



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

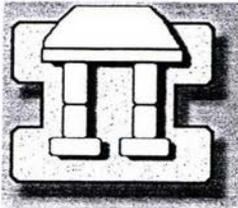
"DIAGNOSTICO DE INFECCIONES VIRALES EN
DIVERSOS CULTIVOS POR ANALISIS
ELECTROFORETICOS DE ARN DE DOBLE
CADENA."

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
PRESENTA
ALEJANDRO CRUZ MONSALVO REYES

DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
DIRECTOR DE TESIS.

LOS REYES IZTACALA

FEBRERO 2004



IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



U.N.A.M. CAMPUS



UNAM IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

IZT.



IZTACALA

del 2001.

DR. FELIPE TIRADO SEGURA
DIRECTOR
PRESENTE.

Atención Lic. América Landa Romero
Jefa de la Unidad de Administración Escolar.

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de
(X) Tesis de Investigación Tesis de experiencia Profesional ()
Titulado "Diagnóstico de infecciones virales en diversos cultivos por análisis electroforéticos de ARN de doble cadena"

Que presenta el pasante de Biología **ALEJANDRO CRUZ MONSALVO REYES**
Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros votos aprobatorios para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
M EN C	ELIAS PIEDRA IBARRA		Presidente
DR	RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ		Vocal
M EN C	GERARDO ORTIZ MONTIEL		Secretario
DR.	JORGE CAMPOS CONTRERAS		Suplente
DR	SERGIO VACA PACHECO		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"

Dr. Sergio Vaca Pacheco
Jefe de la Carrera

VoBo Dr Felipe Tirado Segura
Director

DEDICATORIA

A MIS HIJOS
ALAN, ARTURO Y ESTEFANY
POR SER EL MOTIVO Y GRAN PARTE DE MI VIDA

A MI ESPOSA
NORMA
POR CAMINAR Y ESTAR SIEMPRE A MI LADO

A MIS PADRES Y HERMANOS
FLOR, ISIDRO, OMAR, OSCAR, RAÚL Y TOÑO
POR SER EL MEJOR EJEMPLO PARA CON MI PERSONA

AGRADECIMIENTOS

A la vida que es tan difícil de entender, tan interesante de estudiar, que nos deja cada día una enseñanza, por lo maravillosa y bella que resulta ser..... por que si todo eso es dios, lo agradezco profundamente.

Al Biol. Manuel Mandujano Piña, por todas las enseñanzas y por ser el mejor amigo.

Al Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz por su asesoría y apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Al M en C. Gerardo Ortiz Montiel, M en C. Elias Piedra Ibarra, Dr, Jorge Eduardo Campos Contreras, Dr. Sergio Vaca Pacheco por la revisión del manuscrito, valiosas correcciones y sugerencias al mismo.

A todos mis profesores que han sido un pilar importante para la formación de mi persona.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a la FES-Iztacala por dejar formarme académica y profesionalmente en esta importante institución.

A todos los compañeros y amigos de la UMF, L5, Edafología, Bioquímica Molecular, Microbiología, etc., que no menciono para no omitir a ninguno pero que saben que los considero como mi segunda familia.

A Juan y Llaraí por formar esta amistad tan profunda.

A mis amigos Gerardo, Ania, Adrián, Daniel, Josefina, Gérman y Griselda, por conservar mas que una amistad por tantos años.

A todos los amigos(as) que siempre me insistieron, se interesaron y preocuparon para que concluyera este trabajo, DE VERDAD GRACIAS.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
Aislamiento de ácidos nucleicos	13
Purificación de ARN dc	13
Detección y análisis de ARN dc	14
Otras aplicación del uso de aislamiento de ARN dc	15
Localización celular de ARN dc	17
MATERIAL Y METODOS	18
Área de estudio	18
Material Biológico	20
Extracción de ácidos nucleicos	20
Separación de ARN doble cadena (ARN dc) por cromatografía	21
Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida	21
Determinación de pesos moleculares de ARN dc	22
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	60
APENDICE I	61
BIBLIOGRAFIA	69

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Acido desoxirubonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ARN es	Acido ribonucleico cadena sencilla
ARN dc	Acido ribonucleico doble cadena
CARNA5	ARN satélite asociado a CMV
CMV	Cucumber Mosaic Virus
CYSDV	Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus
Da	Dalton
DIECA	Dietil carbonato de Sodio
ECTEOLA	Epiclorohidrina trietanolamina
ELISA	Inmunodetección por enzimas conjugadas
FR	Formas Replicativas
INSV	Mancha Necrotica del "Impatiens"
PCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa
PhCav	Physalis Cálico Virus
PHV	Pepper Huasteco Virus
PMTV	Viroide de la Planta Macho del Jitomate
PVP	Polivinilpirrolidona
RI	Replicación intermedia
RT-PCR	Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa
STE	Buffer de extracción y lavado (Sodio-Trisma base-EDTA)
TEV	Tobaco Etch Virus
TMV	Tobaco Mosaic Virus
TRSV	Tobacco Ringspot Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
WMS-1	Watermelon Mosaic Virus-1
ZYMV	Zuchinii Yellow Mosaic Virus

RESUMEN

El análisis de ARN de doble cadena (ARN dc) ha sido útil para caracterizar a virus de diferentes grupos, variantes dentro de un mismo grupo, infecciones latentes, infecciones por virus desconocidos, virus crípticos, virus y ARN satélite e incluso viroides. En el presente trabajo se identificó y detectó por análisis electroforéticos la presencia de virus que infectan a diversas especies de hortalizas que se cultivan en la región centro de México. Se colectaron plantas principalmente de: tomate, chile, frijol, calabaza y jitomate, provenientes de las localidades del estado de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos, estas muestras presentaron síntomas de probable origen viral. Se pudo determinar la presencia del virus del mosaico del pepino (CMV), mancha anular del tabaco (TRSV) y en algunos casos ARN satélite asociado a CMV (CARNA5). En otros casos se determinaron la presencia de bandas agrupadas de 2 y hasta 6 bandas de un peso molecular que varía de 1.2 a 0.9×10^6 Da que pudieran corresponder a virus crípticos o desconocidos no reportados en México. Al mismo tiempo los resultados indicaron la presencia de infecciones mixtas por diversos virus en las muestras colectadas de campo. Los resultados siguieron que los patrones electroforéticos se repiten en los diferentes sitios y aún en diferentes especies de plantas, mostrando dispersión de los patógenos sin límites geográficos. En algunos sitios se pudo determinar la presencia de posibles patógenos que solo se encuentran en esa localidad.

I. INTRODUCCIÓN

En México se cultivan diversas especies de hortalizas, las cuales pueden ser producidas por riego y temporal, el incremento en el rendimiento de estas ha mejorado significativamente por el uso de sistemas agrícolas especializados. Sin embargo la producción de estos cultivos sufre serias limitantes por el ataque de plagas y enfermedades, que además de reducir los rendimientos del cultivo, incrementan el costo de producción por los gastos que genera el manejo y control de este tipo de problemas. Un grupo importante de enfermedades que reducen el rendimiento y calidad de la producción hortícola son las causadas por virus (Ramírez, 1990).

Las enfermedades causadas por virus son importantes económicamente ya que producen una disminución en el crecimiento normal de la planta. En México se han detectado y descrito diversos virus en cultivos como frijol, maíz, trigo, cebada, jitomate, chile, tomate de cáscara, papa, papaya, pepino, melón y sandía. En papayo, el virus mosaico de la sandía-1 (watermelon mosaic virus-1 WMS-1) causante de la enfermedad mancha anular del papayo, ha sido sumamente destructiva para este cultivo en México. También es común observar en cultivo de tomate diversidad de síntomas en distintas regiones donde se cultiva y que sugieren enfermedades de origen viral (De La Torre, 1995). En el Estado de Sinaloa, a principios de los años 70s, en tomate se presentó una enfermedad denominada "chino", la cual es de origen viral y que causó pérdidas en el rendimiento del 30% (Silva y Delgadillo. 1993).

En otro caso en Australia en 1941, se reportó la mayor pérdida de cosecha de papa por un monto de \$ 1,750,000 dólares, causado por el virus X de la papa (Bald y Norris, 1941 citado por Walkey, 1991).

La importancia del diagnóstico de enfermedades virales así como la correcta identificación de los virus causantes es esencial para encontrar medidas adecuadas de control. Los síntomas que se presentan son insuficientes para una identificación positiva, estos síntomas se pueden presentar como resultado de la infección de más de un virus, o bien diferentes virus causan síntomas similares en el mismo cultivo.

Existen diferentes procedimientos y técnicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de enfermedades virales. Algunos de estos métodos utilizan el extracto crudo para inocular *in situ* la enfermedad a otras plantas, otros métodos requieren una preparación altamente purificada de virus. Estos últimos requieren equipos de laboratorio, asistencia por laboratorios de bioquímica para análisis de proteínas y ácidos nucleicos. Las técnicas más utilizadas son la separación de virus por plantas diferenciales o rango de hospederos, en donde principalmente se utiliza el modo o tipo de transmisión, rango y síntomas, inactivación por temperatura del virus, punto final de dilución, longevidad en extracto crudo y prueba de protección cruzada. La microscopía electrónica es otro método que ayuda a determinar el tipo de partícula y tamaño. El caso de los métodos por serología se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales, existen variantes de este tipo de prueba como son el uso de prueba serología para identificación de virus, prueba por precipitación, prueba de inmunodifusión, prueba de aglutinación, serología en microscopio electrónico y la existencia de otras pruebas como son las propiedades de precipitación, movilidad electroforética, análisis de ácidos nucleicos, análisis de proteína de la cápside y por último los análisis por técnicas moleculares (Walkey, 1991).

A pesar de la disponibilidad de varias técnicas de detección en virus, en México son escasos los trabajos que describen con certeza la naturaleza viral de múltiples enfermedades, en las que incluso podrían estar involucradas diversas infecciones mixtas, cuyo diagnóstico sería difícil si no se cuenta con la infraestructura necesaria y que implicaría el uso de las técnicas antes mencionadas y que no esta disponible en todos los laboratorios.

