden apreciar dos fragmentos más en los carriles 68 y 69, uno de 550 pb y otro de 600 pb aproximadamente que presentaron las muestra de las plantas utilizadas como control positivo (B: *L. sculentum* L, y C: *C. pepo* L). Estos dos fragmentos, se consideraron como amplificaciones inespecíficas, aunque cabría la posibilidad de que correspondan a nuevas formas virales del grupo TMV. Al igual que los resultados anteriores en las plántulas de cultivo *in vitro* (carriles 76 al 81) la detección con PCR fue negativa.

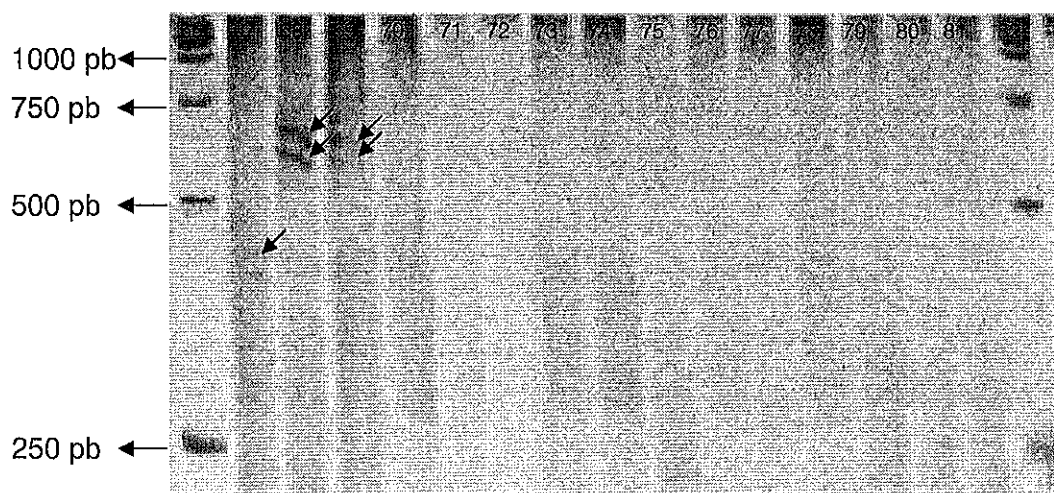


Figura 6E. Productos de PCR para el TMV

Carriles 66 y 82 = marcador de peso molecular de 1 Kb (FERMENTAS); carriles 67 al 75= controles positivos (67 = A; 68 = B; 69 = C; 70 = D; 71= E; 72= F; 73= G; 74 = H y 75= I); carriles 76 al 81= muestras de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* (76 = 3.10 HIP F3; 77= 3.6 COT; 78= 3.10 HIP; 79 = 4.1 COT F1; 80 = 4.1 COT y 81 = 6.4 MER).

De las plantas utilizadas como controles positivos se obtuvieron productos de PCR, las cuales muestra el Cuadro 9, la muestra 5B de *Abelmoschus esculentus* L. resulto positivo con los iniciadores degenerados y a su vez para el iniciador específico del PHV; la muestra A de *Datura stramonium* resulto positiva para los virus de RNA TSWV, AMV, CMV y TMV; la muestra B de *Lycopersicum sculentum* L., resulto positiva para todos los virus de RNA tratados en este trabajo; la muestra C de *Cucurbita pepo* L., presentó amplificaciones para los virus TSWV, TEV y TMV; la muestra D de *Nicotiana tabacum* mostró amplificaciones para los virus TSWV, AMV y CMV; la muestra F de *Nicotiana tabacum* mostró amplificaciones con el par de iniciadores degenerados PALv1978-PARc496 indicando la presencia de un geminivirus, además mostró

tener presencia de partículas virales de los virus TSWV, AMV y CMV; la muestra G de *Phaseolus vulgaris* L., presentó amplificación con el par de iniciadores degenerados PALv1978-PARc496 indicando la presencia de un geminivirus, además mostró tener presencia de partículas virales del virus CMV; la muestra H de *Hordeum vulgare* presentó amplificación con el par de iniciadores degenerados PALv1978-PARc496 indicando la presencia de un geminivirus, además mostró tener presencia de partículas virales de los virus TSWV, AMV y CMV; la muestra I de *Hordeum vulgare* presentó amplificación para los virus AMV y CMV; la muestra 2-C de *P. ixocarpa* Brot., mostró amplificaciones para los dos pares de iniciadores degenerados indicando la presencia de un geminivirus, amplificando también un fragmento para el par de iniciadores específicos para el TPV; la muestra 4-C de *P. ixocarpa* Brot., mostró amplificación para el par de iniciadores degenerados PALv1978-PARc496 indicando la presencia de un geminivirus; la muestra 2-I de *P. ixocarpa* Brot., mostró amplificación para el par de iniciadores degenerados PALv1978-PARc496 indicando la presencia de un geminivirus, al hacer la reacción con el par de iniciadores específicos para el TPV mostró una amplificación positiva para este virus; la muestra 4-I de *P. ixocarpa* Brot., mostró amplificaciones para los dos pares de iniciadores degenerados indicando la presencia de un geminivirus, amplificando también un fragmento para el par de iniciadores específicos para el TPV; la muestra 8-I de *P. ixocarpa* Brot., mostró amplificaciones para los dos pares de iniciadores degenerados indicando la presencia de un geminivirus.

