

21
2y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

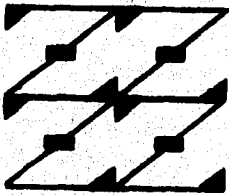
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE HONGOS Y VIRUS
FITOPATOGENOS TRANSMITIDOS EN SEMILLA DE
JITOMATE (*Lycopersicon esculentum* M.) Y CHILE
(*Capsicum annum* L.)

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE: **B I O L O G O**
P R E S E N T A :

SANDRA POPOCA YAÑEZ

DIRECTOR DE TESIS :
DR. MANUEL ROSAS ROMERO
ASESOR INTERNO :
M. EN C. MA. SOCORRO OROZCO ALMANZA



LO HUMANO
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES CON CARINO :

ESPERANZA

Y

ANTONINO

**por su apoyo incondicional, confianza y estímulos que siempre me han
brindado.**

CON AMOR A MI ESPOSO :

SERGIO

Por su cariño, apoyo, confianza y sobretodo paciencia, que me muestra día a día al compartir juntos nuestros momentos.

A TODOS Y CADA UNO DE MIS HERMANOS :

Mary,

Elvia,

Odilón,

Esperanza y

Rigoberto

A MIS CUÑADOS :

Alejandro,

Francisco y

Oscar

A CADA UNO DE MIS SOBRINOS .

Quienes en conjunto me brindaron de alguna forma su apoyo para seguir adelante.

A TODOS MIS COMPAÑEROS Y EN ESPECIAL A

Guadalupe P.

Una gran amiga quién siempre tendrá un lugar en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a las siguientes personas e instituciones por su colaboración en la realización de esta tesis:

Dr. Manuel Rosas Romero y M. en C. Martín Valencia Aceves; por su dirección, asesoramiento y conclusión de esta tesis.

Biól. David Bonilla; por su amistad y apoyo en las técnicas para hongos.

Biól. Bárbara Hernández; por su amistad y asesoría en la técnica ELISA.

A cada uno de los técnicos y trabajadores del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario y, a la misma Dirección General de Sanidad Vegetal que de alguna u otra forma colaboraron.

Los miembros del jurado:

Biól. Ma. de Jesús Sánchez Colín
PRESIDENTE

Dr. Manuel Rosas Romero (director de tesis)
VOCAL

M. en C. Ma. Socorro Orozco Almanza (asesor interno)
SECRETARIO

Biól. Roberto Balderas Ramírez
SUPLENTE

Biól. Carlos Castilejos Cruz
SUPLENTE

Por la revisión y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, y a todos los profesores que de alguna manera contribuyeron en mi formación profesional.

Y por último agradezco a los profesores del **Centro de fitopatología del Colegio de Postgraduados, Chapingo**, por su apoyo en técnicas, material biológico e información bibliográfica.

**TECNICAS DE DIAGNOSTICOS DE HONGOS Y VIRUS
FITOPATOGENOS TRANSMITIDOS EN SEMILLAS DE
JITOMATE (*Lycopersicon esculentum* M.) Y CHILE
(*Capsicum annum* L.)**

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1. CULTIVO DEL JITOMATE EN MEXICO.....	3
2.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL JITOMATE.....	4
2.3. CULTIVO DEL CHILE EN MEXICO.....	4
2.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL CHILE.....	5
2.5. DISPERSION DE PATOGENOS.....	6
2.6. TECNICAS DE DIAGNOSTICO.....	12
I. TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA HONGOS.....	13
II. TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA VIRUS.....	15
3. OBJETIVO GENERAL	17
3.1.OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
4. HIPOTESIS	18
5. MATERIAL Y METODOS	19
5.1. OBTENCION DE SEMILLA ENFERMA	19
5.2. TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA HONGOS Y VIRUS.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSION	33
7. CONCLUSIONES	43
8. LITERATURA CITADA	44
9. APENDICE 1	48
10. APENDICE 2	50

RESUMEN

Dentro de los problemas fitopatológicos con los que se enfrenta la agricultura mexicana sobresalen las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos. Debido al desconocimiento que se tienen sobre las características propias de un patógeno en los diferentes ambientes, se han diseminado algunos de éstos, lo que ha provocado grandes pérdidas en la producción nacional. Por lo anterior, un diagnóstico rápido y seguro es muy importante para obtener productos agrícolas de buena calidad; por ello el objetivo general de este trabajo fue probar cuatro técnicas de diagnósticos para enfermedades causadas por hongos y virus transmitidos en semilla de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y chile (*Capsicum annum*), con el fin de determinar su eficiencia en cuanto a tiempo y precisión; las técnicas evaluadas fueron: cámara húmeda, medios de cultivo artificial (Papa-Dextrosa-Agar, agar-agar y agar-harina de maíz) y plantas diferenciales para hongos; las técnicas serológica ELISA y plantas diferenciales en el caso de virus.

La técnica de cámara húmeda y el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar resultaron ser los más rápidos y precisos en el diagnóstico de hongos, llevándose 2 días para identificar de tres a cuatro diferentes especies de hongos. La técnica ELISA resultó ser la más eficiente (por ser rápida y precisa) para virus, obteniéndose un diagnóstico en dos días. Estas técnicas se pueden implementar fácilmente en los laboratorios de control de sanidad de nuestro País y pueden estar actualizados tecnológicamente.

1. INTRODUCCION

El cultivo de las hortalizas reviste gran importancia para nuestro país, tanto desde el punto de vista económico como social; ya que constituye una fuente de trabajo para muchas personas del sector rural y abastece de esta forma la demanda del consumo nacional. Asimismo, representa una buena fuente de divisas, por las exportaciones que se efectúan (SARH, 1982).

Entre las hortalizas de mayor importancia económica para México, se encuentran: el tomate rojo o jitomate (*Lycopersicon esculentum*), la papa (*Solanum tuberosum*), la calabacita (*Cucurbita species*), el chile (*Capsicum annum*), el pepino (*Cucumis sativus*) y la lechuga (*Lactuca sativa*), entre otras (SARH, 1992a).

De las hortalizas que se producen a nivel Nacional, el jitomate y el chile son las de mayor importancia tanto por la superficie de siembra, como por el valor de la producción. Estos cultivos, pertenecen a la familia de las solanáceas, cuentan con un rango de adaptación ecológica muy amplio, por lo que se cultivan en climas templados y tropicales de casi toda la República Mexicana (SARH, 1992b).

El rendimiento de ambos cultivos puede ser afectado por diversos factores bióticos y abióticos que causan mermas en la producción; entre estos factores, los bióticos se consideran como los de mayor importancia. Sobresalen los de tipo fitopatólogicos que representan

el principal problema. Dentro de estos, se pueden citar a los hongos, virus y bacterias principalmente, que afectan gravemente la producción de estas hortalizas. Algunos géneros de estos patógenos que atacan a ambos cultivos son los hongos: *Phytophthora*, *Fusarium*, *Pythium*, *Alternaria*; las bacterias: *Xanthomonas* y *Pseudomonas*; y los Virus Mosaico del tabaco (VMT), Virus Mosaico del Pepino (VMP) y Virus Mosaico de la Alfalfa (VMA), entre otros. Estos microorganismos pueden ser dispersados por insectos, mamíferos, aves, agua, aire, polen y semilla, entre éstos; la dispersión por semilla es de gran importancia debido a que el hombre la puede mover a través de distancias largas (Agrios, 1991).

Por tal razón, en los últimos años la sanidad de las semillas se ha vuelto muy importante así como realizar un diagnóstico rápido y preciso, pues de esta manera se puede tener un mejor control sobre las enfermedades de los cultivos y asegurar así una buena implantación en el campo, a la vez se evita la introducción de patógenos a nuevas áreas. Esto último puede provocar grandes pérdidas económicas, escases de productos y consecuentemente el aumento en el precio de los mismos.

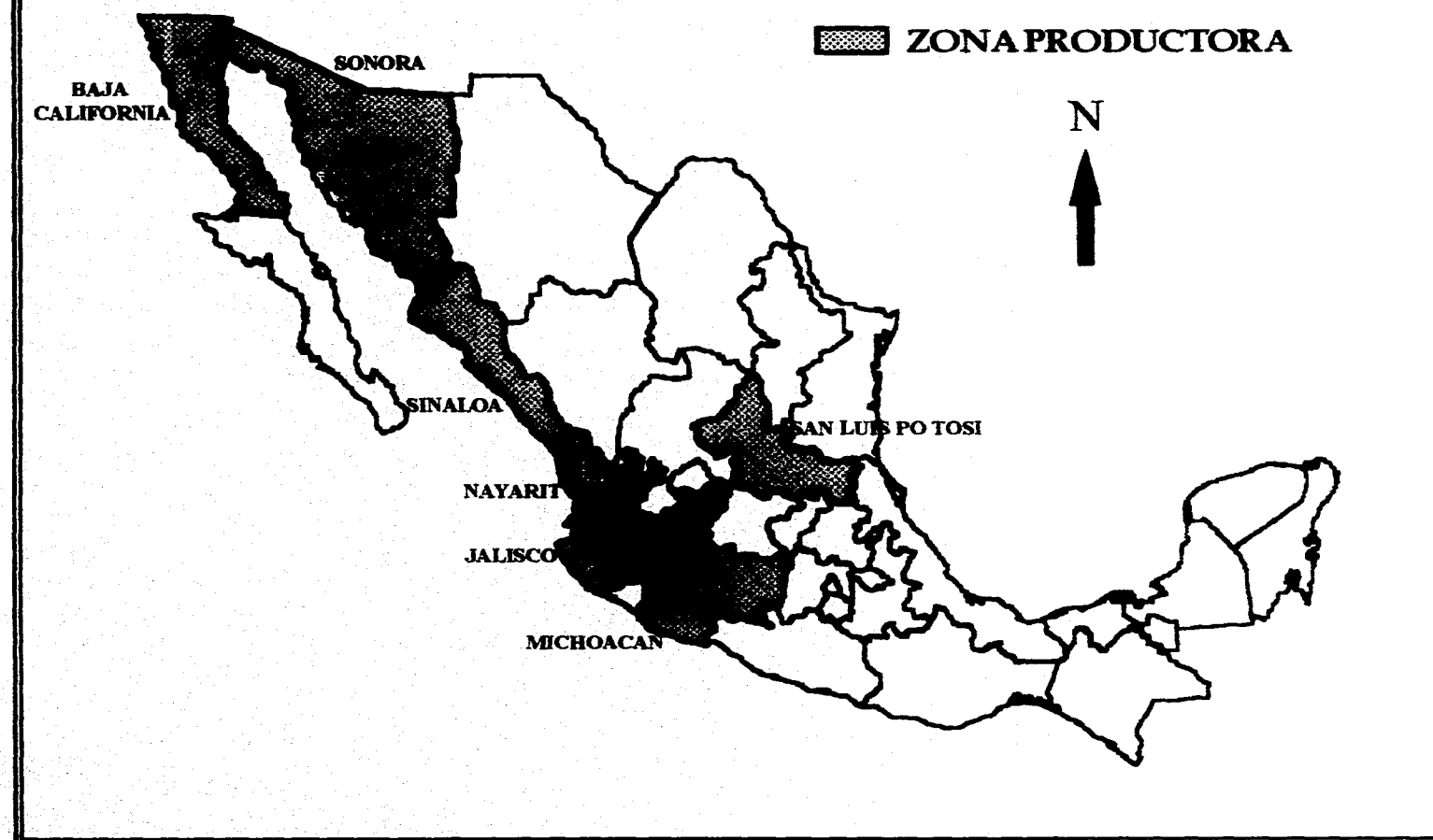
2. MARCO TEORICO

2.1. Cultivo del jitomate en México

El jitomate es una hortaliza muy apreciada en la cocina mexicana debido a su sabor y vitamina C, pertenece a la familia Solanaceae, género *Lycopersicon*, de ella existen diversas variedades, mejorando el sabor, tamaño y resistencia a las enfermedades. El cultivo del jitomate, se considera importante en la economía del país, tanto por la superficie sembrada, que para 1993 se estimó en un total de 80,570 hectáreas con un valor de producción mayor a 2,542,746,863 nuevos pesos al año, como por ser un producto de primera necesidad dentro de la dieta del pueblo Mexicano (INIA, 1979; SARH, 1992a).

Para 1993, según cifras preliminares en el sexto informe de gobierno de 1994, hubo una producción anual de jitomate por 1,680,000 toneladas, de las cuales se exportaron 395,000; en este mismo año, se alcanzó una producción anual real de 1,692,000 toneladas, de las cuales se exportaron 322,000 por lo que este producto obtuvo el quinto lugar en producción nacional. Entre los principales estados productores de jitomate están: Sinaloa (739,903 toneladas), Nayarit (62,558 toneladas), Baja California (35,050 toneladas), Michoacán (32,108 toneladas), Sonora (26,529 toneladas), San Luis Potosí (23,347 toneladas) y Jalisco (20,958 toneladas) (Figura 1); de ellos, Sinaloa es el primer productor con más del 50% del total de la producción anual en esta hortaliza (SARH, 1993).