Un método alternativo para el diagnóstico de virus en plantas es el análisis de ARN de (ácido ribonucleico doble cadena), que es la forma replicativa de los virus de ARN cadena sencilla que causa el 70 % de las enfermedades que afecta a plantas. Este método ofrece las ventajas para el diagnóstico de virus es barato, rápido y no es específico. Entre las principales ventajas de este método destacan la inespecíficas, es decir que el análisis permite la detección de virus conocidos, infecciones latentes e incluso permite la detección de virus desconocidos. El aislamiento de ARN de por esta técnica se ha utilizado para la RT-PCR en CARNA 5 (Piedra I. 2001 comunicación personal). Viendo las ventajas del análisis de ARN de cadena doble, se propone utilizar

en este trabajo la técnica de ARN dc para su uso en el diagnóstico de virus y como complemento de una prueba de diagnóstico. Este trabajo pretende considerar la utilidad de la extracción y análisis de ácidos nucleicos de origen viral de doble cadena (ARN dc), como un método alternativo, complementario y de bajo costo para el diagnóstico de virus fitopatógenos.

JUSTIFICACIÓN

Es importante la utilización de un diagnóstico rápido y confiable para la determinación de posibles daños y por consecuencia pérdidas económicas las cuales pueden ser debido a infecciones virales en las hortalizas, de ahí la utilización del análisis de diagnóstico más adecuado. Los ARN dc pueden utilizarse para ensayos de transmisión y confirmar la naturaleza viral de una enfermedad, utilizando al supuesto agente causal en estado puro. Esto podría ser particularmente útil para el caso de virus desconocidos, inestables o indetectables a las técnicas de purificación comunes.

Aunque se ha encontrado que algunas plantas contienen ARN dc de origen celular, la consistencia con que el ARN dc puede ser extraído de tejido infectado por virus y el patrón típico de las bandas de ARN viral, cuando son separadas por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, permite que el análisis de ARN dc sea un método simple, práctico y complementario para el diagnóstico de virus fitopatógenos (Valverde, *et al.*, 1990b)

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar a los virus que afectan a diversas especies de plantas cultivadas como son tomate (*Lycopersicon esculentum* M.); tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.); chile (*Capsicum annum* L.); calabacita (*Cucurbita pepo* Grey zichinii); cebolla. (*Allium cepa* L), maíz (*Zea mayz* L), frijol (*Phaseolus vulgaris* L) , mediante el análisis electroforéticos de ARN de doble cadena (ARN dc).

OBJETIVOS PARTICULARES

Utilizar la técnica de electrofóresis como herramienta para el diagnóstico rápido de enfermedades virales.

Comparar con patrones electroforéticos de virus conocidos CMV, Carna-5 y TMV la presencia o ausencia de virus y partículas parecidas a virus en las diferentes especies de plantas cultivadas en los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos

III. ANTECEDENTES

En la zona centro de México, que abarca los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos, se cultivan diversas especies de plantas hortícolas, entre las más importantes, destacan: tomate (*Lycopersicon esculentum* M.); tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.); chile (*Capsicum annuum* L.); calabacita (*Cucurbita pepo* Grey zichinii); cebolla, (*Allium cepa* L), maíz (*Zea mayz* L), frijol (*Phaseolus vulgaris* L), productos que se consumen directamente en el Distrito Federal (Alvizo y Lozoya, 1987).

Estos cultivos son afectados por diferentes tipos de enfermedades, entre las que destacan los virus, que reducen fuertemente la producción o la calidad de la cosecha. La importancia económica de los virus fitopatógenos se aprecia fácilmente al considerar algunos ejemplos. La enfermedad de origen viral de los cítricos conocida como tristeza, ocasionó de 1936 a 1946 la muerte de 7 millones de naranjos en el estado de Sao Paulo, Brasil. El mosaico de la caña de azúcar causó pérdidas hasta de 60-80% en rendimientos de caña en áreas tropicales y subtropicales de América donde se cultivan variedades suaves de fácil industrialización. En general las enfermedades virales limitan la producción de cultivos de frijol, papa, chile, maíz, jitomate, entre otras. Considerando estos problemas es importante tomar en cuenta los requerimientos esenciales de los sistemas económicamente viables para el manejo de los cultivos que pudieran estar en conflicto con patógenos y el control de estos (Dickinson y Lucas 1987; De la I De Bauer, 1984; Matthews, 1970).

En plantas han sido descritos más de 1000 virus diferentes aunque solo una docena causa pérdidas económicas estimadas en mil millones de dólares, como el virus de la marchitez manchada de tomate (TSWV) y geminivirus, así como virus de aparición cíclica, como numerosas especies de tobamovirus, potyvirus, potexvirus, cucumovirus u hordeivirus, en cultivos de importancia económica y social (Golbach y Peters, 1994).

En México se han detectado diversas enfermedades virales que causan síntomas como mosaicos, deformación de hojas, enanismo y distorsión severa de ramas, hojas y tallos, amarillamiento intervenal y moteados de color amarillo brillante, que sugieren el ataque de múltiples y diversos virus, algunos bien caracterizados en cultivos como frijol, maíz, trigo, cebada, tomate, chile, tomate de cáscara, papa, papaya, melón y sandía, reportándose virus tales como virus mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus TMV), jaspeado del tabaco

(tobacco etch virus, TEV), mancha anular del tabaco (tobacco ringspot virus TRSV), el virus Huasteco del chile (pepper huasteco virus PHV), el virus mosaico de la sandía (watermelon mosaic virus-1 WMS-1), virus del mosaico de el pepino (cucumber mosaic virus CMV), marchites manchada del tomate (tomato spotted wilt virus TSWV), mancha necrótica del "Impatiens" (INSV). (Silva y Delgadillo, 1993; Garzon *et al.*, 1993; Ramirez, 1990; De La Torre *et al.*, 1995)

Durante varios años los síntomas fueron el único medio de diagnóstico para caracterizar a las plantas, ya que estos son la base inicial que se dispone para designar a las enfermedades, ya sea por un virus u otros agentes causales.

Muchos virus tienen hospedantes en los cuales la infección nunca causa síntomas visibles, designándose en virología vegetal a este tipo permanente de "in apariencia" como latencia. La presencia del virus puede observarse inoculando hospederos sensibles, por serología o por medio del microscopio electrónico. En algunos casos se llegan a presentar en partes del tejido de las plantas síntomas visibles o lesiones en el lugar de entrada del virus y son llamadas lesiones locales, otros efectos patológicos consisten en decoloraciones, desecación o muerte de los tejidos, también existen reacciones locales a la inoculación del virus y estas son necróticas en donde la invasión de la planta por el virus puede detenerse y se le denomina a este comportamiento hipersensibilidad. Sin embargo, en muchos casos el virus se vuelve sistémico y se propaga por lo general más rápido después de que el virus llega a los haces vasculares (Matthews, 1993; Pontis, 1975)

Para el diagnóstico de enfermedades de origen viral se recurre también a la observación de síntomas en inoculaciones artificiales de virus en hospedantes indicadoras. Detección de inclusiones virales celulares, microscopía electrónica, transmisibilidad por insectos vectores, serología y detección de ácidos nucleicos virales. La utilidad práctica de cada método depende del virus y del hospedante para cada enfermedad detectada. El diagnóstico utilizando únicamente plantas indicadoras no es confiable en todos los casos, ya que la reacción y síntomas de las plantas pueden variar por efecto de las condiciones ambientales, las características genéticas de los hospedantes utilizados y por la virulencia de posibles líneas del virus (Palukaitis *et al.*, 1983; Boccardo *et al.*, 1897; Galliteli *et al.*, 1991; Montasser *et al.*, 1991; Habili, 1993)

La detección serológica es el método más extensamente utilizado para el diagnóstico de virus fitopatógenos por sencilla y práctica, en este caso se obtienen anticuerpos monoclonales o policlonales los cuales son específicos para reconocer a un virus o líneas de estos. Esta prueba se realiza mediante ensayos de ELISA. Sin embargo, en plantas infectadas con más de un virus, es decir por mezclas de diferentes virus los cuales pueden incluir aquellos de ADN y ARN, en donde solo se podrá detectar aquellos virus o sus líneas serológicamente específicos, por lo que otros virus o líneas diferentes pueden pasar inadvertidos. (Antignus y Cohen, 1994., Sambrook *et al.*, 1989).

El fundamento de la presencia de las formas replicativas (FR) de ARN de esta dada, debido a que se sabe que la composición del 90 % de los virus que infectan plantas la presentan ARN de cadena sencilla. Durante la replicación del virus en células vegetales, el ARN de se produce como un producto intermediario (Fig. 1.1). Este ARN de es llamado "Forma Replicativa" el cual se encuentra presente consistentemente durante la infección con un virus de ARN de cadena sencilla sin importar el hospedero.

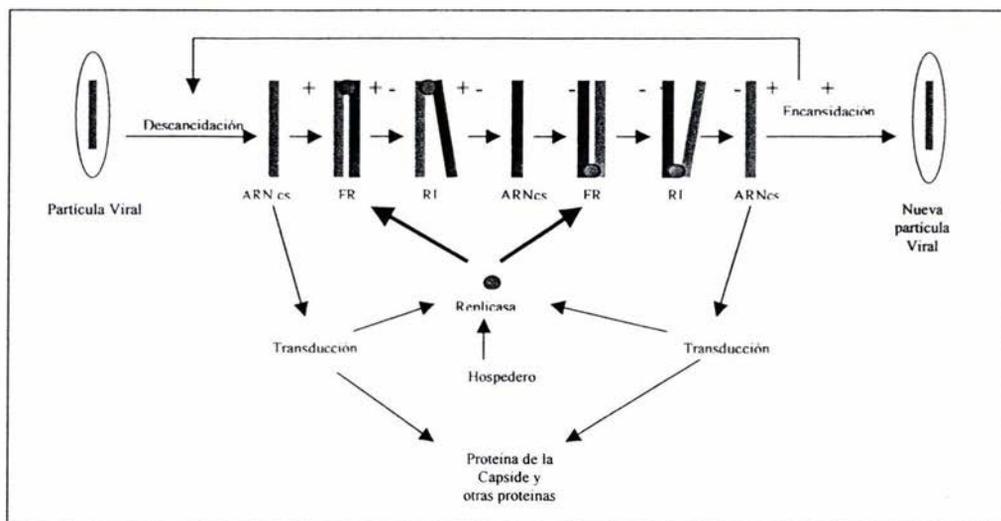


Figura 1.1. Propuesta esquemática de la representación del ciclo de replicación de ARN cadena sencilla típica de virus vegetales. En algunos casos se llega a producir la replicación de las formas subgenómicas de ARNs. Las formas replicativas obtenidas de ARNs, infectadas con virus de ARN cadena sencilla son probablemente las formas replicativas. Los RI consisten parcialmente de ARN cs por lo que resultan ser mas susceptibles a la degradación de ARNasas.