Cuadro 9. Plantas de diferentes especies utilizadas como control positivo que mostraron productos de PCR para los diferentes pares de iniciadores.

Muestra	Planta	AC1048 AV494	PAL1v197 8 PAR1c496	PHV	TPV	TSW V	AMV	CMV	TEV	TMV
5B	<i>A. esculentus</i> L.	X	X	X						
A	<i>Datura stramonium</i>					X	X	X		X
B	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.					X	X	X	X	X
C	<i>Cucurbita pepo</i> L.					X			X	X
D	<i>Nicotiana tabacum</i>					X	X	X		
F	<i>Nicotiana tabacum</i>		X			X	X			
G	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.		X					X		
H	<i>Hordeum vulgare</i>		X			X	X	X		
I	<i>Hordeum vulgare</i>						X	X		
2-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	X	X		X					
4-C	<i>P. ixocarpa</i> Brot.		X							
2-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.		X		X					
4-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	X	X		X					
8-I	<i>P. ixocarpa</i> Brot.	X	X							

X= Presencia fragmento positivo para cada uno de los diferentes virus.

V. CONCLUSIONES

El uso de la información genética reportada en el genBank como producto de las investigaciones enfocadas a la identificación de virus fitopatógenos, fue de gran utilidad en el presente trabajo para el diseño de iniciadores específicos, que se utilizaron para la detección de virus de RNA asociados al cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.)

Los iniciadores diseñados fueron totalmente funcionales en la detección molecular de los virus TSWV, AMV, CMV, TEV y TMV, en plantas de diferentes especies con síntomas de virosis (controles positivos).

Las plantas utilizadas como controles positivos (con síntomas de virosis), se seleccionaron con base a la presencia de mosaicos y moteados amarillos, achaparramiento, intervenado clorótico y enación principalmente.

En las muestras de plantas con síntomas de virosis (controles positivos) se detectó la presencia de geminivirus con iniciadores degenerados para PCR previamente reportados y utilizados por otros autores.

En las muestras de plantas con síntomas de virosis (controles positivos) se detectaron los geminivirus PHV y el TPV, virus detectado en este trabajo en plantas de tomate con síntomas de virosis de campo e invernadero.

Las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* de *Physalis ixocarpa* Brot., y analizadas para la detección de virus de DNA y RNA asociados al cultivo, resultaron negativas para todos los casos; lo que indicó que dichas muestras efectivamente estuvieron “libres de virus”.

VI. LITERATURA CITADA

- Anónimo, 1975. Reaction of *Physalis* species to plant viruses. IV. *Physalis aecuata* Jack *Physalis ixocarpa* Brot. And *Physalis viscosa* L. as less known indicator de plants viruses. Acta Phytopatological Academiae Scientiarum Hungaricae 10: 65-75.
- Anónimo, 1976. INIA, XV años de investigaciones agrícolas. SAG. México. 346 p.
- Aguilar, C. J. 2004. Caracterización de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus mediante polimorfismos conformacionales de cadena sencilla. Tesis de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 28 p.
- Balbás, P. 2002. De la biología molecular a la biotecnología. México. Editorial trillas. pp 13 – 15.
- Bawden, F. C. 1964. Plant viruses and virus disease. The Ronald Press. Co. New York. 361 p.
- Cartujano, E. F., L. Jankiewicz, V. M. Fernández O, and J. Mulato B. 1985. The development of the husk tomato plant (*Physalis ixocarpa* Brot.) II. Reproductive parts. Acta Soc. Bot. Polaniae 54: 339-349.
- Cdelark, M. F. and A.N., Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme – linked inmunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant virus. Journal General Virology. 34: 475 – 483.