FIGURA 1. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE JITOMATE EN LA REPUBLICA MEXICANA (SARH, 1992a).



2.2. Principales enfermedades del jitomate

Las principales enfermedades fúngicas que sufre el jitomate son ahogamiento de plántulas, causado por los hongos *Pythium aphanidermatum*, marchitez por *Fusarium oxysporum* (figura 2), y *F. Lycopersici-raldoki*; moho de la hoja por *Cladosporium fulvum* (figura 3), tizón tardío por *Phytophthora infestans*, tizón temprano por *Alternaria solani* y mancha gris causado por *Stemphylium solani*; las de origen viral como el Virus Mosaico del Tabaco (VMT) (figura 4), Virus Mosaico del Pepino (VMP) y Virus Mancha Anular del Tomate (VMAT) y finalmente el cáncer bacteriano producido por *Corinebacterium michiganense* (Sánchez, 1979).

2.3. Cultivo de chile en México

El cultivo del chile tiene una amplia distribución, uso y gran demanda en todo el país. Pertenece al género *Capsicum* de la familia Solanaceae, tiene 13 especies y 9 variedades (Vega, 1989), todas ellas de uso alimenticio nacional e internacional. Su cultivo representa buenas perspectivas por su calidad para exportación, principalmente a Estados Unidos y Canadá (Pozo, 1981); que de acuerdo al Sexto Informe de Gobierno de 1994 asciende a 1019 toneladas anuales.

Durante el año agrícola 1993, a nivel Nacional se cosecharon 109,854 Hectáreas, con una producción de 873,923 ton con un valor de 1,773,379,102 pesos (SARH, 1993). Los principales estados productores de esta hortaliza son: Sinaloa (con el 28% de la



Figura 2. Marchitamiento del tomate causado por *Fusarium oxysporum*. Hay aclaramiento de las nervaduras, algunas ramas muestran caída de sus hojas (marchitez) y los frutos que ocasionalmente son infectados se pudren.



Figura 3. Moho de la hoja causado por *Cladosporium fulvum*. Tanto las hojas como los frutos presentan manchas mohosas y pardas.



Figura 4. Virosis causado por el Virus Mosaico del Tabaco (VMT). Presenta manchas cloróticas (moteado) y arrugamiento de las hojas.

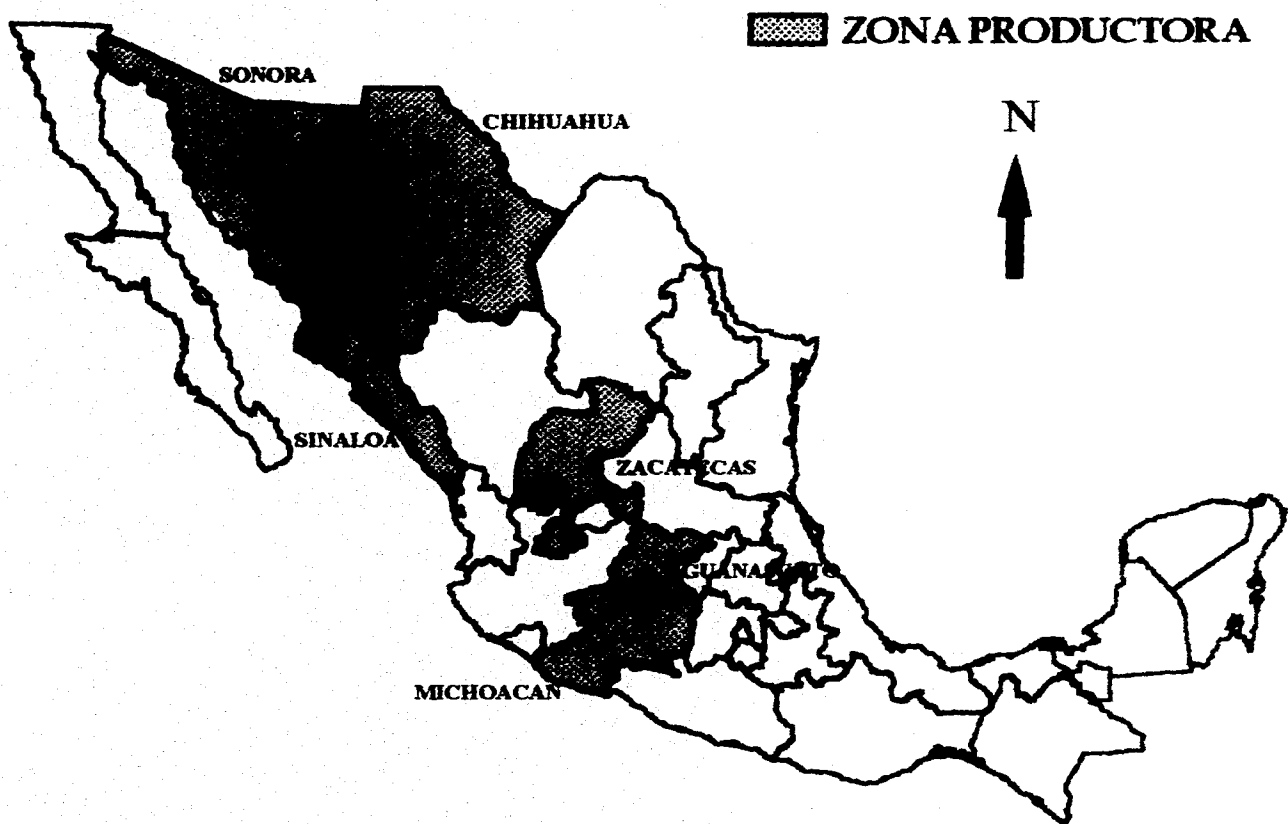
producción Nacional), le sigue Chihuahua, Guanajuato, Zacatecas, Sonora y Michoacán entre otros (figura 5).

2.4. Principales enfermedades del chile

El cultivo del chile es afectado por enfermedades de tipo viral, bacteriano y fúngicas. De éstas, la principal es la marchitez del chile causado por el hongo *Phytophthora capsici* el cual disminuye los rendimientos hasta en un 100% en las regiones productoras del Bajío, la Mesa Central y Aguascalientes; así como en nuevas áreas productoras, por lo que se le considera un problema latente para la producción (Pozo, *op.cit.*). Otras enfermedades importantes que dañan a esta hortaliza son la bacteriosis del follaje causado por *Xanthomona vesicatoria* y el mosaico común causado por el Virus mosaico del Tabaco (VMT) (SARH, 1982).

En el Valle de Autlán Jalisco, se encontró una incidencia del 90% de virosis en plantaciones de chile jalapeño. En este mismo estado, en 1989 se encontró un 8% de virosis en plántulas de chile en siembras comerciales, detectándose al Virus Jaspeado del Tomate (VJT), Virus Mancha Anular del Tomate (VMAT) y Virus Mosaico del Pepino (VMP), por medio de la técnica Serológica de Inmunosorbencia con Enzimas Conjugadas (ELISA), lo que indicó que estos virus pudieron ser transmitidos por semilla. En Celaya, Gto. y Culiacán, Sin., se registró una incidencia hasta del 100% del VMP; en el norte de Veracruz, la incidencia fue del 60%, en el centro de este mismo estado fue del 80% y en la parte sur

**FIGURA 5. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE CHILE
EN LA REPUBLICA MEXICANA (SARH, 1992a).**



llegó hasta un 65%. Estas continuas pérdidas han ocasionado la desaparición del cultivo en algunas regiones chileras de Veracruz, Jalisco y Sinaloa (Vega, 1989).

Se considera que del total de la producción Nacional se pierde un 35% y de este porcentaje el 25% se debe a plagas, malezas y otros factores; el 10% restante lo ocasionan las enfermedades causadas por microorganismos patógenos; del 100% de los daños ocasionados por éstos últimos el 65% se le atribuyen a los hongos, el 10% a las bacterias, otro 10% a nemátodos y el 15% restante a virus, micoplasmas y viroides (Mendoza y Pinto, 1985).

2.5. DISPERSION DE PATOGENOS

Los propágulos de los patógenos pueden dispersarse por diversos medios: abióticos y bióticos. Dentro de los abióticos están el aire, el agua y equipo de trabajo; entre los bióticos: los insectos, animales, frutos, desechos de cultivos, esquejes y semillas, transmitiendo la enfermedad de una planta a otra (Agrios, *op.cit.*, Castaño, 1989).

Aire

El movimiento del aire puede transportar el inóculo de muchos microorganismos desde unos cuantos centímetros hasta cientos o miles de kilómetros. El viento puede diseminar virus llevados en semillas y polen. El polen contaminado transmite a los virus a través del

estigma, tanto a la planta como a la semilla (Dickinson y Lucas, 1987). Las bacterias son raramente diseminadas por el viento, a no ser que éste las lleve consigo en partículas de agua o exudados. Los hongos, son el principal grupo de microorganismos diseminados por este medio; arrastra a la mayoría de las esporas y semillas a grandes distancias, colonizando así nuevas áreas (Agrios, *op.cit.*).

Agua

Al igual que el aire, el agua es un buen agente dispersante de fitopatógenos, especialmente en casos de diseminación local como ocurre en la mayoría de los tizones bacterianos como *Erwinia amylovora* y hongos que se encuentran en el suelo como *Phytophthora cinnamomi* y *Plasmodiophora brassicae*. Las lluvias al salpicar durante aguaceros fuertes, puede dispersar el inóculo a las partes de la planta cercana al suelo, o bien pueden distribuir las bacterias o esporas a diferentes partes de la misma planta o a plantas vecinas (Agrios, *op.cit.*; Castaño, *op.cit.*).

Insectos

Un gran número de virus fitopatógenos de importancia económica, son diseminados por diversos tipos de insectos entre los que sobresalen; los áfidos, mosquita blanca y chicharrita. Entre los áfidos, más de 50 especies han sido reconocidas como vectores de virus. Varias bacterias fitopatógenas son también diseminadas por insectos, y de ello depende también su sobrevivencia como en el caso de *Erwinia caratovora*, responsable de la pierna negra de la papa y

Erwinia stewartii en maíz. Otro tipo de vector son los nematodos, los cuales transportan virus y bacterias. Los pájaros, otros animales y el mismo hombre, son diseminadores de fitopatógenos (Castaño, *op.cit.*).

Hombre

El hombre disemina todo tipo de patógenos a distancias variables, principalmente por el movimiento de materiales tales como esquejes, plántulas, flores, semillas y suelo; de éstos, la dispersión por semillas ocupa un papel relevante (Agrios, *op. cit.*).

En las semillas, los patógenos ya sean hongos, bacterias y sobre todo virus no son visibles; por lo que en su mayoría, no muestran síntomas de infección y de esta manera pasan inadvertidos. Sin embargo, al sembrar y emerger las plántulas en el campo, estos patógenos se multiplican y se manifiesta la enfermedad en todo el cultivo, lo cual provoca graves daños a éste y causa con ello grandes pérdidas económicas (Kreitlow, et al 1979; Thomsom, 1979).

Los organismos causantes de enfermedades pueden pasar la estación desfavorable e incluso años, alojados dentro y/o sobre las semillas, en pedacitos de tallos, hojas o utilizando algún otro hospedero o en sus formas de resistencia (Kreitlow, et al, *op. cit.*). En algunos casos como lo muestra el Cuadro 1, los patógenos se han diseminado de un país a otro utilizando a la semilla como transporte (Neergaard, 1979).

CUADRO 1. PATOGENOS DISEMINADOS POR SEMILLA A NIVEL MUNDIAL
(Neergaard, 1979)

AÑO	PATÓGENO	NATURALEZA DEL PATOGENO	PAIS DE ORIGEN	PAÍS AFECTADO
1841	<i>Tilletia caries</i>	hongo	Australia	E.U.A.
1881	<i>Peronospora viciae</i>	hongo	Holanda	---
1885	<i>Puccinia malvacearum</i>	hongo	Europa	E.U.A.
---	<i>Urocystis agropyri</i>	hongo	Australia	México
1919	<i>U. agropyri</i>	hongo	---	E.U.A.
1924	<i>U. cepulae</i>	hongo	Francia	Suiza
1935	<i>Peronospora farinosa</i>	hongo	---	Australia
---	<i>P. viciae</i>	hongo	Argentina	Italia
1940	<i>Gleotinia temulenta</i>	hongo	Nva. Zelanda	E.U.A.
	<i>Pseudomonas glycinea</i>	bacteria	Suecia	Inglaterra
1942	<i>Corynebacterium michiganense</i>	bacteria	U.S.A.	Reino Unido
1945	<i>Corynebacterium rathayi</i>	bacteria	Dinamarca	Alemania
1947	<i>Corynebacterium michiganense</i>	bacteria	---	Irlanda
1949	<i>Gloeocercospora sorghi</i>	hongo	E.U.A.	Venezuela
1952	<i>Puccinia antirrhini</i>	hongo	Norteamérica	Australia
1961	<i>Xanthomonas campestris</i>	bacteria	Europa	U.S.A.
1968	<i>Corynebacterium rathayi</i>	bacteria	Francia	Portugal
1970	<i>Xanthomonas phaseoli</i>	bacteria	Países bajos	Nva. Zeland
	<i>Ustilago tritici</i>	hongo	Israel	Laos
1973	<i>Ascochyta rabiei</i>	hongo	---	Canadá

De la misma forma, la semilla de jitomate (cuadro 2) y Chile (cuadro 3) puede llevar patógenos que se diseminan a través de ella (Richardson, 1979; Raymond, 1989).