El análisis de ARN de ha sido útil para caracterizar a virus de diferentes grupos, variantes dentro de un mismo grupo, infecciones latentes, infecciones por virus desconocidos, virus crípticos, virus y ARN satélites e incluso viroides, que por su bajo peso molecular solo ha sido posible determinar por este método. Se han mencionado partículas isométricas pequeñas parecidas a virus en plantas superiores a los cuales se les ha denominado virus crípticos, los cuales se encuentran en concentraciones bajas y no se transmiten mecánicamente, así como los intentos de transmisión por injerto han fallado, estas partículas han sido examinadas basándose en ARNs de doble cadena, por lo que estas características han dificultado las pruebas de multiplicación en plantas y las cuales no derivan con una asociación con hongos, bacterias u otro tipo de fuente de infección y o transmisión, estos virus son interesantes debido al tipo de ácidos nucleicos, por ser nuevos virus isométricos y tener propiedades biológicas inusuales. Aunque aparentemente no dañan o dañan poco este tipo de infecciones virales, se convierte en una práctica importante ya que los resultados con otros métodos pueden resultar engañosos para la detección de virus basados en ARN cadena sencilla y no en la presencia de dobles cadenas en las plantas como sus formas replicativas (Palukaitis, *et al.*, 1983; Boccardo, *et al.*, 1987; Galliteli *et al.*, 1991; Montasser, *et al.*, 1991; Habili, 1993)

En México uno de los factores limitantes para la producción de tomate rojo (*L. esculentum* M.) es la presencia de una enfermedad viral denominada "chino" o "enchinamiento". En el estado de Sinaloa a causado pérdidas en el rendimiento de un 30% y a principios de los años 70s se observó en el estado de Morelos con una incidencia del 20 al 100%.

Este problema se encuentra en forma endémica en el estado de Sinaloa presentándose en los ciclos de producción primavera-verano y otoño-invierno, en los últimos años se ha reducido gradualmente la superficie de cultivos de esta hortaliza en los últimos años. Se asegura que esta enfermedad es causada por un geminivirus, transmitido por el insecto mosca blanca (Homóptera: Aleyrodidae) de la especie *Bemisia tabaci*. Sin embargo, no se ha demostrado con precisión que el agente causal sea un geminivirus, aunque se tiene evidencia que parte de los síntomas observados en campo son reproducidos por injerto o por transmisión con mosca blanca en plantas sanas en condiciones de invernadero, mientras otros datos indican la presencia de otros virus aun no caracterizados (Díaz, *et al.*, 1989; Velázquez, M.J., 1989; Tun. M., *et al.*, 1992; Acosta, R., *et al.*, 1991)

Galindo y colaboradores en 1982, aislaron y caracterizaron en plantas de tomate rojo un nuevo viroide transmisible eficientemente por áfidos al que se denominó como viroide de la Planta Macho del Jitomate (PMTV). El viroide fue encontrado en 13 especies de plantas representantes de la flora de las regiones jitomateras del estado de Morelos de la familia Solanacea.

Los síntomas causados por "viroide de la planta macho del tomate" en algunas especies de *Physalis* fueron la reducción del tamaño de planta, hoja y frutos, epinastia media de hojas, aclaramiento y necrosis de venas, pero sin aborto de flores (Orozco y Galindo, 1986; Galindo, 1987)

Díaz y Alvarado (1991) reportaron una enfermedad de probable origen viral en tomate de cáscara (*P. ixocarpa* B.) en el estado de Morelos conocida como "chino" que se ha encontrado con una incidencia del 32.5% y un nivel de daño del 25.3% en las diferentes localidades productoras, causada por un supuesto geminivirus. Sin embargo, no se aportaron pruebas sobre la identidad del posible virus causante de la enfermedad.

De La Torre *et al.*, en 1995 reportan aislamientos y caracterización de los virus TEV, CMV, TSWV, INSV, TRSV y TMV en tomate de Morelos, México y Puebla. La presencia de estos virus se confirmó por rango de hospederos, microscopía electrónica transmisión por insectos vectores y por serología (doble difusión en agar): por inmunodetección por enzimas conjugadas (ELISA), y por análisis de ácidos nucleicos de ARN de y ADN viral. Se aisló un virus desconocido no reportado con anterioridad en este cultivo en México que causa mosaico y moteado amarillo brillante (cálico) en *P. ixocarpa*, al que se denominó preliminarmente como *Physalis Cálico Virus* (PhCav) Este virus no se relaciona serológicamente con ninguno de los virus que se aislaron de tomate de cáscara, ni con otros virus con los que se comparó. El análisis electroforético de ARN viral de doble cadena extraído confirmó la presencia de varios de los virus identificados por otros métodos en tomate de cáscara, pero también se observaron otros ARN de probablemente de virus no descritos con anterioridad en este cultivo.

Los cultivos de calabaza, pepino y melón son afectados por diversas enfermedades de origen viral que se consideran como un factor limitante en su producción. En calabaza y pepino se han encontrado e identificado por serología a los virus mosaico de la Calabaza

(SqMV), CMV y el virus mosaico amarillo del zuchinii (ZYMV) Estos virus se encontraron en calabaza y pepino cultivados en las localidades de Tepalcingo, Yauatepec, Jojutla, Puente de Ixtla, Cuautla, Tepoztlan y Tetecala, muestreadas en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno. EL SqMV fue el virus con una incidencia de 33.7% en primavera-verano y un 31.6% en otoño-invierno. En cambio ZYMV tuvo una incidencia de solo 6.6% de las plantas muestreadas. En cuanto a la incidencia en la especie se observó que la calabaza es más afectada con 40.8% con CMV y 5.8% con ZYMV mientras que el pepino se encontró afectado por SqMV con 26.4%, 19.3% por CMV y con 2% por ZYMV. En cuanto a ciclos de cultivo SQMV y CMV se encontraron en todas las localidades y en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno, y ZYMV solo se encontró en Tepalcingo y en Puente de Ixtla en el ciclo primavera-verano, pero no se detectó en otoño-invierno en ninguna localidad (Aguilar, R. y Lozoya, H., 1994).

Como se puede observar la identificación y caracterización de virus en hortalizas es escasa, a pesar de que se considera que estos están causando año con año grandes pérdidas económicas y son factores limitantes en la producción y cultivo de tomate de cáscara, cucurbitáceas, chile y aun no se ha determinado su efecto en cebolla en donde se han observado ciertos síntomas que indican la presencia de virus.

Algunos de los virus identificados en algunos cultivos son sumamente importantes a nivel mundial y recientemente se ha observado el incremento en daños y distribución del virus, TSWV en tomate y crisantemo, pero potencialmente importante en otros cultivos. Este virus tiene cerca de 600 hospedantes distintos, ubicados en 250 familias botánicas y ha tenido una amplia distribución en el mundo, la cual se ha favorecido principalmente por la distribución de su principal vector el trips *Frankliniella occidentalis* y al parecer por la presencia de variantes del virus, que todavía no han sido caracterizadas en México y que debido a la gravedad de daños que este virus esta causando en otros lugares del mundo ha sido necesario recurrir al análisis molecular de su estructura, para diseñar incluso por ingeniería genética plantas resistentes (Reddy y Wightman, 1988; Goldbach y Peters, 1994; De la Torre *et al.* 1995)

Por otro lado, se ha reportado la reciente aparición y amplia distribución de geminivirus en México principalmente en la región Noreste de la República Mexicana en chile y tomate. En algunos casos se han descrito sus propiedades de transmisión, relación con sus insectos vectores y rango de hospedantes, mientras que otros solo han sido abordados en el ámbito molecular (Morris, 1983a; Morris, *et al.*, 1983b; Dodds, *et al.*, 1984; Valverde, *et al.*, 1990).

3.1 Aislamiento de ácidos nucleicos.

El aislamiento de ARN dc para tejido de plantas y hongos presenta una característica muy importante ya que el ARN dc es muy estable en comparación con el ADN y ARN de cadena sencilla (ARNcs) a la degradación enzimática o por calor. El homogenizado se realiza en un buffer de extracción el cual está diseñado para la desnaturalización de proteínas, sin degradación de ácidos nucleicos, con un pH menor a 7.0 y una alta cantidad de sales para reducir la actividad ribonucleasa. El uso de bentonita, dietilpirocarbonato y/o un ion metálico quelante para reducir la actividad de nucleasas, detergente como el dodecyl sulfato de sodio (SDS) o ácido p-amino salicílico, que es incluido para la desnaturalización de proteínas. La extracción de los ácidos nucleicos se realiza a temperatura ambiente para prevenir la insolubilidad del detergente que se presenta a temperaturas bajas. En algunos casos se han utilizado aditivos como sulfato de polivinilpirrolidona (PVP), mercaptoetanol y dietilditiocarbonato de sodio (DIECA), para prevenir la oxidación de algunos extractos de tejidos, en algunos casos se utiliza fenol y cloroformo/isopropanol, en cuyo caso presenta una buena separación de las fases después de la centrifugación, además de realizar una completa remoción de proteínas de la fase acuosa (Dodds, *et al.*, 1984; Valverde, 1990; Gillings, *et al.*, 1993; German, *et al.*, 1992; Cook, *et al.*, 1994; Fukuhara, *et al.*, 1993).

3.2 Purificación de ARN dc.

Muchos procedimientos se han descrito para la purificación de ARN dc y el estudio de estos. Para la utilización del procedimiento, este debe ser simple y rápido ya que es uno de los objetivos para analizar múltiples muestras y su posterior diagnóstico. Existen diversos métodos para este tipo de aislamientos de ARN dc que resultan ser costosos y el

requerimiento de equipo especializado, estos métodos son desde el uso de centrifugación en gradientes de sacarosa o en un medio de equilibrio el cual no es práctico. La separación por cromatografía usando otros medios como la hidroxihapatita y epíclorohidrina trietanolamina (ECTEOLA) celulosa donde su uso se vuelve un complicado protocolo de elusión. La degradación con enzimas de ARN es y DNA han sido utilizadas, teniendo la precaución y confirmando la pureza de las enzimas y posteriormente utilizando cromatografías se fraccionan y separan para analizar los ácidos nucleicos, estos posteriormente se ha demostrado que precipitan el ARN dc en 4 M cloruro de litio y solubilizado posteriormente en 2 M de cloruro de litio,. Por lo que el procedimiento requiere de tiempos de incubación y considerable manipuleo de ARN dc obtenido hasta su posterior uso de análisis electrofóretico. El método de cromatografía de columna con dietilaminoetil (DEAE) celulosa, utilizado en este trabajo requiere una inversión mínima comparativamente y un manejo de muestras múltiples para su análisis el cual disminuye los tiempos para la obtención de resultados.