- De La Torre-Almaráz, R., Monsalvo-Reyes, A. C., Méndez-Lozano, J., Rivera-Bustamente, R. F. 2004. Caracterización de un nuevo geminivirus asociado con los síntomas de moteado amarillo de la okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. *Agrociencia* 38:227-238.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Díaz-Rivera, J. B., L. X. Zelaya-Molina, H. V. Silva-Rojas, E. Cárdenas, N. Marbán-Mendoza, E. Valadez-Moctezuma. 2006. Okra yellow mottle caused by Chino del Tomate Virus in Iguala, México. Reunión Internacional APS (American Phytopathological Society). 29 de Julio al 2 de Agosto. Québec, Canadá.
- Duffos, J. E. 1970 – 1981. The yellowing virus diseases of beet. *Advances Virus Research*.18:347- 386.
- Freyre, R. and J. Brent. L. 2000. Evaluation and yield trials of tomatillo in New Hampshire. *Hortechonology* 10(2): 374-377.
- Garza, L., J. M. 2002. El tomate verde: factores que determinan los niveles de productividad y rentabilidad en la región centro de México. Reporte de investigación número 61. CIESTAAM. Universidad autónoma Chapingo. Chapingo, México. 54 p.
- Greenleaf, W:H.1953. Effects of tobacco etch virus on peppers (*Capcicum* sp.) *Phytopathology*. 43: 564 – 570.

- Hernández, F. L. M. 2003. Evaluación de resistencia de variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) a *Trochobaris championi* Barber en el altiplano poblano. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 57 p.
- Hernández, J. C. 2001. Técnicas Moleculares en el diagnóstico de virus de importancia cuarentenaria. Memorias: Curso de Técnicas Moleculares como Herramientas para el diagnóstico de fitopatógenos, Teoría – Practica. México, DF.
- Horvath, J. 1970. Reaction of *Physalis* Species to Plant Viruses. I The cape gooberry as a symptomless carrier to potato virus x and y. Acta Phytopatological Academiae Scientiarum Hungaricae. 5: 65 - 75.
- Jiménez, G. R; R. Domínguez R. y A. Peña L. 1992. Plagas susceptibles del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, México. Revista Chapingo 16: 75 – 79.
- Lorente, H. J. 1998. Biblioteca de la agricultura “defensa de las plantas cultivadas técnicas agrícolas en cultivos extensivos. Ed. Idea Book S. A. Barcelona España. pp 284-288.
- Morales, R. J. y R. E. Palacios T. 1998. Tomate de cáscara (*P. ixocarpa* Brot.) variedad CHF1- Chapingo en fertirrigación, bajo acolchado y fertilización foliar. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 84 p.

- Moriconi, D. N., M. C. Rush and H. Flores. 1990. Tomatillo: A potential vegetable crop for Louisiana. *In*: Janick J. and J. E. Simón (eds). Advances in new crops. Timber Press. Portland, E.U.A. pp 407 - 413.
- Mulato, B. J., L. Jankiewicz, V. M. Fernández O, F. Cartujano E., and L.M. Serrano C. 1985. Growth, fructification and plastochron index of different branches in the crown of the husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Acta Soc. Bot. Poloniae* 54:195-206.
- Peña L., A. y F. Márquez S. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo*. Año XV. Núm. 71-72: 84-88.
- Peña, L. A. 1998. Parámetros genéticos, respuesta a la selección y heterosis en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 151 p.
- Pérez, G. M., F. Márquez, S. y A. Peña L. 1997. Mejoramiento genético de hortalizas. Primera edición. Depto. de Fitotecnia. Chapingo, Méx. 380 pp.
- Quiroz, F., C. 1984. Overview of the genetics and breeding of husk tomato. *HortScience*. 19 (6): 872 – 874.
- 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.
- SAGARPA. 2004. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saray, M. C. R. 1977. Tomate de cáscara, algunos aspectos sobre su fisiología e investigación. Folleto de divulgación técnica. INIFAP. Campo Agrícola Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos.
- Saray, M. C. R; A. Palacios A. y E. Villanueva N. 1978. Rendidora: nueva variedad de tomate de cáscara. Folleto de divulgación núm. 73. SARH-INIA-CIAMEC. Campo Agrícola Experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos. 11 p.
- Singh, S.J., K. S. M. Sastry, and K. S. Sastry. 1975. Studies on mosaic diseases of *Solanum torvum*. Indian Journal of Mycology and plant Pathology 5: 86 – 89.
- Soldevilla, C. S., Peña, L. A., Solís, M. F. 2002. Aplicación al suelo de CO₂, uso de acolchados plásticos y sistemas de manejo en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). Revista Chapingo Serie Horticultura 8(1): 25-38.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra-Flora, A., and Rivera-Bustamente, R. F. 1996. Detection and Distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. Phytopathology 86:1186-1192.
- Valadez-Moctezuma, E., y G. Khal. 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ediciones mundi prensa. 147 p.
- Ventura, E. Z., Maldonado, A.U., García, Á., Bazaldúa, C., Salcedo, G.,

Jiménez, A., Trejo, T. G., 2005. Propagación in vitro de plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) con tolerancia a enfermedades de tipo viral. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Zacatepec, Morelos.

Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III Geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 86:1288-1293.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>