CUADRO 2. PATOGENOS TRANSMITIDOS POR SEMILLA DE JITOMATE

HONGOS	BACTERIAS	VIRUS*
<i>Alternaria solani</i>	<i>Corynebacterium michiganense</i>	VMT
<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Pseudomonas tomato</i>	VMAT
<i>Colletotrichum lycopersici</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	VMA
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Glomerella cingulata</i>		
<i>Phoma destructiva</i>		
<i>Phytophthora infestans</i>		
<i>P. nicotianae</i>		
<i>Rhizoctonia solani</i>		
<i>Verticillium dahliae</i>		

* VMT (Virus Mosaico del Tabaco)
 VMAT (Virus Mancha Anular del Tomate)
 VMA (Virus Mosaico de la Alfalfa, con el 2% de transmisión)

CUADRO 3. PATOGENOS QUE SE TRANSMITEN POR SEMILLA DE CHILE

HONGOS	BACTERIAS	VIRUS *
<i>Alternaria solani</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	VMA
<i>Cercospora capsici</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	VMT
<i>Colletotrichum acutatum</i>		VMP
<i>C. piperatum</i>		
<i>Diaporthe phaseolorum</i>		
<i>Fusarium moniliforme</i>		
<i>F. solani</i>		
<i>Gibberella fujikuroi</i>		
<i>Phaeoramularia capsicicola</i>		
<i>Phytophthora capsici</i>		
<i>Rhizoctonia solani</i>		
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		

* VMT (Virus Mosaico del Tabaco)
 VMA (Virus Mosaico de la Alfalfa)
 VMP (Virus Mosaico del Pepino)

Al ser la semilla una forma eficiente de diseminación de plagas, y al considerar que el desarrollo de nuevas políticas de comercio a nivel internacional, implican la instrumentación de medidas que eliminan las barreras arancelarias a la importación y exportación de productos agrícolas. México inició un proceso de apoyo integral al intercambio comercial, al simplificar procedimientos administrativos y fortalecer los requisitos y procedimientos fitosanitarios, con el fin de preservar la competitividad de los productores nacionales,

la ecología de nuestros sistemas naturales y la sanidad de nuestra agricultura, por lo cual se requiere urgentemente la homogenización de las técnicas de diagnóstico de fitopatógenos, con los países que se tienen convenio de intercambio comercial como son: Estados Unidos de América, Canadá, Chile, Cuba, Argentina, Brasil, Holanda, España, Costa Rica, República Checa, Francia, Guatemala y Japón, entre otros (SAGAR, 1995).

La mayoría de estos estudios se han realizado en Estados Unidos Americanos; Mathur, et al (1975), Baker (1980), Hampton y Matthews (1980), Matthews (1980), Mangan (1983), Kulik (1984), Hewett (1987) e Irwin (1987), entre otros, han buscado nuevos métodos de detección de hongos en semillas, logrando mejorar las técnicas ya existentes; por lo que resulta necesario determinar las técnicas para hongos y virus, más recomendables en nuestro país en cuanto a tiempo y confiabilidad basándose en sus posibilidades tecnológicas. Es decir, se requiere implementar técnicas rápidas y precisas que permitan tener la certeza de que la semilla se encuentre libre de patógenos, ya que las técnicas más usuales se llevan hasta más de 15 días en diagnosticar, lo cual implica que mientras se analizan las muestras tomadas la enfermedad avanza o es retenida en las aduanas.

2.6. TECNICAS DE DIAGNOSTICO

Para la detección de organismos patógenos, se requieren de diferentes métodos de laboratorio, no es posible identificar con un ensayo todos los patógenos que pueden estar presentes. Para el

diagnóstico, las herramientas modernas reducen la dependencia de la intuición . Algunas enfermedades causadas por hongos se pueden detectar examinando las semillas secas con la lupa, para buscar estructuras vegetativas (hifas), estructuras reproductoras (esporas), color y forma o bien; Realizar cortes de tejido enfermo para observarlas al microscopio óptico, buscar estructuras o inducir las a la esporulación en cámara húmeda. Los parásitos obligados pueden ser inoculados a plantas hospederas con trozos de tejido enfermo (Thomson, op. cit.). Los métodos para diagnosticar una enfermedad viral son: sintomatología, inoculación por maceración de tejido enfermo, microscopía electrónica y serología por Inmunosorbencia con Enzimas conjugadas (ELISA) entre otros (CEICADES, 1987).

I. Técnicas de diagnóstico para hongos

a) El uso de papel secante se usa para obtener una rápida esporulación en comparación con los medios de cultivo artificial e invernadero; es recomendable cuando el método de agar es impracticable, como por ejemplo cuando se trabaja fuera del laboratorio. Puede aplicarse a todas las especies de semillas proporcionando excelentes condiciones para el desarrollo del micelio y esporulación de conidios de una gran cantidad de hongos imperfectos. También se puede observar el desarrollo de signos de infección que se producen por formas patógenas de estos hongos en el brote de plántulas durante la incubación, pero favorece también el desarrollo de otros hongos saprófitos que frecuentemente recubren

por su rápido crecimiento a los patógenos, lo cual hace difícil su identificación.

b) Otro método que se usa ampliamente es el medio de agar, el cual emplea una gran variedad; la base es agar y solamente cambia el medio nutritivo. Este método comunmente llamado "medio de cultivo artificial", se aplica a todas las especies de semillas en las cuales los hongos saprófitos se desarrollan lentamente, en ocasiones el medio de cultivo es selectivo para un grupo de hongos en especial, lo cual facilita la identificación de los patógenos; por otra parte, el tratamiento es aplicable cuando se dificulta el crecimiento del micelio y la esporulación o los síntomas de las plantas y semillas. La identificación es más rápida que el método del papel secante; sin embargo, es necesario tener experiencia y conocimiento para su manejo (Neergaard, *op. cit.*).

c) La presencia de síntomas en plántulas es otra forma de diagnóstico de organismos patógenos en semillas; pues al germinar aquéllas que están infectadas pueden desarrollar síntomas semejantes a las que se presentan bajo condiciones de campo. Su desventaja consiste en que es a largo plazo, pues sólo de esta forma es posible observar el desarrollo de la enfermedad en la planta. Esta técnica llamada de invernadero, tiene variedad en cuanto al sustrato el cual puede ser: arena, grava, suelo, perlita u otro material semejante (Mendoza y pinto, 1985; Neergaard, *op. cit.*). Se Esta técnica es aplicable tanto para hongos, bacterias y virus. Existe

otro camino para observar el desarrollo de los síntomas de los patógenos y es por inoculación mecánica de plantas diferenciales (Castaño, op. cit.; Hill, 1984).

II. Técnicas de diagnóstico para virus

a) La técnica de ELISA se ha utilizado para el diagnóstico de virus, existiendo variaciones en ella; sin embargo, el fundamento es el mismo y se aplica en todos los ensayos inmunosorbentes.

Principio. El antígeno es selectivamente atrapado e inmovilizado por un anticuerpo específico que se absorbe a una fase sólida (poliestireno); después una enzima específica unida al anticuerpo reacciona con el antígeno, se adiciona a un sustrato que da un color, permitiendo visualizar cualitativamente la presencia o ausencia de antígenos en la muestra o los específicos para el antisuero utilizado (Clark y Adams, 1979).

b) La microscopía electrónica, es una buena técnica para detectar la presencia de partículas virales. Funciona a base de una fuente de electrones que pueden considerarse como una radiación de pequeña longitud de onda. En la práctica permite la observación de estructuras hasta de 12 nm ; esto es 1000 veces mejor que el microscopio óptico. Los electrones no pueden moverse a gran distancia en el aire. La columna del microscopio electrónico donde se encuentran las lentes, el compartimento donde se introduce la muestra a observar y la pantalla, deben estar al alto vacío, lo cual

se logra mediante bombas que extraen el aire y el vapor de agua u otros gases que pueden evaporarse de la muestra. Esto limita los tipos de muestra que pueden examinarse (CNRDF, 1993). A pesar de no probar esta técnica, es importante conocerla.

3. OBJETIVO GENERAL

Probar cuatro técnicas de diagnóstico de enfermedades causadas por hongos y virus transmitidos en semilla de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile (*Capsicum annuum* L.), con el fin de determinar cuál o cuales son las mejores en cuanto a tiempo y precisión.

3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar las técnicas de cámara húmeda, medios de cultivo artificial y plantas diferenciales, en relación al tiempo y precisión para el diagnóstico de hongos fitopatógenos transmitidos por semilla de jitomate y chile.
- Comparar la técnica serológica ELISA con la de plantas diferenciales para el diagnóstico de virus transmitidos en semilla de jitomate y chile.

4. HIPOTESIS

- El uso de medios de cultivo artificial en el diagnóstico de hongos fitopatógenos transmitidos en semilla de jitomate y chile, puede ser la mejor técnica por el ambiente óptimo que rodea a las semillas, el cual proporciona un buen crecimiento y una esporulación de los hongos llevados en éstas.

- La técnica serológica ELISA es la más apta para el diagnóstico de virus fitopatógenos en comparación de las plantas diferenciales, ya que proporciona certeza y rapidez por su alta sensibilidad y desarrollo científico.

5. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo dentro de las instalaciones del laboratorio e invernaderos del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario, dependiente de la Dirección General de Sanidad Vegetal, S.A.R.H. (Ahora Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR)). Esta investigación se realizó en dos etapas:

- Obtención de semilla enferma
- Pruebas de las técnicas de diagnosis para hongos y virus.

5.1 OBTENCION DE SEMILLA ENFERMA

Los dos cultivos en los que se realizó el trabajo fueron jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y chile (*Capsicum annuum* L.); de las variedades Florida MH-1 y Serrano, respectivamente. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero a 25°C. Las cepas de hongos fueron proporcionadas por el Departamento de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Chapingo las cuales se conservaron en medios de cultivo (PDA), y las cepas de virus, por la Universidad Autónoma de Chapingo.

Se trabajó con semilla certificada, además se le realizó pruebas fitopatológicas para garantizar el obtener plantas totalmente sanas. Para obtener la semilla contaminada con hongos y virus, se inoculó

el patógeno en fruto (para el caso de hongos) y en flor (para virus); con el objeto de trabajar con seguridad semilla enferma y de esta forma comprobar la precisión del diagnóstico. La inoculación (marcada con una X) se realizó de acuerdo al cuadro 4:

CUADRO 4. INOCULACIONES

PATOGENO	JITOMATE	CHILE	NATURALEZA
<i>Cladosporium fulvum</i>	X	X	Hongo
<i>Phytophthora capsici</i>		X	Hongo
<i>Phytophthora infestans</i>	X		Hongo
<i>Fusarium oxysporum</i>	X	X	Hongo
Virus Mosaico del Tabaco	X	X	Virus
Virus Mosaico del pepino		X	Virus

X = INOCULACION REALIZADA

a) Inoculación de hongos

Se seleccionaron 20 plantas sanas de chile y 20 de jitomate con frutos a punto de madurar, se inocularon los frutos de cada planta en ambos cultivos de la siguiente forma:

Se realizó una pequeña incisión de aproximadamente medio centímetro en la parte del casquete del fruto, en la cuál se colocó una pequeña porción del cultivo del hongo con unas pinzas finas y estériles. Posteriormente, se asperjó toda la planta con agua estéril, se cubrió totalmente con bolsas de plástico transparente para mantener

un ambiente húmedo y de esta forma lograr el crecimiento y penetración del hongo en el fruto. Al tercer día se fue descubriendo poco a poco para evitarles un cambio brusco de temperatura. Cuando los frutos ya estaban maduros se recolectaron y se extrajeron las semillas.

b) Inoculación de virus

La inoculación de los virus se realizó antes de la fecundación de la flor, con la finalidad de evitar que se presentara una resistencia hacia ellos en el momento de ésta.

En un mortero estéril se maceró un gramo de tejido enfermo (follaje) contenido en 4 ml de buffer de fosfatos a pH de 7, para estabilizar a los virus. Se tomaron 20 plantas sanas de jitomate y 20 de chile antes de florecer, con una jeringa hipodérmica estéril se tomó solución del macerado y se inoculó en el ovario de la flor. Al madurar los frutos se separó la semilla (Garret, 1987; Hill, 1984).

5.2.. TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA HONGOS Y VIRUS

Las técnicas probadas para ambos cultivos se muestran en el cuadro 5, en el que se marca con una X la técnica usada para cada patógeno.