3.3 Detección y análisis de ARN dc.

Para la detección de ARN dc existen diferentes técnicas y métodos dentro de las que se encuentran: Las pruebas serológicas que consisten en utilizar antiseros específicos para el ARN dc el cual debe ser purificado e inoculado en un organismo para obtener dicho anticuerpo. Esto representa cierta desventaja ya que no pueden identificarse más que solo a aquellos que presentan zonas homólogas, lo que reduciría a solo unos cuantos el número de identificaciones. Este tipo de pruebas se realiza con extractos de plantas que presenten síntomas, aplicando una prueba de doble difusión en agar. Existen otras pruebas serológicas como son ELISA, y que se basa en la presencia o ausencia de ARN dc en plantas. Es importantes este tipo de pruebas para infecciones que causen pérdidas importantes o bien para detecciones a tiempo de la sospecha de un virus en particular. También se utilizan enzimas de digestión para reconocer ARN dc ya que están son resistentes a ARNasas pancreáticas A y B bajo ciertas condiciones de concentración de sales, por lo que el tratamiento controlado de ARNasa en muestras de ARN dc en buffer que contengan NaCl 0.3M para su posterior uso en geles de electroforesis confirmarían la presencia de ARN dc dentro de la preparación. Este procedimiento requiere de remover la RNAasa y proteasa K así como el fenol de extracción que se utiliza para su degradación, y dejar el ARN limpio.

Existen métodos biológicos los cuales consisten en aislar las formas replicativas para infecciones virales de ARN en animales infectados, por lo que se ha mencionado el aislamiento para ARN de en muestras de plantas, por lo que en este caso no es necesario un método de detección que se tenga que contar previamente para su presencia, este tipo de sistema biológico puede dar una concentración relativamente buena para las moléculas purificadas. En comparación con otras pruebas, este método puede indicar la infección por diferentes virus (Walkey, 1991).

El método de hibridación esta basado en la transferencia de los ácidos nucleicos a una membrana inerte en donde se usa un ARN específico para la identificación de ARN de y con ciertas condiciones hibridizan las cadenas complementarias o segmentos homólogos, este método es una forma de detección rápida pero muy específica. El ARN que se usa como molde se encuentra marcado por isótopos radioactivos y actualmente por métodos no radioactivos, por lo que la sensibilidad de este método es mayor (Walkey, 1991).

Por ultimo la técnica más reciente es la de clonación en donde se utiliza la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR), la cual consiste en amplificar de cadenas de ácidos nucleicos y la fácil producción de pruebas específicas usando técnicas de ensayo dot-blot/ dot-spot y souther blot, así mismo el uso de diversas técnicas de biología molecular (Walkey 1991).

3.4 Otras aplicaciones del uso de aislamiento de ARN de.

El diagnóstico por ARN de puede aplicarse para demostrar la presencia de virus en cultivos en donde es importante este tipo de trabajos por ser un método rápido para la identificación de virus, o bien puede ser utilizado par certificar la producción de plantas por cultivos de tejidos *in vitro*, por último esta técnica se puede aplicar a hongos los cuales también pueden estar involucrados como vectores de transmisión de enfermedades virales.

Celix *et al*, en 1996 realizaron un análisis de la extracción de ARN de y compararon la secuencia del cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), con un Random ADNc clonado de ARN de y un virus específico clonado de ADNc, obteniendo una homología

del closterovirus transmitido por *Bemisia tabaci*, y el closterovirus transmitido por áfido, con lo cual se reconoce que CYSDV es un miembro del subgrupo de closterovirus con genoma bipartita.

La detección de ARN de a sido usada como una forma en que realiza una actividad enzimática como lo menciona De Graaft *et al* (1995), en la actividad de ARN-dependiente de ARN-polimerasa para el virus del mosaico de la alfalfa. Rezaian *et al.* (1991), observaron que la presencia de ARN de indica un origen viral asociados a numerosos virus que infectan cultivos de uva y provocan el enrollamiento de hojas.

Por otro lado, las infecciones de Cucumber Mosaic Virus (CMV) en presencia de CARNA5 han sido caracterizadas por una acumulación de virus satélites de forma de cadena doble. García-Luque en 1986 reportó el aislamiento y la parcial caracterización de anticuerpos monoclonales (Mab), los cuales reconocen única y específicamente la presencia y conformación determinada en CARNA5 cd en asociación con el CMV. La habilidad de anticuerpos específicos para varios ARN de de moléculas de virus biológicos contribuye al análisis de la organización macromolecular y función en los procesos replicativos virales.

Dodds en 1985 y su equipo mencionan dos viriones de ARN doble cadena que pueden separarse y distinguirse por electroforesis en geles de poliacrilamida, mencionan también que la acumulación de estos ARN de disminuye en su concentración de viriones en los cambios infecciosos de RNA usando partículas de virus inoculados en las plantas.

Stephen y colaboradores en 1983 mencionan la utilización de técnicas rápidas y sensibles como la hibridación por dot blot para detectar ARN específico en preparaciones de extracto crudo de ácidos nucleicos o con la clarificación de savia de plantas. Este método se ha utilizado para identificar y detectar ARN de virus vegetales o agentes parecidos a virus en tejido de plantas hospederas, la extracción podría detectarse solo a partir de purificaciones de ARN de doble cadena para realizar y obtener ADNc.

3.5 Localización celular de ARN dc.

Se ha observado que la infección de virus produce cambios característicos en la alteración y cambios citológicos principalmente en la periferia de ciertos organelos en donde desarrolla vesículas en la periferia de cloroplastos, mitocondrias, núcleos, tonoplasto y otras estructuras membranosas. Estas estructuras presentan material fibrilar lo que sugiere es inducido por ácidos nucleicos de cadena doble, dado que estas estructuras membranosas contienen el ARN del virus en su forma replicativa y por lo que provoca los síntomas de la enfermedad.

En los Estados Unidos se realizaron estudios preliminares con partículas virales asociados con plantas de Chile Jalapeño y la presencia de ARN dc se describen algunas propiedades de este virus al cual se le asignó el nombre de Pepper Cryptic Virus-1 (PCV-1) y se utilizó un ARN dc en estudios moleculares de hibridación, en donde secuencias similares confirmaron la presencia de ARN dc de otro posible virus críptico reportado en Hungría. (Arancibia *et al.* 1994)

En la Universidad de California se realizaron estudios etiológicos, en donde utilizaban ARN doble cadena (ARN dc), para estudios de detección de enfermedades vegetales más comunes, donde los ARN dc fueron utilizados como indicadores para la detección de virus vegetales y confirma en 250 individuos de plantas de aguacate los cuales fueron puestos a prueba, resultando solo 22 de ellos sin presencia de ARN dc, además de detectar tres diferentes virus con respecto a los patrones de ARN dc, por lo que presumiblemente sean de origen de las formas replicativas de virus de ARN cadena sencilla o de los genomas de virus de ARN dc. Además, mencionan que los resultados sugieren que el virus de Aguacate se encuentra en muchos otros cultivares de Aguacate y puede ser transmitido por injerto y también por semilla en un alto rango. (Jordan, *et al.* 1983)

Por último el uso de ARN dc ha sido utilizado como una nueva herramienta en la ayuda para la detección de virus en Aguacate, por lo que podría utilizarse para estudios de etiología viral en aquellas plantas que se cree que presentan una enfermedad causada por virus.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Área de estudio.

Se seleccionaron diferentes localidades de las áreas productoras de hortalizas en los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos. Los principales cultivos presentes en estas localidades fueron el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.), tomate rojo (*Lycopersicon esculentum* M.), chile (*Capsicum annuum* L.), cebolla (*Allium sativa* L.) y rábano (*Raphanus vulgaris* L.).

En el estado de Puebla se seleccionó a la localidad de Atlixco, Puebla, que se encuentra ubicada entre los 18° 54' y 18° 55' N y 98° 27' y 98° 28' W, presentando geología de tobas volcánicas, con uso de suelo y vegetación de agricultura de riego, cultivos permanentes, cultivos anuales y cultivos semipermanentes.

En esta zona se cultiva el maíz bajo riego y temporal, alpiste (*Melanophryniscus montevidensis* L.), cebolla, cilantro (*Coriandrum sativus* L.), apio (*Apium graveolens* L.), hierbabuena, alfalfa (*Medicago sativa* L.) y diversas especies de flores. La producción de maíz alcanza los 1500 Kg/Ha, frijol 300 Kg/Ha, tomate 700 Kg/Ha, alfalfa 24000 Kg/Ha, también se cultiva el aguacate, la calabaza y el huanzontle. El control de plagas se realiza con insecticidas y acaricidas como el folidol y funguicidas como el denominado 605., reportándose como principales plagas la gallina ciega, gusano cogollero, conchuela, chahuixtle y hongos entre los más conocidos.

Otra localidad seleccionada en el Estado de Puebla fue el municipio de Tecamachalco ubicado entre los 18° 45' y los 19° 00' N y los 97° 30' y 98° 00' W a una altitud de aproximadamente 2300 msnm. El muestreo se realizó en las localidades de Quecholac, Palmarito, Palmar, Sta Rosa y Col. Guadalupe. En su aspecto geológico esta región presenta un origen de roca sedimentaria y vulcano sedimentaria y estructura arenisca. El suelo en general presenta un límite de 19 a 100 cm, con una textura media/gruesa mólico. El uso del suelo fundamentalmente agrícola de riego, temporal y anual y entre las especies que se cultivan se encuentran el maíz, frijol, jitomate, tomate de cáscara, chile, zanahoria, col, lechuga, cebolla alfalfa, trigo.

En el Estado de México se muestrearon parcelas en el municipio de Texcoco, el cual se encuentra localizado entre los 19° 30' y los 19° 35' N y a los 98° 40' y 98° 55' W a una altitud aproximada de 2600 msnm, la geología en la región es de origen Lacustre-Aluvi3n, de origen de roca sedimentaria y suelo con un uso agr3cola de riego, anual y cultivos semipermanentes, destacando entre estos el cultivo de ma3z, jitomate, tomate de c3scara, chile y otras hortalizas.