CUADRO 5. TECNICAS DE DIAGNOSTICO PROBADAS

	Cámara húmeda	Medios de cultivo	ELISA	Plantas diferenciales
Hongos	X	X		X
Virus			X	X

1. **Cámara Húmeda** (Richardson, 1979; Garreth, *op.cit.*)

Se trabajó en una campana de flujo laminar, la cual se esterilizó con alcohol etílico al 96%. El material de cristalería, el agua y las cámaras húmedas se esterilizaron en autoclave. Las cámaras se elaboraron con cajas Petri estándar de cristal, dentro de las cuáles se colocaron dos discos de papel filtro; uno en la tapa y otro en la base, todos ellos estériles. A la hora de usar cada cámara se asperjó con agua estéril.

Se tomaron 100 semillas de jitomate y 100 de chile, que estaban infectadas con hongos, para desinfestarlas con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y eliminar los hongos saprófitos que pudieran contener estas semillas en la superficie. Se lavaron tres veces con agua estéril, se escurrieron y finalmente se colocaron en las cámaras húmedas. Se dejaron incubar a temperatura ambiente (25°C) durante dos días. Se tuvieron tres repeticiones en cada prueba, por cada patógeno y cultivo.

Las cámaras húmedas se rotularon con el nombre del cultivo, fecha y

número de repetición. Pasadas las 48 horas se revisaron al microscopio estereoscópico; si se encontraba micelio, se procedía a tomar una muestra la cual se preparó con ayuda de cinta adhesiva transparente, ésta se colocó sobre un portaobjeto que contenía una gota de lactofenol azul de algodón (ver apéndice 1) y se observó en el microscopio óptico para su identificación con ayuda de bibliografía (Romero, 1988) y especialistas. Cuando no se encontraba esporulando el hongo, se dejaba incubar más tiempo para revisarse posteriormente.

2. Medios de Cultivo Artificial (Neergaard, 1979; Garreth, *op. cit.*)

Los medios de cultivo artificial que se manejaron fueron: Papa-Dextrosa-Agar (PDA), agar harina de maíz (AHM); y agar-agar (AA), (ver apéndice 1). Estos medios se seleccionaron por ser de crecimiento general, sencillos de preparar y accesibles en el país.

Se procedió a la desinfestación de la semillas como se indicó en la técnica anterior y enseguida se agitó la cámara durante 2 o 3 minutos para quitar el exceso de agua y obtener la semilla lo más seca posible. Se pasaron 10 semillas de éstas a los medios de cultivo ya preparados con ayuda de unas pinzas, se incubaron a 27°C durante 48 horas. Se hicieron tres repeticiones para cada cepa de hongo y para cada medio artificial. Las cajas petri se revisaron a las 24, 48 y 72 horas después de su siembra. Finalmente se identificaron los hongos encontrados en cada uno de los medios que

se trabajó con ayuda del microscopio óptico, bibliografía y especialistas tomándose notas de tiempo y patógeno encontrado.

3. Plantas Diferenciales (Neergaard, 1979; Hill, op. cit.)

PARA HONGOS

En esta prueba se utilizaron dos invernaderos, en uno de ellos se colocaron las plantas en estado sano y los almácigos, en el otro se colocaron las plantas inoculadas. El suelo que se utilizó fue del usado en jardinería, se esterilizó con bromuro de metilo; desinfectante eficaz que destruye microfauna y microflora del suelo (Juscafresa, 1973).

Las especies adecuadas para esta técnica son: *Lycopersicon sculentum* (jitomate), *Capsicum annum* (chile), *Cucurbita melo* (melón), *Cucumis sativum* (pepino), *Nicotiana xanthi* (tabaco), *Datura stramonium* (toloache) y *Chenopodium amaranticolor* (quelite) para ambos cultivos. Estas especies desarrollan síntomas semejantes a los que presentan el jitomate y chile.

Se formaron 3 lotes con cada patógeno (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium fulvum*), cada lote contuvo 2 ejemplares de cada planta diferencial incluyendo los testigos, esto es; por cada planta diferencial hubo un testigo blanco. Todas estas plantas tenían un mes de edad, esto es; cuando apenas tuvieron 3 hojas desarrolladas. La inoculación se realizó a nivel raíz, que es donde más rápidamente penetran estos hongos (Agrios, op. cit.).

Posterior a la inoculación del patógeno se observó el desarrollo o ausencia de síntomas (Cuadro 6), se revisó a la vez si estos síntomas correspondían a la enfermedad correspondiente. El desarrollo de todas las plantas se compararon con los testigos de cada lote. Todas las plantas diferenciales usadas fueron sanas y entre ellas las más vigorosas.

CUADRO 6. SINTOMAS DE LOS PATOGENOS INOCULADOS (Agrios, 1991)

GENERO	ENFERMEDAD	SINTOMAS
<i>Phytophthora capsici</i>	Pudrición del fruto en chile	manchas necróticas en hojas, marchitamiento y pudrición del fruto.
<i>P. infestans</i>	Tizón tardío en jitomate	Manchas oscuras en los bordes inferiores de las hojas, pudrición del fruto.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez en chile y jitomate	Amarillamiento de los bordes de las hojas inferiores de la planta, extendiéndose hacia la nervadura central por lo que toda la planta, se marchita y empardece hasta que muere.
<i>Cladosporium fulvum</i>	Moho de las hojas en chile y jitomate	Manchas mohosas y pardas en las hojas y frutos, decaimiento de la planta

Los síntomas de enfermedad en las plantas se diagnosticaron por medio de observación directa y con ayuda del microscopio

estereoscópico y del de contraste de fases, así como cultivo de tejidos para corroborar el ataque del hongo. Esto es, al presentarse algún síntoma en alguna planta se tomó una muestra y se observó al microscopio óptico, se incubó y se sembró en Papa-Dextrosa-Agar, agar-agar y agar harina de maíz.

PARA VIRUS

Se formaron dos lotes, cada uno con dos ejemplares de cada planta diferencial y sus respectivos testigos blancos, mismas especies usadas para hongos. Los virus inoculados fueron el Virus Mosaico del Tabaco (VMT) y el Virus Mosaico del Pepino (VMP). Cada virus se inoculó por separado, se realizó a nivel hoja, para lo cual se tomó de planta enferma 1 gramo de follaje, se maceró en un mortero con 4 ml de solución buffer de fosfatos a pH de 7. A tres de las hojas de cada planta se le espolvoreó carborundum como abrasivo, con el objeto de rasgar el tejido y que éste penetre perfectamente el virus. Se tomó del macerado con ayuda de un isopo y se untó suavemente sobre las hojas espolvoreadas con carborundum, cuidando de no romperlas. Para quitar el exceso del abrasivo y tejido se enjuagaron las plantas con agua potable. Se siguió el desarrollo de los síntomas en cada lote, comparándolos con el cuadro 7.

CUADRO 7. SINTOMAS DE VIRUS INOCULADOS (Vega, 1989)

VIRUS	SINTOMAS
Virus Mosaico del tabaco	Manchas cloróticas pequeñas en toda la hoja (mosaico) y arrugamiento
Virus Mosaico del Pepino	hojas arrugadas, cloróticas y achaparramiento de la planta

4. técnica Serológica de Inmunosorbencia con Enzimas Conjugadas (ELISA)

La técnica ELISA es muy sensible a la presencia de virus, aún en mínimas concentraciones se pueden detectar, por lo que se trabajó con semillas y follaje de jitomate y chile, usando testigos positivos (planta enferma), negativos (planta sana) para el Virus Mosaico del tabaco (VMT) y el Virus Mosaico del Pepino (VMP) y, sólo blanco (sin Virus), para el Virus Mosaico de la Alfalfa (VMA) y para el Virus Mancha Anular del Tomate (VMAT). Se realizaron 2 repeticiones en cada muestra. Estos dos últimos virus se consideraron porque al analizar microbiológicamente la semilla antes de usarse se detectaron. Esta prueba se realizó en placas de poliestireno transparentes, de 12 cm X 8 cm, dividida en 96 micropozos acomodados en 12 columnas y 8 renglones (figura 6).

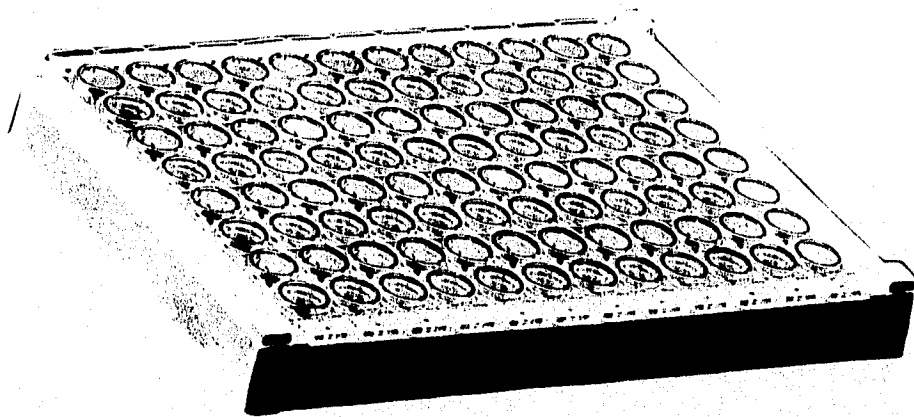


Figura 6. Placa usada en la técnica serológica ELISA.

Esta técnica se llevó a cabo en dos días. Existe de ella dos procedimientos: vía peroxidasa y vía fosfatasa alcalina, esto depende de la base usada para el sustrato del antisuero, según técnica de los antisueros usados (AGDIA).

FOSFATASA ALCALINA: esta vía se usó con el antisuero del Virus Mosaico del Pepino (VMP) y para el Virus Mosaico de la Alfalfa (VMA).

PEROXIDASA: se usó para el Virus Mosaico del Tabaco (VMT) y para el Virus Mancha Anular del Tomate (VMAT).

ELISA CON SUSTRATO DE FOSFATASA ALCALINA

La placa de poliestireno se dividió para los dos virus a identificar: Renglones B y C para el VMP en follaje y semilla de chile, renglones D y E para el VMA en follaje y semilla de chile, en renglones F y G para el VMA en follaje y semilla de jitomate; en renglón A, testigos positivo y negativo para el VMP y en el renglón H, blancos para el VMA (no hubo testigos positivos), Se tomaron 6 muestras compuestas de cada lote de virus (VMA y VMP), a partir de la columna 7 se colocó la repetición correspondiente tanto en semilla

como en follaje (cuadro 8). Enseguida se cubrió la placa adicionando el primer antisuero para cada uno de los virus mencionados, con una dilución de 1:1000 en solución amortiguadora (SOLAM) de cobertura. De esta dilución se colocó 200 μ l en cada pozo de la placa (ver apéndice 2) y se incubó durante 4 horas en una cámara húmeda.

Después de las cuatro horas se lavó la placa, se vació fuerte su contenido y se enjuagó tres veces con buffer de lavado (Ver apéndice 2), en cada lavado se sacudió fuertemente boca abajo sobre papel secante. Los siguientes lavados se realizaron de la misma forma. Enseguida se maceró 0.2 g de cada muestra compuesta de semilla de chile con 2 ml de buffer de extracción, de igual forma se maceró semilla de jitomate y por separado, cada una de las muestras compuestas del follaje en una relación de 1:10 (0.2 g de muestra por 2 ml de buffer de extracción) tanto para las muestras de chile como para las muestras de jitomate. De este macerado se colocaron 200 μ l en cada pozo de la placa, se incubó durante toda la noche en una cámara húmeda a 6°C.

Al siguiente día se lavó la placa de la misma manera ya descrita, posteriormente se colocó el segundo antisuero monoclonal o detector. Este antisuero (anti-VMP y anti-VMA) se diluyó en SOLAM Reactivo A (ver apéndice 2) en proporción de 1:1000 y de ésta se colocaron 200 μ l en cada pozo de la placa, se dejó incubar durante 2 horas en

CUADRO 8. MAPA DE MUESTRAS PARA ELISA CON FOSFATASA ALCALINA EN CHILE Y JITOMATE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	testigo + VMP	testigo - VMP					testigo + VMP	testigo - VMP				
B	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile	VMP- F chile
C	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile	VMP- S chile
D	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile	VMA- F chile
E	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile	VMA- S chile
F	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate	VMA- F jitomate
G	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate	VMA- S jitomate
H	blanco VMA						blanco VMA					

F: FOLLAJE
S: SEMILLA

REPETICIONES

cámara húmeda, para después volverla a lavar. Ya lavada se adicionó el conjugado (antisuero-enzima), el cuál se preparó diluyéndolo en solam reactivo A en una proporción de 1:1000 y de éste se adicionaron 200 μ l a cada pozo, se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se volvió a lavar la placa y finalmente se adicionó el sustrato; el cual se preparó diluyendo 1 pastilla de P-Difenil Fosfato (PNP) en 20 ml de solución buffer de PNP (ver apéndice 2), en una concentración de 1 mg/ml para tomar de ésta 200 μ l para cada pozo de la placa. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, cuando los testigos positivos y negativos colorearon de amarillo, se leyó la placa a 405 nm en el lector de ELISA.