En el Estado de Tlaxcala parcelas que se encuentra ubicado a los 19°15' y 19° 21' N y los 98° 00' y 98° 15' W y una altitud de 2300 msnm, su geología consta de roca 3gnea y toba andes3tica con suelo de tipo cambisol, histisol y feozem de textura gruesa y media y una fase f3sica gravosa, el uso de suelo agr3cola destacando los cultivos de ma3z y en menor proporci3n cultivos de hortalizas como son el chile poblano y jitomate principalmente.

En el estado de Hidalgo se muestrearon parcelas en el municipio de Actopan Hidalgo que se localiza a los 20° 15' y 20° 23' N y los 98° 55' y 99° 05' W y una latitud de 2000 msnm El suelo es de tipo aluvial con un uso de suelo agr3cola, destacando cultivos de chile, jitomate y tomate de c3scara.

En el estado de Morelos se muestrear3n parcelas de calabaza y jitomate en el municipio de Yautepec, que se encuentra localizada a los 18° 39' y 18° 41' N y los 99° 11' y 99° 13' W a una altitud de 920 msnm, con clima c3ldo subh3medo con lluvias en verano, temperatura promedio entre los 17.7-22.4 °C, y como principales cultivos: caña de az3car (*Saccharum officinarum*), arroz (*Oryza sativa*), ma3z (*Zea mays*), cacahuete (*Citrullus lunatus*).

4.2 Material biológico.

Se colectó material fresco consistente de hojas y tallos de plantas con síntomas de probable origen viral de tomate de cáscara, (*Physalis ixocarpa* B.), tomate rojo (*Lycopersicum esculentum* M.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y diferentes variedades de chile (*Capsicum annum* L.), principalmente de las variedades ancho y serrano, entre otras las cuales fueron colectadas en el período de mayo a septiembre de 1997 en los diferentes Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos.

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y fueron trasladadas al laboratorio en donde se realizaron sus análisis respectivos. Los muestreos se realizaron cada mes para cada una de las zonas de muestreo

4.3 Extracción de ácidos nucleicos.

La extracción y el análisis de ARN de doble cadena viral de muestra de tejido vegetal se realizó utilizando el protocolo propuesto por Valverde *et al.*, (1990), con algunas modificaciones.

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó la parte foliar de plantas colectadas en parcelas comerciales de los Estados ya mencionados en donde se seleccionaron aquellas que presentaron daños por posibles enfermedades virales así como aquellas que no presentaron daños tomando estas últimas como posibles plantas sanas.

Para cada una de las muestras se procesó una cantidad de 3.5 g y se homogeneizó en 8 mL de Buffer STE 1X (10X 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA pH 6.8), 1mL SDS 10%, 0.5 mL 2% bentonita y 9 mL de Buffer STE 1X saturado de fenol. El homogeneizado se agitó por 30 minutos y centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos en una centrifuga refrigerada. La fase acuosa se recuperó y mezcló con 2.1 mL de etanol al 95% almacenándola toda la noche a 4° C.

4.4 Separación de ARN de doble cadena (ARN dc) por cromatografía en celulosa.

Para separar el ARN dc se llevaron a cabo dos ciclos de cromatografía en fibra de celulosa CF-11 (Sigma) para eliminar todo el ARN cs, ADN, polisacáridos y proteínas contaminantes del hospedante, para lo cual se tomó 1g de celulosa suspendida en 25 mL de 1X STE-etanol 16% (v/v), vertiendo la solución en columnas previamente taponadas con un disco de papel filtro, permitiendo el drenado del líquido. Una vez preparada la columna se adicionó la muestra, dejando eluir todo el buffer, esto a temperatura ambiente. La columna se lavó con 40 mL de 1X STE-etanol 16%, se recuperó el ARN dc de la muestra adicionando 10 mL de buffer 1X STE, colectando completamente el líquido y adicionándole 2.1 mL de etanol a 95%. Se homogenizó y realizó una segunda columna. El ARN dc fue separado con 10 mL Buffer STE 1X de la segunda columna se colectó en tubo de 50 mL para centrifuga (sorvall) que contenía 20 mL de etanol absoluto y 0.5 mL de acetato de sodio 3.0 M (pH 5.5), almacenados a -20 °C durante dos horas para precipitar el ARN dc. Después se centrifugó a 10 000 rpm por 25 minutos en centrifuga refrigerada, desechando el sobrenadante por decantación suave y dejando secar los tubos a 37 °C por 30 minutos, para finalmente resuspender el ARN dc con 200 µL de agua bidestilada estéril recuperando y almacenando el ARN dc para su posterior análisis por electroforesis.

4.5 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se aislaron e incrementaron varios virus conocidos en plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa* y *Capsicum annuum*, de donde se obtuvo ARN dc viral para utilizarse como marcadores de peso molecular. Los ARN dc que se obtuvieron con pesos moleculares de ARN cd fueron los del virus mosaico del pepino (CMV. 2.3, 2.0, 1.4 y 0.5 x10⁶ Da); mosaico del tabaco (TMV. 4.2, 2.1, 0.95, y 0.42 x10⁶ Da), X de la papa (PXV. 5.0, 4.6, x10⁶ Da), Criptico del chile 1 (PCV-1 0.97 x10 y 0.85 x 10⁶ Da) y Jaspeado del Tabaco (TEV). Los controles negativos fueron preparados de extractos de plantas sanas de *N. tabacum* cv. *rustica* y *P. ixocarpa*.

El ARN dc se separó por electroforesis en poliacrilamida (6%), utilizando un minigel (1mm x 7 cm x 8 cm), montado en una cámara fabricada en el T.E.L.E. (Taller de equipo de laboratorio y electrónico) de la UNAM FES-Iztacala. El volumen del extracto de ARN

de, viral y de testigos fue de 40 μL por muestra y en algunos casos hasta de 55 μL dependiendo de la concentración a la que se encontraban y al volumen máximo que permitía la carga de muestra. Las condiciones en las que se corrió la electroforesis fue de 100 volts por 1:45 hrs a temperatura de laboratorio. La técnica de tinción utilizada para los geles fue la de tinción rápida de plata (Harris y Angal, 1992).

4.6 Determinación de pesos moleculares de ARN dc.

El calculo de los pesos molecular de cada una de las bandas separadas y observadas en los geles de poliacrilamida se realizó en un digitalizador de imágenes Alpha Innotech Corporation Modelo TM-20 U.S.A. y el software Alpha Imager Version 2000, el cual presenta un sistema de documentación y análisis de imagen, utilizando como referencia los estándares de ARN dc de CMV, ARN satélite y TMV, se tomaron las muestras representativas de cada sitio y especie de planta para realizar dichos análisis obteniendo el numero de bandas y pesos respectivos.

El análisis de los cálculos realizados para obtener el FR y peso molecular de cada una de las bandas separadas y observadas en los geles de poliacrilamida, usando como referencia los estándares de ARN dc de CMV, RNA satélite y TMV. De las muestras representativas de cada sitio y especie de planta se presentan en los cuadros 9-14 (ver apendice I).

Las graficas radiales se realizaron en el programa Exel versión 2000 de MS office.

V. RESULTADOS.

Especies colectadas y síntomas en campo.

Se colectó un total de 295 muestras en los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos. Las especies de cultivos colectadas fueron 54 muestras de tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) variedad "Rendidora"; 12 muestras de Gladiolo (*Gladiolus sp.*); 6 tipos o variedades de chile (*C. annuum*) (29 muestras del tipo "Poblano", 8 del tipo "Jalapeño", 1 del tipo "Tampico", 8 del tipo "Parabólica", 6 de "Serrano" y 5 del tipo "Loco". De maíz se colectaron 33 muestras; 29 muestras de calabaza (*Cucurbita pepo*), 64 muestras de jitomate (*L. esculentum*), 8 muestras de haba (*V. faba*), 2 muestras de Alfalfa (*Medicago sativa*), 8 muestras de frijol (*P. vulgaris*), 2 muestras de crisantemo, 1 muestra chilacayote y 2 muestras de una planta ornamental (Cuadro 1).

La mayoría de las plantas que se colectaron presentaron síntomas que se atribuyeron a los causados por virus. Los síntomas observados se registraron y se incluyen en el Cuadro 3. En el caso del estado de Puebla se seleccionaron tres localidades, considerando la importancia de la extensión y la producción de hortalizas, entre las que se encuentra Atlixco, Tecamachalco y Sn Martín Texmelucan, los síntomas observados más característicos en campo fueron el amarillamiento en muestras de chile (figura 1 B) de la localidad de Atlixco Pue., moteado clorótico y mosaico en chile (figura 1 A y C), deformación de la hoja en muestras de calabaza (figura 1 D).

Se observó en los recorridos de campo diversos síntomas de probable origen viral como mosaicos, amarillamientos y malformación en diferentes tipos de plantas (figura 2).

Un síntoma observado en chile en el Estado de Puebla y denominado como "enanismo" el cual consiste en una reducción del tamaño de la planta. Regularmente el enanismo es asociado con enfermedades de origen viral, aunque este no pueda ser detectado. Muchos virus afectan a la planta hospedante acortando la longitud de los entrenudos o reduciendo el tamaño de las hojas, impidiendo así el crecimiento de la planta entera como en las muestras de chile (figura 2 B y C).

El enrollamiento foliar en plantas de chile se presentó con cierta frecuencia. En estos casos la infección de virus da como resultado el crecimiento anormal de las capas epidérmicas de la hoja. (figura 2 A y D). En calabaza se observó un desarrollo anormal de las hojas por lo que se observaron distorsionadas en muestras de calabaza y chile (figura 1-D, 3-D, 6-D).

Cuadro 1. Número total de muestras colectadas en los cinco estados, así como el número de especies por sitio y por especie de planta. Todas las muestras presentaron síntomas de probable origen viral.

	Tlaxcala Tlax.	Texcoco Edo Méx	Atlixco Pue.	Tecamachalco Pue.	Sn. Martín Pue.	Actopan Hgo.	Yauhtepec Mor.	TOTAL de muestras por especie
<i>Especie</i>								
<i>P. ixocarpa</i>	12	18	22	1	-	1	-	54
Gladiolo	4	-	8	-	-	-	-	12
<i>C. annuum</i> var. Poblano	15	-	2	2	10	-	-	29
Ornamental	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>Z. mayz</i>	2	26	5	-	-	-	-	33
<i>C. pepo</i>	1	15	-	8	-	-	5	29
<i>L. esculentum</i>	-	36	4	-	-	8	16	64
<i>Vicia faba</i>	-	-	8	-	-	-	-	8
<i>Medicago</i> <i>sativa</i>	-	-	2	-	-	-	-	2
Maleza	-	-	13	-	-	-	-	13
<i>C. annuum</i> . Var. jalapeño	-	-	8	-	-	-	-	8
<i>P. vulgaris</i>	1	-	2	-	2	-	3	8
<i>C. annuum</i> var. Tampico	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>C. annuum</i> var parabólica.	-	-	-	-	-	8	-	8
<i>C. annuum</i> var serrano.	-	-	-	-	-	6	-	6
<i>C. annuum</i> var loco.	4	-	1	-	-	-	-	5
Crisantemo	-	-	2	-	-	-	-	2
Chilacayote	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>L. nepetifolia</i>	-	-	3	-	-	-	-	3
<i>Cucumis</i> <i>sativus</i> Pepino	1	-	-	-	-	-	6	7
TOTAL de muestras por sitio	42	95	81	11	12	24	30	295

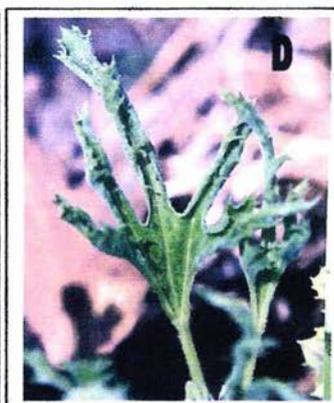
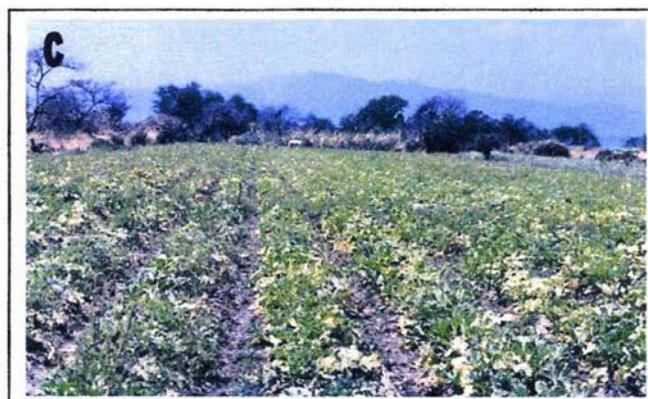
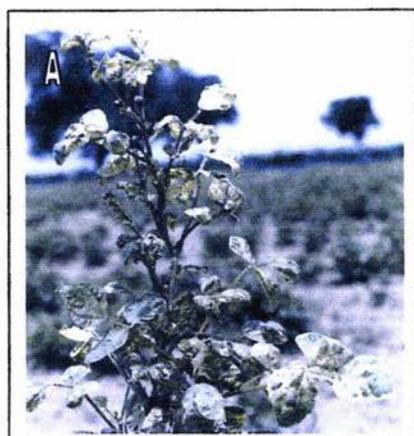


Fig 1. Muestras colectadas en campo correspondiente a chile y calabaza. A) Síntomas de mosaico en muestras de chile del Estado de Puebla, B) Comparación de plantas colectadas en Atlixco Pue., con síntomas de virosis y planta sin presencia de síntomas (aparente sana), C) Cultivo de calabaza del Estado de Puebla con amarillamiento y distorsión de hojas D) Síntoma Mano de chango característico de infección viral en muestra de calabaza.

Cuadro 2. Principales síntomas observados en campo para cada especie y por localidad.

<i>Especie</i>	SINTOMAS EN MUESTRAS POR LOCALIDAD						
	Tlaxcala Tlax.	Texcoco Edo Méx	Atlixco Pue.	Tecamachalc o Pue.	Sn. Martín Pue.	Actopan Hgo.	Yautepec Mor.
<i>P. ixocarpa</i>	En, Ench, Am, Mo, Cl, C, NS		NS, M, Ench, C, Lln, Cl,	En, Ench.		C	
Gladiolo			M				
<i>C. annuum</i> var. poblano	Ench, M, Am, Cur, ACI, En, C, Clb, Amln, MoCl, NS, MBA		En, Ench, Lln, M,	Am, Lln	NS, En, Am, Ench, Lln, Amln, Mcl		
Ornamental							
<i>Z. mayz</i>			NS, Am, RaF, Proj				
<i>C. pepo</i>		Am					Macha
<i>L. esculentum</i>		Ench, NS, M, Cur,	NS, Cl, Lln, Ench, M, Arr, Amln,	NS, C, Am, Mo, En, Ench, Lln		Cl, NS, Am, C, En, Lln, Ench, MoCl.	M, Ench
<i>Vicia faba</i>			M, Am				
<i>Medicago sativa</i>			M				
Maleza			NS, M,				
<i>C. annuum</i> Var. jalapeño			Cur, M, Cl, Mch, NS, Mo, MoCl, Am, En				
<i>P. vulgaris</i>	Ench, Cl		Ench, Lln		Mcl, Lln, NS		M, Am
<i>C. annuum</i> var. Tampico						NS	
<i>C. annuum</i> var parabólica.						M, En, Am, Ench, Lln	
<i>C. annuum</i> var serrano.						Mch, Arr, En, NS, C, MoCl, Ench,	
<i>C. annuum</i> var loco.	Mch, En, Amln, M, Cl, Ench, Lln,		C, Am, Mo,				
Crisantemo			M				
Chayote							
<i>L. nepetifolia</i>			Mcl, Am, M, MoCl, C,				
<i>Cucumis sativus</i>							M, Ench

NS= No síntomas, M= mosaico, Ench= Enchinamiento, Lln= lesiones locales necroticas, C= cálico, Cl= clorosis, En= enanismo, Am= amarillamiento, Mo= moteado, Cur= Enrollamiento, ACI= anillos cloróticos, Clb= clorótico blanco, Amln= amarillamiento intervenla, MoCl= moteado clorótico, MBA= mosaico blanco-amarillo, Mch= marchitamiento, RaF= rayado fino, Proj= Pigmentación rojiza, Arr=arrocetamiento, Mcl= mosaico clorótico, Macha= mano de chango.

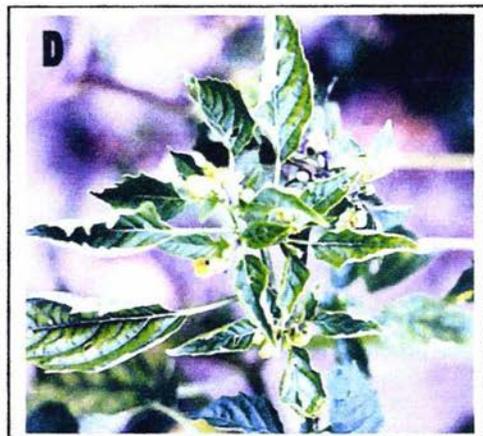


Fig 2. Principales síntomas presentes en muestras de chile en el estado de Puebla, A) Enrollamiento de hoja, B) Enanismo y mosaico clorótico, C) Enanismo y marchitamiento y D) enrollamiento y amarillamiento de hojas.

Un síntoma frecuente observado en todas las localidades muestreadas, fue una pérdida de color en las hojas, este tipo de síntomas es conocido como clorosis, es un síntoma que esta normalmente asociado con muchas enfermedades virales. Una variante de este tipo de síntoma es la clorosis intervenal en donde los síntomas de clorosis normalmente empieza entre las venas de la hoja, posteriormente la clorosis se extiende al resto de la hoja como se observó en muestras de calabaza del Estado de Morelos (figura 3 B y C). En algunos casos la clorosis empieza en las puntas de las hojas y progresa con el tiempo al resto de la misma, otro síntoma es el de clorosis intervenal y apical que se presentó en jitomate del Estado de Morelos (figura 4 D).

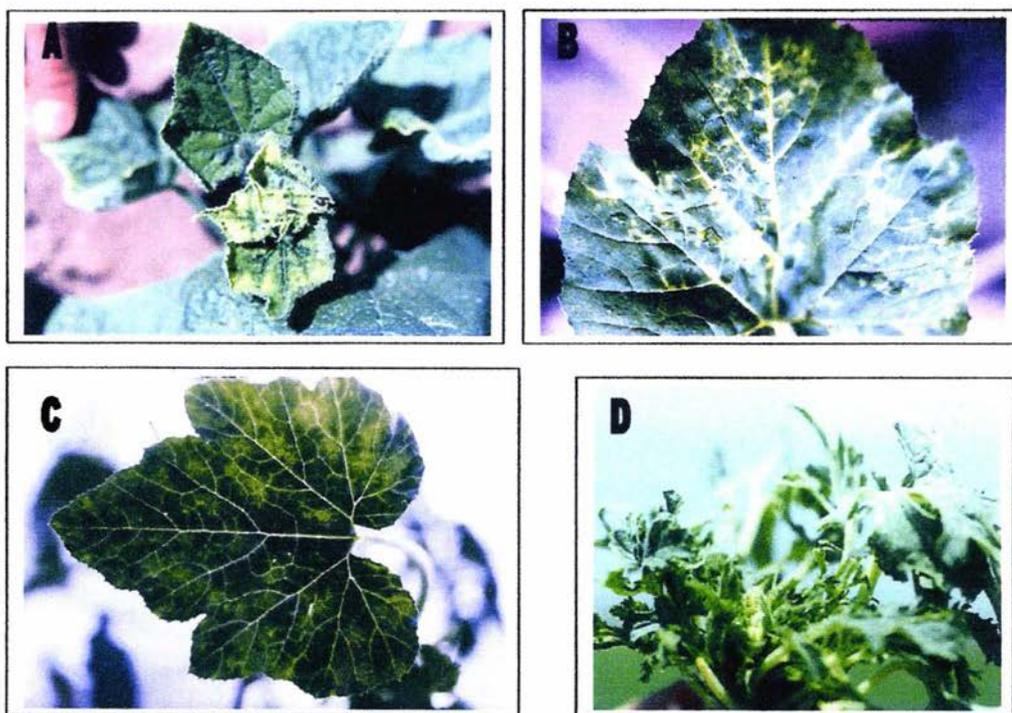


Fig 3. Muestras de la localidad de Morelos correspondientes a cultivos de calabaza en donde presenta, A) Moteado clorótico, B) clorosis de la nervadura, C) Mosaico clorótico y D) deformación de la hoja.



Fig 4. A) vista panorámica de cultivo de jitomate (*L. esculentum*) Edo de Morelos , B) planta aparente sana, C) marchitamiento y necrosis de la punta de hojas y D) presencia de puntas amarillas síntoma característico de viroide.