ELISA CON SUSTRATO DE PEROXIDASA

La placa se dividió para los tres virus de la siguiente forma: en el renglón A se colocaron dos blancos para el VMAT; en los renglones B y C se destinó para el VMAT en follaje y semilla; los renglones D y E para el VMT en follaje y semilla de jitomate y en los renglones F y G el VMT follaje y semilla de chile y en el renglón H se colocaron los testigos positivos y negativos del VMT (Cuadro 9).

Como primer paso, se adicionó el antisuero primario o atrapador por separado, para cada uno de los virus (VMT y VMAT) en solución buffer de cobertura (ver apéndice 2) en una concentración de 1:1000. De

CUADRO 9. MAPA DE MUESTRAS PARA ELISA CON PEROXIDASA EN JITOMATE Y CHILE.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blanco VMAT						blanco VMAT					
B	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate	VMAT-F- jitomate
C	TmRSV S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate	VMAT-S- jitomate
D	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate	VMT-F jitomate
E	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate	VMT-S jitomate
F	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile	VMT-F chile
G	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile	VMT-S chile
H	Testigo VMT (+)						Testigo VMT (-)					

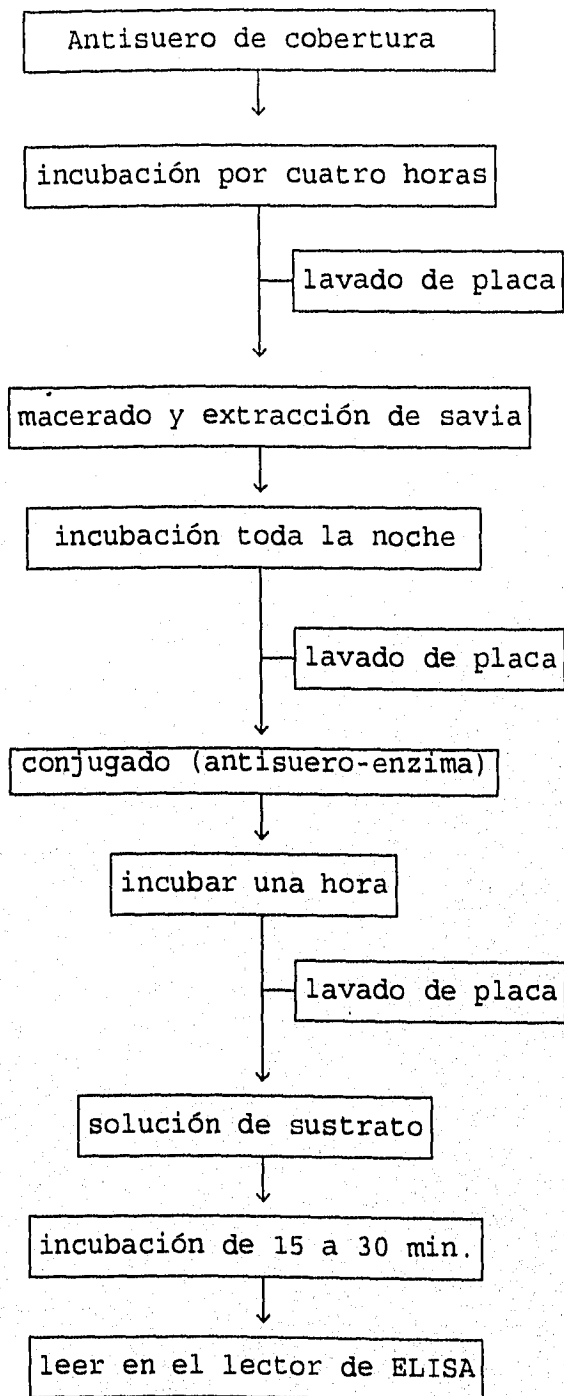
F: FOLLAJE
S: SEMILLA

REPETICIONES

esta dilución se colocaron 200 μ l en cada pozo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas en una cámara húmeda. Pasada la incubación se lavó la placa como en el procedimiento anterior; paso seguido se prepararon las muestras macerando semilla y follaje por separado con buffer de extracción 0.2 g en 2 ml. De este macerado se colocaron 200 μ l en cada pozo por cada muestra y se dejó reposar durante toda la noche.

Al siguiente día, se volvió a lavar la placa para adicionar el conjugado (segundo antisuero monoclonal o detector). Se diluyó el antisuero anti-VMT y anti-VMAT (1:200) por separado, en otra dilución del componente MRST (componente que acompaña al antisuero) y buffer PBST (proporción de 1:5), se adicionó 200 μ l de esta solución en su respectivo pozo. Se incubó durante dos horas en una cámara húmeda, se lavó la placa y en seguida se preparó la solución de sustrato para lo cual se diluyó OPD (ver apéndice 2) en agua destilada en una relación de 1:9, en esta solución se dejó remojar durante dos minutos una etiqueta de OPD, que es parte del juego de antisueros. Se mezcló todo esto y se adicionó 200 μ l a cada pozo, después se incubó durante 15-30 minutos en oscuridad hasta que se observó una coloración naranja, finalmente se procedió a tomar lectura en el lector de ELISA a 490 nm. En general el procedimiento se realizó de acuerdo al siguiente diagrama de flujo:

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA TECNICA SEROLOGICA ELISA



6. RESULTADOS Y DISCUSION

HONGOS

CAMARA HUMEDA Y MEDIOS DE CULTIVO

Las investigaciones sobre técnicas de diagnóstico en plantas se orientan más a modificar las técnicas ya existentes por ejemplo Kulik (1984) que modifica la técnica de cámara húmeda para la detección del hongo *Phoma lingam* que ataca a crucíferas, o a buscar nueva tecnología más sofisticada como Irwin (1987), pero no nos indican cual es la más recomendable de acuerdo a nuestros objetivos, ya que no son estudios llevados a cabo en nuestro país.

En el cuadro 10 se puede ver un resumen obtenido del crecimiento de hongos en semilla de jitomate para las técnicas de cámara húmeda y medios de cultivo artificial. Se necesitaron de 3 días para diagnosticar, ya que el periodo de crecimiento y esporulación de los hongos es entre 2 y tres días, máximo 4. Después de este periodo el crecimiento de las colonias es abundante, y dificulta la identificación de los patógenos que son los que nos interesan. Hay que considerar además que al manipular los medios de crecimiento y revisarlos hay más riesgo de contaminación aún si se trabaja bajo la protección del calor de mecheros y la campana de flujo laminar.

Al primer día en cámara húmeda ya había crecimiento y esporulación, entre los cuales se identificó a *Alternaria solani*. A pesar de que este hongo no fue inoculado, tal patógeno se transmite en semilla de

CUADRO 10. HONGOS ENCONTRADOS EN SEMILLA DE JITOMATE, EN CAMARA HUMEDA Y DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO NUTRITIVOS.

DIAS	CAMARA HUMEDA	MEDIOS DE CULTIVO ARTIFICIAL		
		PAPA - DEXTROSA - AGAR	AGAR - AGAR	AGAR - HARINA - MAIZ
1	<i>Alternaria solani</i> <i>Rhizopus sp</i>	<i>Rhizopus sp</i> CRECIMIENTO DE MICELIO	SIN CRECIMIENTO	CRECIMIENTO DE MICELIO
2	<i>Alternaria solani</i> <i>Rhizopus sp</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus sp</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	SIN CRECIMIENTO	<i>Rhizopus sp</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria solani</i>
3	<i>A. solani</i> <i>Rhizopus sp</i> <i>F. oxysporum</i> <i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Rhizopus sp</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Phytophthora capsici</i>	<i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus sp</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Phytophthora capsici</i>
4	EXCESO DE CRECIMIENTO	EXCESO DE CRECIMIENTO	<i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Cladosporium fulvum</i>	EXCESO DE CRECIMIENTO

un ciclo a otro como lo indica Moreno (1988), causando en jitomate la pudrición del fruto. Este hongo ya lo portaba la semilla desde su inicio por lo que se consideró para los resultados.

Rhizopus sp es otro de los hongos identificados, tanto en cámara húmeda como en PDA. Este género carece de importancia fitopatológica, a pesar de considerarse un hongo de deterioro avanzado, el cuál tal vez provino de alguna semilla muy deteriorada puesto que éstas se seleccionaron al azar para su siembra a pesar de usar semilla certificada.

En el medio de cultivo agar-agar no hubo crecimiento alguno y en el de agar-harina de maíz tan solo hubo crecimiento de micelio, esto quiere decir que aún no madura el hongo.

Al día 2 , en cámara húmeda y PDA se identificó *Fusarium oxysporum* y en el medio agar harina de maíz éste mismo, pero aún los conidios inmaduros. Al tercer día se identificó claramente este hongo al encontrarse los conidios ya maduros en abundancia. El medio agar agar hasta este día fue que se identificó a *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, en el resto de los medios de cultivo y cámara húmeda el crecimiento fue muy abundante, aún así se identificó a *Cladosporium fulvum* , causante del moho de la hoja en jitomate, tanto en cámara húmeda como en PDA. Un hongo más específico como el género *Phytophthora* requieren de condiciones especiales de

nutrición, luz y temperatura para su crecimiento, aún así se logró identificar en PDA y agar harina de maíz. Este hongo es el causante del tizón tardío en jitomate, el cual pudre el fruto.

Más de 3 días ya no tiene caso buscar más patógenos puesto que; el crecimiento de las diferentes colonias fue tan abundante que se cubrían unos con otros, a excepción del medio agar-agar en el cual apenas si crecieron tres diferentes colonias: *Alternaria solani*, *fusarium oxysporum* y *Cladosporium fulvum*.

Para la semilla de chile se encontró algo similar, lo cual podemos ver en el cuadro 11. Se puede observar que la cámara húmeda proporciona gran información sobre los hongos presentes en las semillas; pues por esta técnica se logró identificar tres especies dos de las cuales fueron inoculadas: *Cladosporium fulvum* y *Fusarium oxysporum*, sin embargo, en comparación con los medios de cultivo artificial es menos eficiente porque con éstos últimos se identificó mayor número de patógenos, sin embargo la cámara húmeda es recomendable cuando se trata de hongos específicos que necesitan forzosamente el sustrato del hospedero para su crecimiento y esporulación.

Los medios PDA y harina de maíz son muy similares, puesto que con ambos se detectó el mismo número de hongos y con la misma diversidad; aunque con diferente desarrollo de las colonias, el

CUADRO 11. HONGOS ENCONTRADOS EN SEMILLA DE CHILE, EN CAMARA HUMEDA Y DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO NUTRITIVOS.

DIAS	CAMARA HUMEDA	MEDIOS DE CULTIVO ARTIFICIAL		
		PAPA - DEXTROSA - AGAR	AGAR - AGAR	AGAR - HARINA - MAIZ
1	<i>Cladosporium fulvum</i> MICELIO	MICELIO	SIN CRECIMIENTO	MICELIO
2	<i>Cladosporium fulvum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Curvularia sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i> <i>Alternaria solani</i>	<i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Curvularia sp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i>
3	<i>A. solani</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>F. oxysporum</i>	EXCESO DE CRECIMIENTO	<i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Penicillium sp.</i>	SIN CAMBIO
4	EXCESO DE CRECIMIENTO		EXCESO DE CRECIMIENTO	EXCESO DE CRECIMIENTO

crecimiento de éstas es más rápido en el medio PDA. El medio agar-agar es menos eficiente, a pesar de que su crecimiento es menor y se pueden distinguir mejor las diferentes colonias emergentes, la diversidad es menor, la razón es que este medio es muy pobre en nutrientes, por lo tanto son pocos los microorganismos que pueden crecer en ellos. Este resultado es apoyado con pruebas que se han realizado en este centro con otras especies de semillas y en el extranjero como Hewett (1987), quien encuentra muy aceptable la técnica de Papa-Dextrosa-Agar para detectar *Ascochyta pisi* Lib (otro hongo) en semilla de chícharo.

Como se pudo observar en los cuadros 10 y 11, la cámara húmeda y el medio PDA tanto para semilla de jitomate como en semilla de chile, resultan ser los más eficientes, puesto que al segundo día se diagnosticaron la mayoría de los patógenos para la semilla de chile y al tercer día en jitomate, siendo ya inadecuado buscar más patógenos al cuarto día, puesto que el crecimiento fue muy abundante y los hongos que surgían fueron saprófitos, esto es; no patógenos para jitomate y chile, por lo cual ya no era operante debido a que se corre el riesgo de que sean contaminantes.

PLANTAS DIFERENCIALES

EN HONGOS

Fue difícil esta técnica, desde la inoculación de los patógenos hasta el desarrollo de los síntomas; los cuales en ocasiones no se

podían detectar hasta más avanzado el daño, por ejemplo marchitamiento, amarillamiento o pudrición del fruto. *Fusarium oxysporum* se logró inocular a todas las diferenciales usadas, por otra parte en el caso de *Phytophthora capsici* sólo se logró inocular en *Lycopersicon esculentum*, por lo que no fue posible trabajar bien con este hongo, esto se atribuye a que es un hongo específico y difícil de manejar, además con esto se demuestra lo complicado de la técnica por lo que es necesario un cambio a otra más confiable (Ramírez y Romero 1980).