En gladiolo se observaron bandas o rayas de color amarillo, las que al coalescer causan clorosis generalizada de las hojas (figura 5 A y B).

En algunas localidades fue común observar zonas de tejido muerto o necrosis general. En algunas enfermedades virales la necrosis de tejido de las hojas sigue inmediatamente a la clorosis. Esta da como resultado la muerte de estos tejidos y un decaimiento en el vigor general de la planta (figura 6 C).

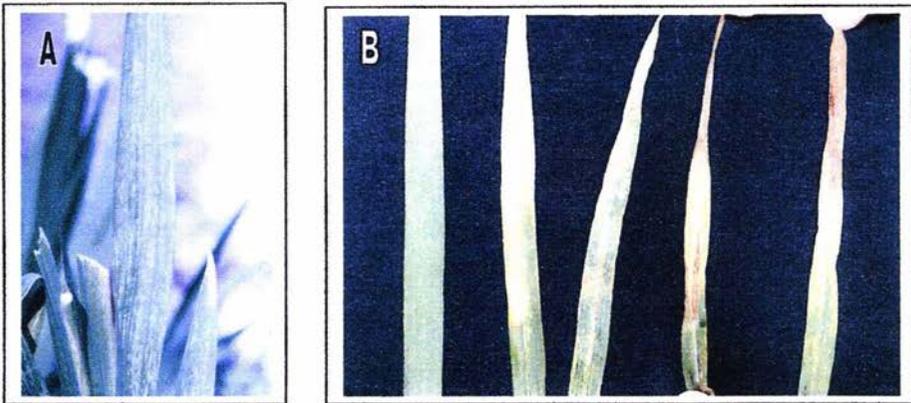


Fig 5. Muestras pertenecientes a gladiolo la figura A) presenta un rayado fino longitudinal en la hoja y B) cuando los síntomas son mas evidentes el rayado forma un mosaico e inicio de necrosis de la hoja se puede observar los diferentes grados de daños que puede alcanzar en la planta.

Una considerable cantidad de especies y en prácticamente todos los sitios mostraron en mayor o menor grado una apariencia de mosaico, el cual se refiere a síntomas en donde células de algunas áreas se infectan y se decoloran, mientras en otras no sucede lo mismo. Las zonas infectadas normalmente aparecen de color verde pálido, amarillo o blanco, al mismo tiempo que las células de las áreas adyacentes permanecen verdes (figura 1-A, 3-A, 6 A y B, 7-B).

Por último, otro de los síntomas comunes presentados en las muestras causados por enfermedades virales, fue la presencia de anillos concéntricos en las hojas y a veces en los frutos (figura 7 C). Cuando el área enferma está restringida a un anillo o anillos de células infectadas, este síntoma es denominado mancha anular. Las manchas anulares

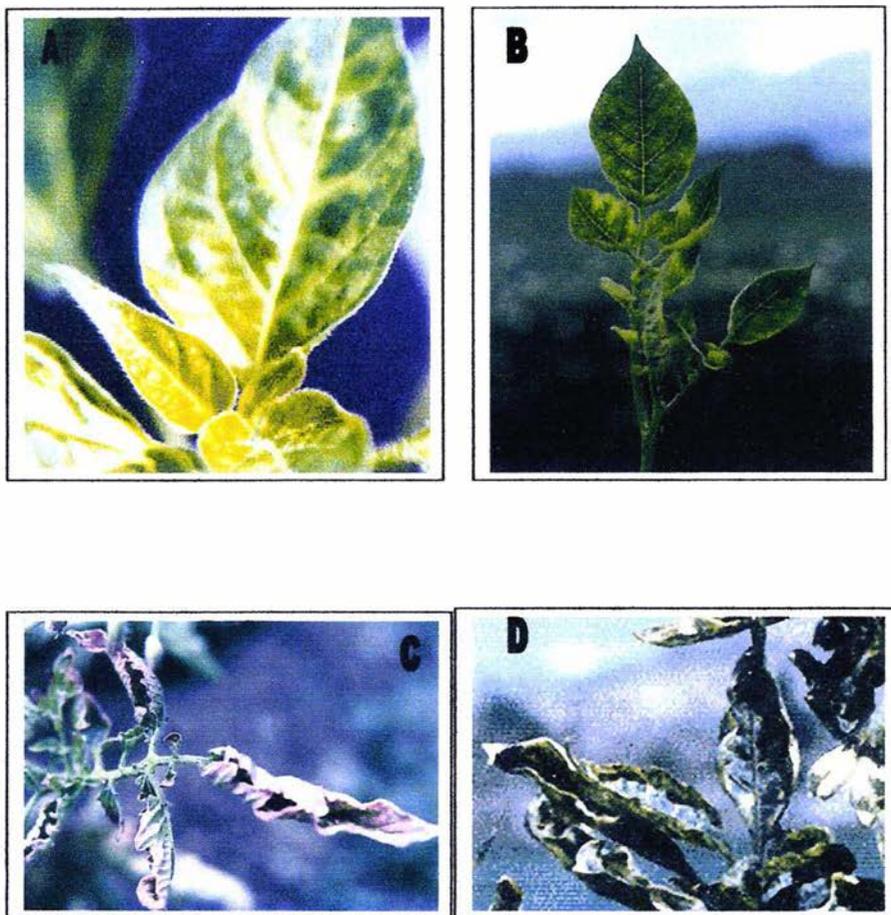


Fig 6. Síntomas presentes en cultivos de chile provenientes de campo A) presencia de mosaico clorótico de hojas, B) moteado clorótico, C) necrosis de hojas y D) deformación de hojas.

frecuentemente aparecen en hojas y pueden presentarse en forma concéntrica con líneas amarillas. Este tipo de síntomas también llega a presentarse en las áreas foliares en forma de anillos necróticos, las manchas de anillos resulta de la muerte de una capa superficial de células dando una apariencia de grabado. Estos son llamados anillos necróticos y se componen de un anillo o de varios anillos concéntricos de tejido necrótico.

Otra anomalía en hojas fue un engrosamiento de las mismas, es conocido como “rugosidad” o “enchinamiento”.”(figura 7 B).

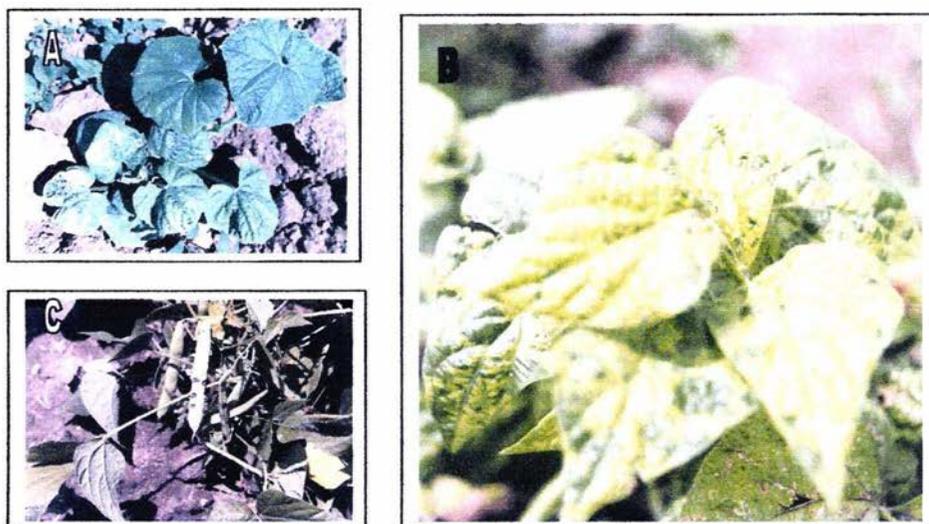


Fig 7. Síntomas observados en campo de muestras de frijol. A) Deformación de hojas y mosaico clorótico, B) Mosaico clorótico intenso de hojas y C) Anillos necróticos presente en vaina de los frutos.

Análisis electroforéticos de ARN dc en hortalizas colectadas por localidad.

LOCALIDAD ATLIXCO PUEBLA

Los análisis electroforéticos de las muestras colectadas en Atlixco, Pue., mostraron bandas correspondientes a ARN dc lo que indicó la posible presencia de infecciones virales

En muestras de *P. ixocarpa*, analizadas por electroforesis se observaron patrones electroforéticos de 1 banda en 8 muestras con un peso molecular de 4×10^6 Da; de 2 bandas en 12 muestras con pesos moleculares de 1.33 y 0.87×10^6 Da y de 3 bandas en 2 muestras con pesos moleculares de 1.33, 0.99 y 0.87×10^6 Da (Figura 8-A, 8-B y 8-H).

En las muestras de gladiolo se encontró un patrón electroforético de 3 bandas con los pesos moleculares de 2.3, 1.4 y 0.7×10^6 Da, en 3 de las 8 muestras analizadas (figura 9-C y 9-D).

En crisantemo se observaron 2 patrones electroforéticos de 2 bandas de 2.61, 2.46 y 1.28, 1.13×10^6 Da respectivamente.

En las variedades de chile analizadas se presentó en la variedad poblano, 2 patrones electroforéticos de 3 y 4 bandas con pesos moleculares de 2.2, 0.99, 0.97 y el otro 2.2, 1.33, 0.99 y 0.87×10^6 Da respectivamente, en la variedad loco se observó un patrón electroforético de 4 bandas de 2.38, 1.27, 1.18 y 1.10×10^6 Da y una ausencia de bandas en el caso de la variedad jalapeño (figura 9-I).

La muestra correspondiente a chilacayote presentó 3 bandas en el patrón electroforético de 2.86, 2.19, 1.91×10^6 Da.

La muestra de *L. nepetifolia* utilizada como marcador presentó el patrón característico de TMV 4.2×10^6 Da, CMV (Carna5) 2.3, 2.0, 1.4, 0.5×10^6 Da y ARN satélite con peso molecular de 0.2×10^6 Da.

En los cultivos restantes correspondientes a maíz, haba, alfalfa, chile variedad jalapeño y frijol, no se observó la presencia de bandas de ARN dc (Cuadro 3).