EN VIRUS

Cucumis sativum fue la primera en presentar síntomas de moteado debido al VMT, característico de éste a los 15 días de inoculado, al mismo tiempo *Nicotiana xanthi* presentó daños semejantes a las raspaduras, probablemente causados al realizar la inoculación, sin embargo la mayoría de las plantas diferenciales presentó el típico mosaico (moteado) y arrugamiento de las hojas, consecuencia del ataque del VMT (cuadro 12). Cabe recalcar que las plantas diferenciales nos indican los principales síntomas que presentan los cultivos en el campo (Rodríguez y Acosta, op. cit.).

CUADRO 12. SINTOMATOLOGIA OBSERVADA EN LA INOCULACION DE VIRUS MOSAICO DEL TABACO EN AMBOS CULTIVOS.

PLANTA DIFERENCIAL	EVALUACION EN DIAS	SINTOMA OBSERVADO
<i>Cucumis sativum</i>	15	Moteado por VMT
<i>Nicotiana xanthi</i>	15	Daños semejantes a las raspaduras en hojas
<i>Lycopersicon esculentum</i>	20	Moteado y arrugamiento en hojas
<i>Capsicum annum</i>	20	Moteado, mosaico
<i>Datura stramonium</i>	20	enchinamiento de hoja y mosaico
<i>Cucurbita melo</i>	-	Ninguno
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	Ninguno

El lote inoculado con el Virus Mosaico del Pepino presenta algunas plantas diferenciales con síntomas característicos los cuales se esperaban que se presentaran para dar el diagnóstico que el VMP es el virus causante de los daños (Cuadro 13), coincidiendo con lo que reporta Vega (1989) .

CUADRO 13. SINTOMAS EN PLANTAS DIFERENCIALES CAUSADOS POR EL VIRUS MOSAICO DEL PEPINO

PLANTA DIFERENCIAL	TIEMPO EN DIAS	SINTOMAS OBSERVADOS
<i>Cucumis sativum</i>	15	Amarillamiento de hojas y enchinamiento
<i>Nicotiana xanthi</i>	17	Enchinamiento de hojas
<i>Lycopersicon esculentum</i>	15	Clorosis y enchinamiento de hojas
<i>Datura stramonium</i>	-	ninguno
<i>Capsicum annum</i>	14	Amarillamiento y deformación de hojas
<i>Cucurbita melo</i>	14	Enchinamiento de hojas
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	ninguno

Esta técnica no es recomendable usarla para los objetivos planteados, puesto que se lleva de 20 a 30 días, demasiado tiempo para un diagnóstico, además el lugar donde se trabaja debe llevar un estricto control de insectos y factores ambientales para que no se confundan con la sintomatología de patógenos, aquí se controló a la mosquita blanca con aplicaciones mensuales de insecticidas.

TECNICA ELISA

Se encontró que mediante la prueba de ELISA es posible detectar bajas concentraciones de virus tanto en follaje como en semilla, lo anterior se puede observar en los cuadros 14 Y 15, que representan las placas de poliestireno usadas en esta técnica, los números representan la lectura de cada muestra dados por el lector ELISA a 490 nm de absorbancia para la vía peroxidasa y 405 nm para fosfatasa alcalina.

Los resultados en esta técnica se basan en la intensidad de color (colorimetría) que da la reacción del complejo anticuerpo-enzima-antígeno-sustrato, el cuál varía de un verde claro (sin reacción, con un valor inferior a 0.09 nm) pasando por amarillo (reacción positiva, con valor de 0.1 nm), hasta un naranja intenso (reacción positiva, mayor a 0.1 nm).

Los valores resaltados con negritas corresponden a reacciones positivas, con valores iguales o mayores a 0.1 nm de absorbancia esto es; hay presencia de virus (Sutula, 1986). Para el virus **VMAT** la reacción fue negativa en ambos cultivos, el cual se consideró porque al realizar las pruebas microbiológicas a la semilla antes de iniciar se detectó, sin embargo, en el desarrollo de las pruebas la reacción fue negativa, esto se debió tal vez a que en el estadio adulto, y habiendo tenido un desarrollo rápido la incidencia viral fue menor, reportado por Vega, 1989 quien encontró que los virus se

CUADRO 14 RESULTADOS DE LA TECNICA DE ELISA CON PEROXIDASA EN FOLLAJE Y SEMILLA DE JITOMATE Y CHILE.

POZO	MUESTRA	DESCRIPCION	REPETICION	LECTURA A 450 nm
A1	M1	VMAT-blanco	a	0.002
			b	0.002
B1	M1	VMAT-follaje/jitomate	a	0.010
			b	0.002
B2	M2	VMAT-follaje/jitomate	a	0.014
			b	0.013
B3	M3	VMAT-follaje/jitomate	a	0.090
			b	0.113
B4	M4	VMAT-follaje/jitomate	a	0.002
			b	0.002
B5	M5	VMAT-follaje/jitomate	a	0.063
			b	0.062
B6	M6	VMAT-follaje/jitomate	a	0.003
			b	0.002
C1	M1	VMAT-semilla/jitomate	a	0.036
			b	0.007
C2	M2	VMAT-semilla/jitomate	a	0.027
			b	0.011
C3	M3	VMAT-semilla/jitomate	a	0.059
			b	0.040
C4	M4	VMAT-semilla/jitomate	a	0.017
			b	0.006
C5	M5	VMAT-semilla/jitomate	a	0.021
			b	0.005
C6	M6	VMAT-semilla/jitomate	a	0.010
			b	0.013
D1	M1	VMT-follaje/jitomate	a	0.797
			b	0.721
D2	M2	VMT-follaje/jitomate	a	1.302
			b	1.326
D3	M3	VMT-follaje/jitomate	a	1.616
			b	1.545
D4	M4	VMT-follaje/jitomate	a	0.725
			b	0.678
D5	M5	VMT-follaje/jitomate	a	1.791
			b	1.389
D6	M6	VMT-follaje/jitomate	a	0.036
			b	0.046
E1	M1	VMT-semilla/jitomate	a	0.009
			b	0.006
E2	M2	VMT-semilla/jitomate	a	0.797
			b	0.008
E3	M3	VMT-semilla/jitomate	a	0.055
			b	0.050

CUADRO 14 CONTINUACION...

E4	M4	VMT-semilla/jitomate	a b	0.025 0.014
E5	M5	VMT-semilla/jitomate	a b	0.089 0.010
E6	M6	VMT-semilla/jitomate	a b	0.061 0.052
F1	M1	VMT-follaje/chile	a b	0.023 0.015
F2	M2	VMT-follaje/chile	a b	0.031 0.018
F3	M3	VMT-follaje/chile	a b	0.119 0.111
F4	M4	VMT-follaje/chile	a b	0.057 0.047
F5	M5	VMT-follaje/chile	a b	0.078 0.073
F6	M6	VMT-follaje/chile	a b	0.010 0.003
G1	M1	VMT-semilla/chile	a b	0.009 0.004
G2	M2	VMT-semilla/chile	a b	0.059 0.049
G3	M3	VMT-semilla/chile	a b	0.034 0.023
G4	M4	VMT-semilla/chile	a b	0.053 0.049
G5	M5	VMT-semilla/chile	a b	0.079 0.086
G6	M6	VMT-semilla/chile	a b	0.016 0.010
H1	M1	VMT-testigo +	a	0.163
H7	M2	VMT-testigo -	a	0.026

CUADRO 15. RESULTADOS DE LA TECNICA DE ELISA CON FOSFATASA ALCALINA EN
JITOMATE Y CHILE.

POZO	MUESTRA	DESCRIPCION	REPETICION	LECTURA A 450 nm
A1	M1	VMP-testigo +	a	0.340
			b	0.380
A2	M1	VMP-testigo -	a	0.021
			b	0.018
B1	M1	VMP-follaje/chile	a	0.027
			b	0.027
B2	M2	VMP-follaje/chile	a	0.036
			b	0.027
B3	M3	VMP-follaje/chile	a	0.035
			b	0.026
B4	M4	VMP-follaje/chile	a	0.035
			b	0.026
B5	M5	VMP-follaje/chile	a	0.030
			b	0.019
B6	M6	VMP-follaje/chile	a	0.021
			b	0.016
C1	M1	VMP-semilla/chile	a	0.044
			b	0.031
C2	M2	VMP-semilla/chile	a	0.032
			b	0.009
C3	M3	VMP-semilla/chile	a	0.076
			b	0.028
C4	M4	VMP-semilla/chile	a	0.032
			b	0.022
C5	M5	VMP-semilla/chile	a	0.022
			b	0.017
C6	M6	VMP-semilla/chile	a	0.022
			b	0.022
D1	M1	VMA-follaje/chile	a	0.066
			b	0.010
D2	M2	VMA-follaje/chile	a	0.022
			b	0.021
D3	M3	VMA-follaje/chile	a	0.018
			b	0.019
D4	M4	VMA-follaje/chile	a	0.047
			b	0.040
D5	M5	VMA-follaje/chile	a	0.000
			b	0.004
D6	M6	VMA-follaje/chile	a	0.007
			b	0.003
E1	M1	VMA-semilla/chile	a	0.007
			b	0.002
E2	M2	VMA-semilla/chile	a	0.006
			b	0.002

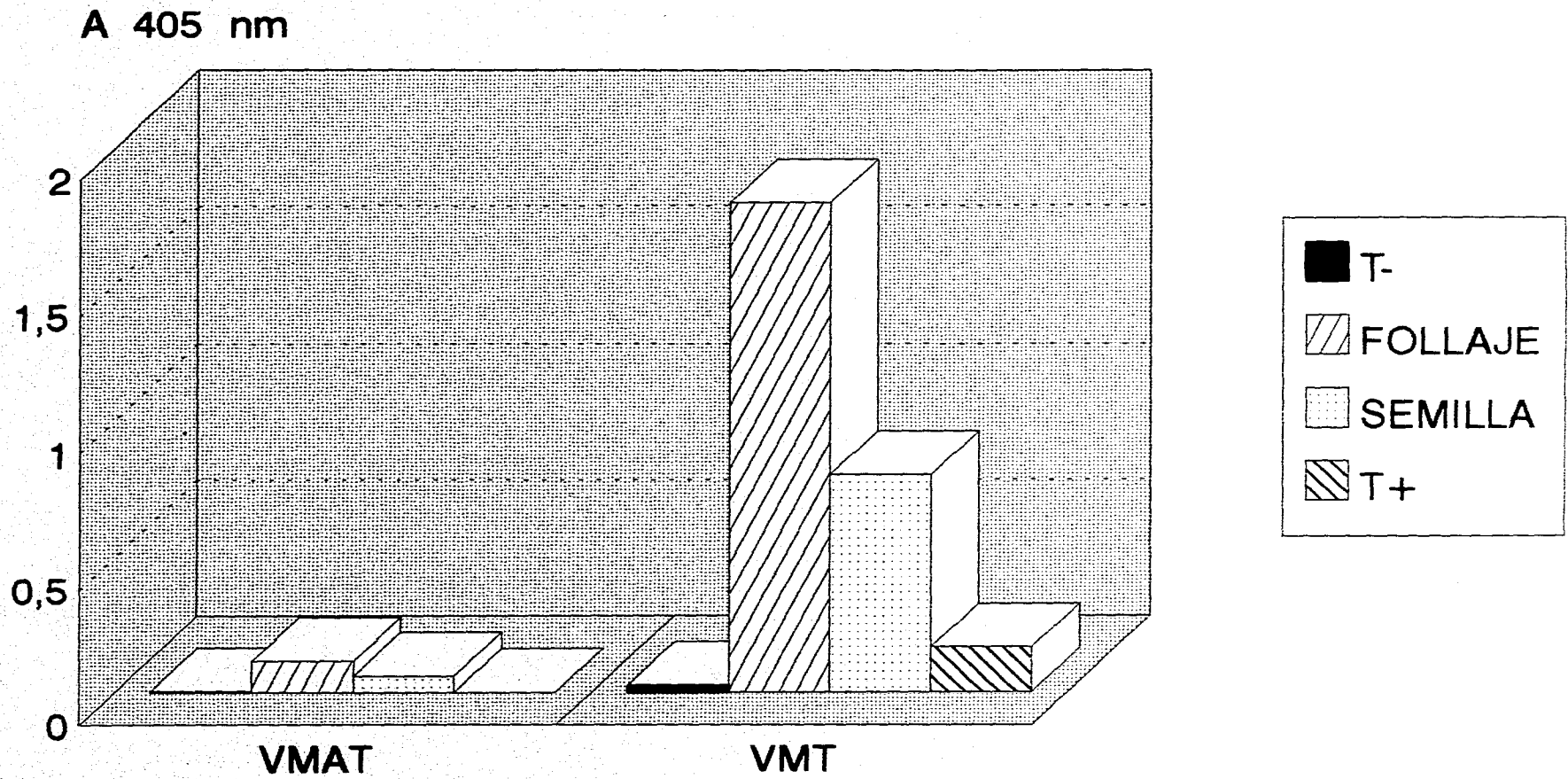
CUADRO 15 CONTINUACION...

E3	M3	VMA-semilla/chile	a	0.001
			b	0.005
E4	M4	VMA-semilla/chile	a	0.008
			b	0.000
E5	M5	VMA-semilla/chile	a	0.000
			b	0.004
E6	M6	VMA-semilla/chile	a	0.007
			b	0.003
F1	M1	VMA-follaje/jitomate	a	0.098
			b	0.081
F2	M2	VMA-follaje/jitomate	a	0.251
			b	0.248
F3	M3	VMA-follaje/jitomate	a	0.374
			b	0.391
F4	M4	VMA-follaje/jitomate	a	0.067
			b	0.053
F5	M5	VMA-follaje/jitomate	a	0.278
			b	0.240
F6	M6	VMA-follaje/jitomate	a	0.141
			b	0.130
G1	M1	VMA-semilla/jitomate	a	0.307
			b	0.287
G2	M2	VMA-semilla/jitomate	a	0.118
			b	0.046
G3	M3	VMA-semilla/jitomate	a	0.248
			b	0.233
G4	M4	VMA-semilla/jitomate	a	0.093
			b	0.064
G5	M5	VMA-semilla/jitomate	a	0.056
			b	0.049
G6	M6	VMA-semilla/jitomate	a	0.261
			b	0.212
H1	M1	VMA-blanco	a	0.015
			b	0.016

comportan de esta forma. En las plantas inoculadas con VMT tanto en chile como en jitomate, se presentó reacción positiva obteniéndose valores desde 0.1 nm hasta 1.7 nm, valores muy significativos. Por otra parte, Raymond (1989) Y Neergaard (1979), no reportan al Virus Mosaico del Pepino (VMP) como transmisible en semilla; Vega (1989), por su parte, lo reporta transmisible en semilla de chile, por lo que se realizaron las pruebas, resultando negativas y no coincidiendo con éste último en los resultados. Lo anterior tal vez se deba a la característica que él mismo menciona: "La transmisión por semilla es específica para el virus y hospedero", por lo que la variedad del chile usado (serrano) es resistente tal vez al VMP y para demostrarlo se tendría que elaborar otro diseño experimental, lo cual no concierne a los objetivos planteados. Por otro lado, el reaccionó de forma positiva a pesar de no obtener el testigo VMA positivo, se probó con un blanco para contrastar resultados. El hecho de que algunos resultados sean positivos no quiere decir que el ensayo esté mal, esta técnica detecta las plantas o muestras infestadas con hongos y no necesariamente todas las muestras tienen que ser positivas o negativas (Sutula, op. cit.).

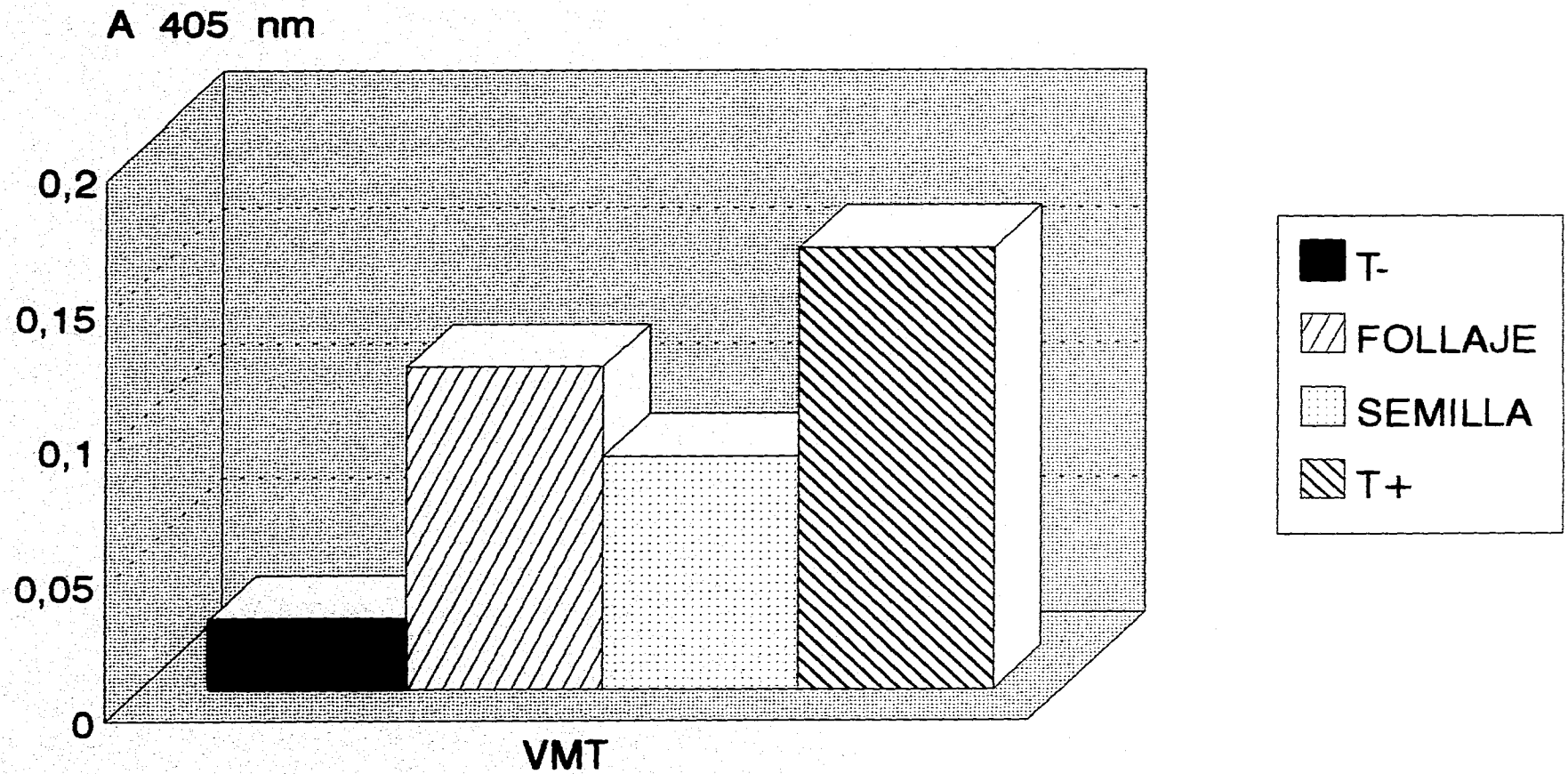
Lo anterior se puede apreciar mejor en las gráficas 1, 2, 3 y 4 en las que se representan los valores del VMAT y VMT en jitomate y chile respectivamente a 405 nanómetros; en las gráficas 3 y 4 los valores del VMP y VMA en chile y jitomate respectivamente a 490 nm.

DETECCION DE VIRUS EN JITOMATE POR ELISA



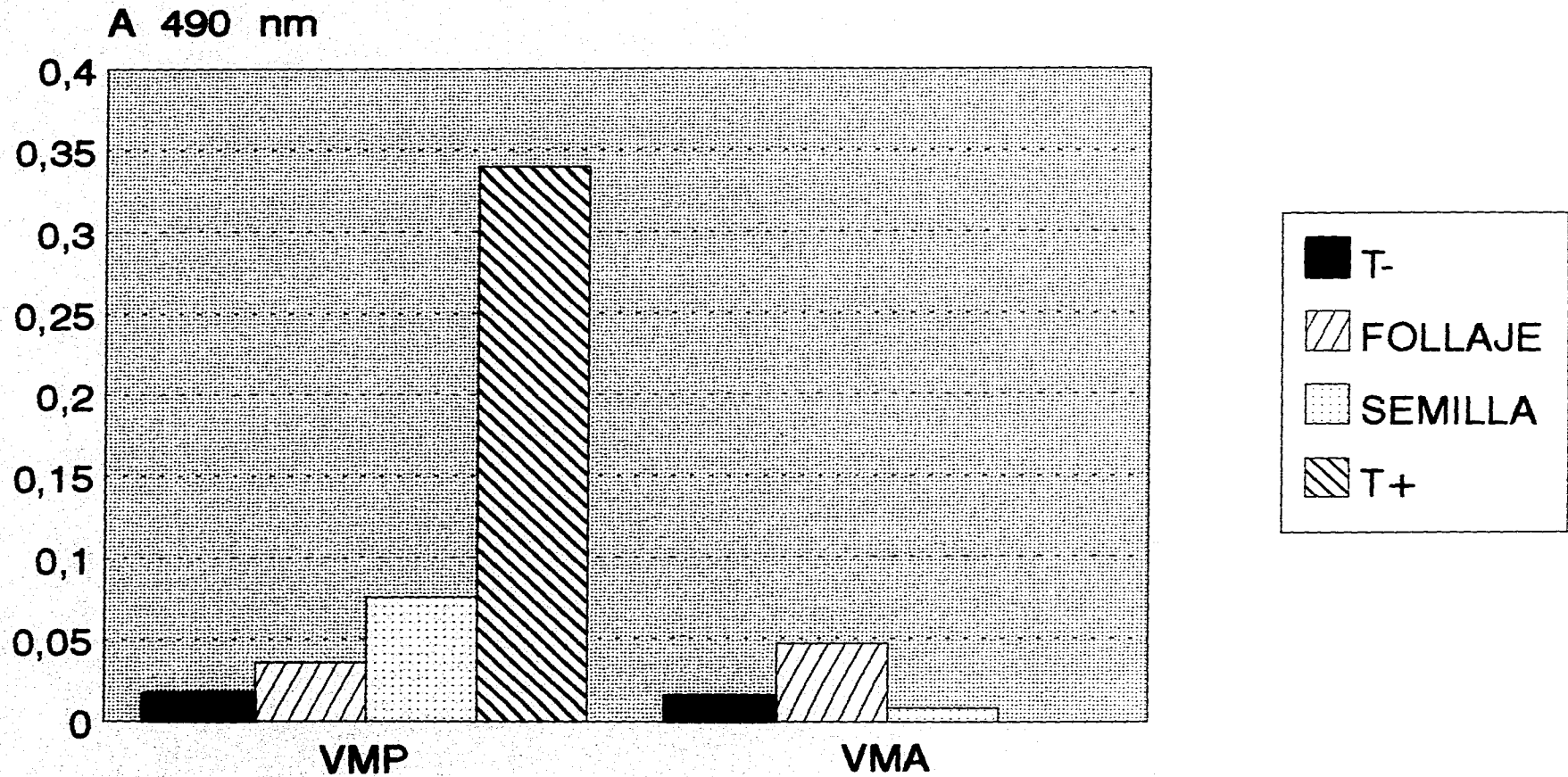
GRAFICA 1

DETECCION DE VIRUS EN CHILE POR ELISA



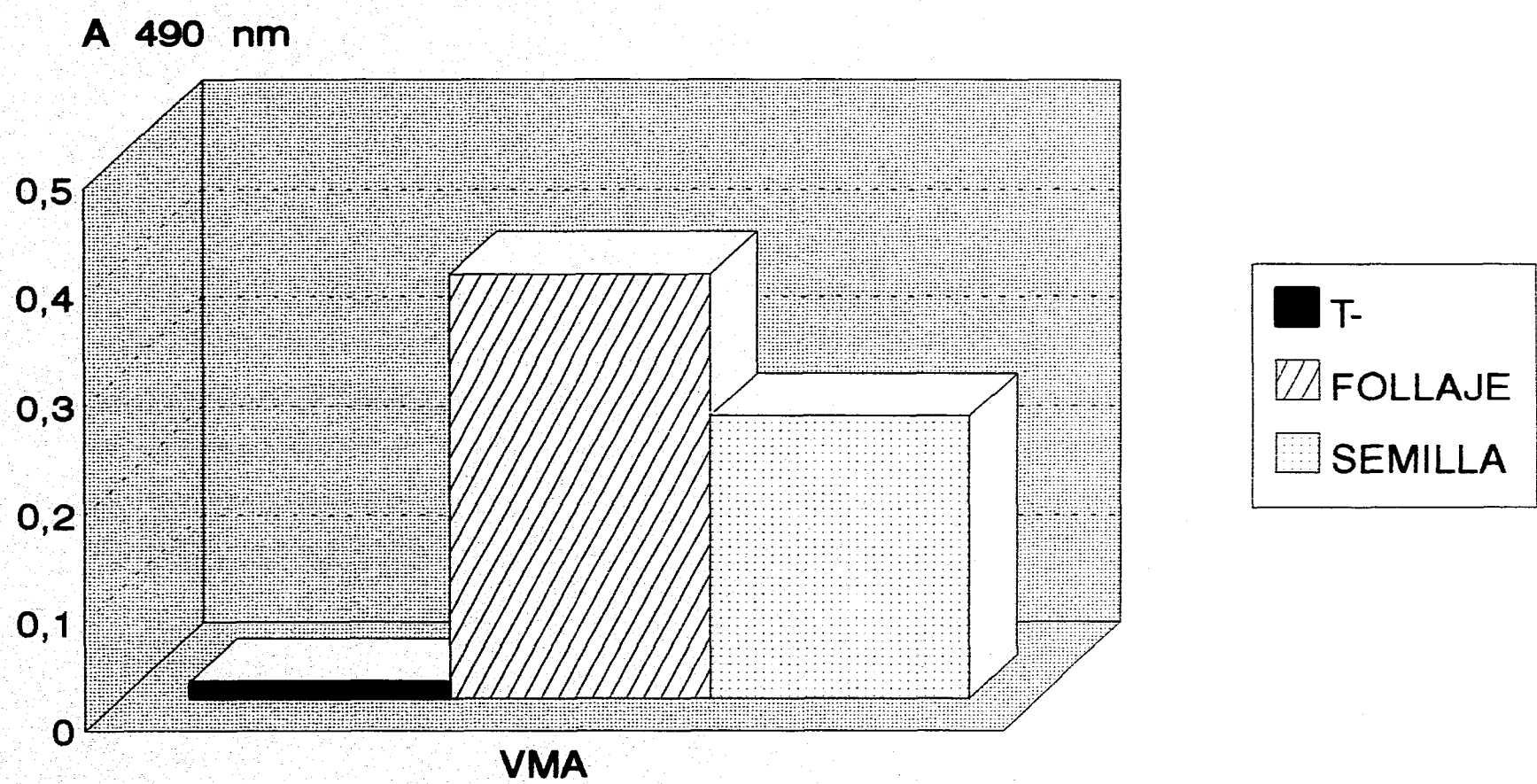
GRAFICA 2

DETECCION DE VIRUS EN CHILE POR ELISA



GRAFICA 3

DETECCION DE VIRUS EN JITOMATE POR ELISA



GRAFICA 4

En el cuadro 16 se resume el tiempo que se requirió para dar un diagnóstico de hongos y virus llevados en las semillas de jitomate y chile, de las cuales para nuestros objetivos las más adecuadas son para hongos; PDA que es una técnica sencilla y para virus; ELISA, que es una técnica más complicada pero confiable.

CUADRO 16. RESUMEN DE RESULTADOS RESPECTO AL TIEMPO INVERTIDO

	cámara húmeda	medios de cultivo	ELISA	plantas diferenciales
tiempo en días	2-3	1-3	2	20-30

7. CONCLUSIONES

Para hongos, las técnicas de cámara húmeda y medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar son las más recomendables, porque proporcionan un buen crecimiento de éstos y sólo 2 días para identificarlos. Son técnicas sencillas y se pueden adaptar a cualquier tipo de laboratorio en nuestro país. Ambas técnicas pueden usarse complementariamente para mejores resultados.

La detección temprana de virus transmitidos por las semillas en jitomate y chile se puede realizar de forma rápida y precisa mediante la serología: ELISA, pues tan sólo se requirió 2 días para su diagnóstico y pequeñas muestras de semilla.

Las plantas diferenciales, a pesar de proporcionar buena información sobre los patógenos llevados en las semillas, no es una técnica adecuada para un diagnóstico rápido y seguro como lo requiere nuestro país, debido a la amplitud de tiempo requerido (más de 20 días), además de no ser muy confiable porque algunos síntomas pueden confundirse con efectos ambientales o daños por insectos.

8. LITERATURA CITADA

- 1.- AGRIOS, G. N., 1991. Fitopatología. 2nd ed. Limusa, México, 756 pp.
- 2.- BAKER, K. F. 1980. Pathology of flower seeds. Seed Science & technology. 8: 575-589.
- 3.- CASTAÑO, Z. J. 1989. Principios básicos de fitopatología, Escuela Agrícola Panamericana. Dpto. de Protección Vegetal. Honduras, 190 pp.
- 4.- CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACION Y CAPACITACION PARA EL DESARROLLO AGROPECUARIO, FORESTAL Y ACUICOLA DEL SURESTE (CEICADES), 1987. Taller de Fitopatología Tropical. Colegio de postgraduados. Chapingo, México. 52 pp.
- 5.- CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE DIAGNOSTICO FITOSANITARIO, (CNRDF) 1993. Taller de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. SARH, México, 48 pp.
- 6.- CLARK, M. F. and ADAMS, A. N. 1979. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal Gen. Virology, 34: 475-483.
- 7.- DIKINSON, C. H. y LUCAS, J. A. 1987. Patología vegetal y patógenos de plantas. Ed. Limusa. México. 312 pp.
- 8.- GARRETH J. D., 1987. Plant pathology. Ed. prentice-hall, Nw. Jersey, E.U.A. 191 pp.
- 9.- JUSCAFRESA, B., 1973. Lucha contra los parásitos vegetales. Ed. Sintesis, S.A. España, 243 pp.
- 10.- HAMPTON J.G., MATTHEWS, D. 1980. The evaluation of seed-borne *Drechslera teres* in barley, a note on methodology. Seed Science

- & Technology, 8: 371-376.
- 11.- HEWETT, P. D., 1987, Detection of seedborne *Ascochyta pisi* Lib and test agreement within and between laboratories. Seed Science & Technology, 15: 271-283.
 - 12.- HILL, S.A. 1984. Methods in plant virology. Blackwell Scientific Publications, E.U.A. 167 pp.
 - 13.- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS (INIA), 1979. El cultivo del jitomate. (folleto), Centro de Investigaciones Agrícolas del Pacífico Norte, circular número 89, INIA, México.
 - 14.- IRWIN, J.A.G., 1987. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. Seed Science & Technology, 15: 755-763.
 - 15.- KREITLOW K.W., LEFEBVRE C.L., PRESLEY J.T., Y ZAUMEYER W.J. 1979. Enfermedades que pueden propagarse en las semillas; en Semillas. Departamento de agricultura de los E.U.A. Ed. CECSA, México. 1020 pp.
 - 16.- KULIK, M.M. 1984. New techniques for detection of seed-borne pathogenic viruses, viroids, bacteria and fungi. Seed Science & Technology, 12: 831-840.
 - 17.- MANGAN, A. 1983. The use of plain water agar for the detection of *Phoma betae* on beet seed. Seed Science & Technol. 11: 607-614.
 - 18.- MATHUR, S. K. MATHUR, S. B. and Neergaard P., 1975. Detection of seed-borne fungi in *Sorghum* and location of *Fusarium moniliforme* in the seed. Seed Science & Technology. 3: 683-690.
 - 19.- MATTHEWS, D. 1980. A comparison of methods for the detection of blind seed. Seed Science & technology, 8: 183-191.

- 20.- MENDOZA, Z.C., PINTO, B.C., 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. México, 311 pp.
- 21.- MORENO M. E., 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM, México, 109 pp.
- 22.- NEERGAARD, P. 1979. Seed Pathology. Vol. I y II. McMillan press. London, 1077 pp.
- 23.- POZO, C. O., 1981. El mejoramiento de los rendimientos y de la calidad del cultivo del chile. Resúmenes de las ponencias del simposio Nacional. de la Investigación Agrícola, INIA, SARH. México. 29-30 pág.
- 24.- RAMIREZ, V.J. Y ROMERO, C.S., (1980) Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la marchitez del chile. Agrociencias, Chapingo, Mexico: 39, 9-17 pp.
- 25.- RAYMOND, A. G. 1989. Producción de semillas de plantas hortícolas. Ediciones Mundi-Prensa, madrid, 223, 226, 236 pág.
- 26.- RICHARDSON, M. J. 1979. An anotated list of seed-borne diseases. 3a edic. Ed. CAB. 235 pp.
- 27.- ROMERO C.S., 1988, Hongos Fitopatógenos, Universidad Autónoma Chapingo, México. 347 pp.
- 28.- SALINAS DE G.C. 1994, Sexto Informe de Gobierno. Poder Ejecutivo Federal. México.
- 29.- SÁNCHEZ, C. M. A., 1979. Enfermedades del tomate en el Valle de Culiacán, Sin. Memorias de la IV reunión regional sobre plagas y enfermedades de las hortalizas, México 65-90 pp.
- 30.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, 1982. Guía para la asistencia técnica agrícola en el Valle de Sto. Domingo.

México, 197 PP.

- 31.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, 1992a.
Anuario estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1990. tomo I y II, Subsecretaría de Planeación. México, 713 pp.
- 32.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, 1992b.
Boletín mensual de información básica del sector Agropecuario y Forestal, Subsecretaría de Planeación. México, 4 pp.
- 33.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, 1993. Anuario Estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Subsecretaría de Planeación, tomo II, 708 pp.
- 34.- SUTULA, Ch. L., 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* (70)8:722-726.
- 35.- THOMSON, J. R., 1979. Introducción a la tecnología de las semillas. Edt. Acribia, España, 340 pp.
- 36.- VEGA, P.A. 1989. Transmisión de virus en semilla de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados, Chapingo, México, 52 pp.

apendice 1

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO ARTIFICIAL

PAPA-DEXTROSA-AGAR (DPA) *

agar bacteriológico
dextrosa y peptona 39 g
agua esterilizada 500 ml

Se coloca 550 ml agua esterilizada en un matraz Erlenmeyer de 1 litro y se le va agregando poco a poco el agar al mismo tiempo que se agita. Para disolver totalmente el agar se coloca en baño María durante 10 minutos y se agita. Al enfriarse la solución se ajusta el pH a 6.5, se afora a 1 litro y se pasa la mitad a otro matraz de un litro. Se tapan muy bien, se esterilizan a 15 lb de presión durante 15 minutos. Cuando la temperatura disminuya hasta 50°C se vacía 15 ml en cajas petri previamente desinfectadas y selladas asépticas. Se deja solidificar.

AGAR-HARINA DE MAIZ*

agar bacteriológico base
harina de maíz 39 g
agua destilada 1500 ml

En 550 ml de agua esterilizada se disuelven los 39 g de agar, se agita y se mantiene en baño María para facilitar la disolución. Ya frío se ajusta a pH 6.5 y se afora a 1 litro. Se pasan 500 ml a otro matraz de a litro se tapan y se esterilizan durante 15 min. a 15 libras de presión, se deja enfriar y se vacían 15 ml en cajas petri.

AGAR-AGAR*

agar-agar	20 g
agua destilada	1000 ml

Agregar 600 ml de agua en un matraz Erlenmeyer de 1 litro, vaciar el agar y agitar hasta disolverse totalmente, se tapa herméticamente el matraz y se esteriliza a 15 lb de presión durante 10 min. se deja enfriar un poco hasta 50°C más o menos y se vacían a cajas petri estériles.

LACTOFENOL AZUL DE ALGODON (colorante para teñir hongos)*

lactofenol (cristales)	20 g
glicerina	40 ml
ácido láctico	20 ml
agua destilada	20 ml
azul de algodón	0.1 g

Se agregan las sustancias en el orden en que aparecen, se homogeniza esta mezcla y se guarda en un frasco ámbar.

* FUENTE: GARRETH, 1987.

apendice 2

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA TECNICA ELISA PARA VIRUS

Todas las preparaciones para estas soluciones se realizan según el instructivo (1993) del laboratorio que provee estos reactivos (laboratorios AGDIA).

TECNICA ELISA

BUFFER PBST (buffer de lavado)

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

cloruro de sodio	8.0 g
fosfato dibásico de sodio (anhidro)	1.15 g
fosfato monobásico de potasio	0.2 g
cloruro de potasio	0.2 g
tween 20	0.5 g

ajustar pH a 7.4

BUFFER DE EXTRACCION

Disolver en 1000 ml de buffer PBST :

sulfito de sodio	1.3 g
polivinilpirrolidona MW 24-40 000	20.0 g
tween 20	20.0 g
albúmina de pollo	2.0 g
azida de sodio	0.2 g

ajustar el pH a 7.4

BUFFER DE COBERTURA

Disolver en 1000 ml de agua destilada :

carbonato de sodio 1.59 g

bicarbonato de sodio 2.93 g

azida de sodio 0.2 g

ajustar pH a 9.6

BUFFER OPD (peroxidasa)

Disolver en 1000 ml de agua destilada :

peróxido de hidrógeno (30%) 0.40 ml

ácido cítrico (anhidro) 4.66 g

fosfato dibásico de sodio (anhidro) 7.33 g

ajustar pH a 5.0

se adiciona 1 mg/ml de o-dihidrocloro fenilenediamina justo antes de usarse.

PRECAUCIÓN: Evite el contacto directo con el OPD, es cancerígeno.

BUFFER REACTIVO [A]

Adicionar a 1000 ml de buffer PBST :

BSA 2.0 g

polivinil pirrolidona

MW 24-40 000 20.0 g

azida de sodio 0.2 g

BUFFER DE SUSTRATO (fosfatasa alcalina)

Disolver :

diethanolamina 97.0 ml

en 800 ml de agua destilada

azida de sodio 0.2 g

ajustar el pH a 9.8

Aforar a un litro.

El p-nitrofenilfosfato (PNP) se adiciona 1 mg/ml justo antes de usarse.