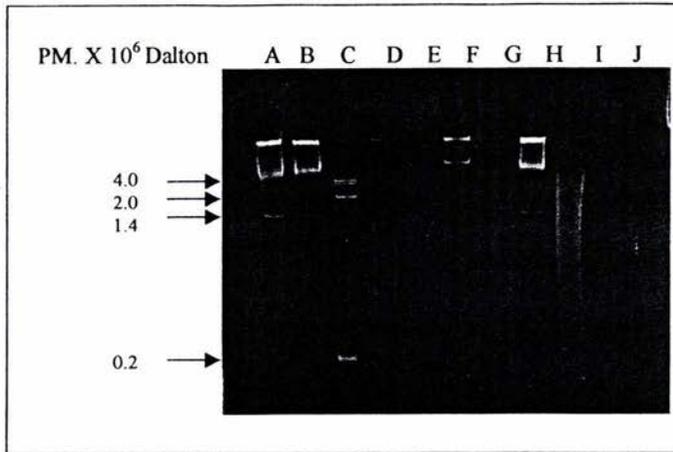


Figura 8. Purificación ARN de en muestras de Atlixco Puebla. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con cámara polaroid. A) Tomate de cáscara., B) tomate de cáscara., C) *L. nepetifolia.*, D) PhyMV., E) Tomate de cáscara síntoma cálico., F) Muestra con BEMV., G) Tomate de cáscara síntoma cálico., H) Tomate de cáscara síntoma cálico., I) PhyMV., J) Vacío.

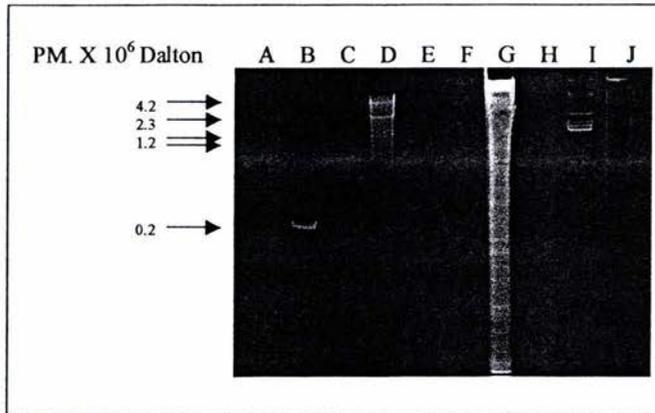


Figura 9. Purificación ARN de en muestras de Atlixco Puebla. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con cámara polaroid. A) gladiolo B) *Leonotis nepetifolia*, C) Gladiolo, D) gladiolo, E) *Leonotis nepetifolia*, F) Tomate de cáscara (*P. ixocarpa*), G) *Datura estramonium*, H) Tomate de cáscara (*P. ixocarpa*), I) Chile (*C. annuum*) y J) TSWV.

Cuadro 3. Número de bandas correspondientes a los patrones electroforéticos obtenidos y sus respectivos pesos moleculares encontrados en las muestras del Estado de Puebla.

Muestras localidad	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da aproximado	No. De muestras
Atlixco Pue.	1	4.0	8/22
	2	1.33, 0.87	12/22
	3	1.33, 0.99, 0.87	2/22
Gladiolo	0		5/8
	3	2.3, 1.4, 0.7	3/8
<i>C. annumm</i> var Poblano	3	2.2, 0.99, 0.97	1/2
	4	2.2, 1.33, 0.99, 0.87	1/2
<i>Zea maíz</i>	0		5/5
<i>Lycopersicum esculentum</i>	1	4.0	1/4
	1	1.33, 0.99, 0.87	1/4
	2	4.0, 1.33, 0.99, 0.87	2/4
<i>Haba</i>	0		8/8
<i>Alfalfa</i>	0		2/2
<i>Maleza</i>	0		13/13
<i>C. annumm</i> var. jalapeño	0		8/8
<i>P. vulgaris</i>	0		22
<i>C. annumm</i> var. loco	4	2.38, 1.27, 1.18, 1.10	1/1
<i>Crisantemo</i>	2	2.61, 2.46	1/2
	2	1.28, 1.13	1/2
<i>Chilacayote</i>	3	2.86, 2.19, 1.91	1/1
<i>L. nepetifolia</i>	5	2.3, 2.0, 1.4, 0.5, 0.2	2/3
	5	4.2, 2.3, 2.0, 1.4, 0.5	1/3

Para realizar una comparación de las bandas de ARN dc presentes en cada especie y compararlas entre estas, se realizó una grafica radial, en donde cada eje representa una especie, la escala de los ejes esta dada en Da X10⁶.

En esta comparación, como se muestra en la figura 10, las bandas de 4.0 X10⁶ Da se encontró en muestras de tomate de cáscara y jitomate.

Se observaron bandas de ARN dc con pesos aproximados a 2.4 X10⁶ Da en muestras de crisantemo, chile variedad poblano y loco

Los ARN dc de 2.3 X10⁶ Da aproximadamente, se encontró en muestras de chile variedad poblano, gladiolo y jitomate,

En el caso de bandas con pesos moleculares de aproximadamente 2.2 X10⁶ Da en muestras de chile tipo poblano y en la muestra de chilacayote.

La banda de ARN dc con peso aproximado de 1.3×10^6 Da se observó en tomate de cáscara, chile (variedad poblano y loco), crisantemo y jitomate.,

El ARN dc con peso aproximado de 1.2×10^6 Da se presentó en muestras de jitomate y chile del tipo loco.

La banda de 1.1×10^6 Da se comparte entre crisantemo y muestras de chile tipo loco., por último las bandas de 0.99 y 0.87×10^6 Da se presentó en tomate de cáscara, chile tipo poblano y jitomate.



Figura 10. Grafica radial de la distribución de las bandas de ARN dc determinadas por electroforesis en cada una de las especies colectadas de Puebla.

LOCALIDAD DE TECAMACHALCO Y SAN MARTÍN PUEBLA.

Los perfiles electroforéticos obtenidos de la colecta correspondiente a Tecamachalco Puebla y correspondiente a los barrios de Quelchola y San Martín mostraron la presencia de ARN dc.

Se colectaron un total de 23 muestras que presentaron síntomas característicos de enfermedades virales. Los principales síntomas observados en estos cultivos fueron el

cálico, amarillamiento, mosaico, enanismo, enchinamiento, necrosis y en algunos casos plantas sin la presencia de síntomas.

Las jitomate provenientes de parcelas de Quelehola, presentaron patrones de 3 bandas de ARN dc (2.29, 1.2 y 1.01 X10⁶ Da) en 5 muestras de 8 analizadas (Figura 11-A), sin embargo las muestras de tomate de chile a pesar de tener presente la sintomatología no se pudo observar la presencia de ARN dc (Figura 11 D-E).

En 9 muestras de chile variedad poblano provenientes del Barrio de San Martín se pudo obtener perfiles de 5 bandas (Figura 12 A-D, G-J) de ARN dc (3.32, 2.42, 2.27, 1.71 y 1.68 X10⁶ Da) en este caso solamente una muestra de dicho cultivo no presentó este perfil electroforético.

Al realizar el análisis electroforético en las muestras de frijol (Figura 12 E-F), chile tipo poblano (Figura 11-J) y de tomate de cáscara se observó una ausencia de bandas de ARN dc (Figura 11-I., Cuadro 4).

Cuadro 4. Incidencia de bandas ARN dc en muestras de chile en Tecamachalco Pue.

Muestras localidad Tecamachalco Pue.	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da Aproximado	No. de muestras
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0		3/8
	3	2.29, 1.2, 1.01	5/8
<i>Physalis ixocarpa</i>	0		1/1
<i>C. annuum</i> var. poblano	0		2/2
Muestras localidad San Martín Pue.	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da Aproximado	No. de muestras
<i>C. annuum</i> var Poblano	0		1/10
	5	3.32, 2.42, 2.27, 1.71, 1.68	9/10
<i>P. vulgaris</i>	0		2/2

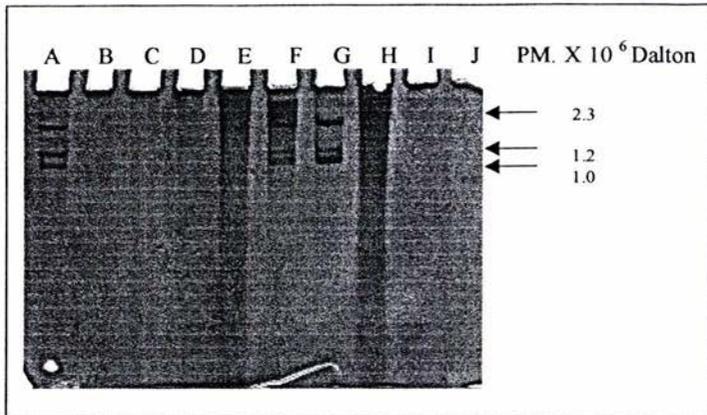


Fig. 11 Muestras de ARN dc., muestras de los sitios de Tecamachalco Puebla. Los gels fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) *L. esculentum*, B) *L. esculentum*, C) *L. esculentum*, D) *C. annuum*, E) *C. annuum*, F) *L. esculentum*, G) *L. esculentum*, H) *L. esculentum*, I) *P. Ixocarpa*, J) *C. annuum* (var. poblano).

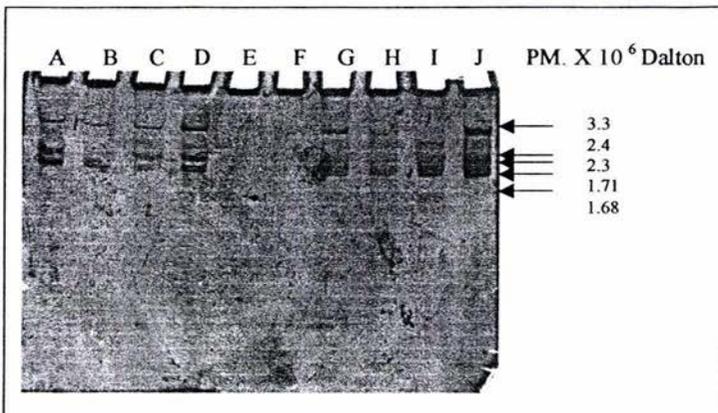


Fig. 12 Muestras de ARN dc., muestras de los sitios de Tecamachalco Puebla. Los gels fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) *C. annuum* (var. poblano), B) *C. annuum*, C) *C. annuum*, D) *C. annuum*, E) *P. vulgaris*, F) *P. vulgaris* (aparente sana), G) *C. annuum*, H) *C. annuum* (aparente sana), I) *C. annuum*, J) *C. annuum* (var. poblano).

LOCALIDAD ESTADO DE TLAXCALA

En el Estado de Tlaxcala, los patrones electroforéticos obtenidos del material colectado de 42 muestras de 9 cultivos diferentes, en las parcelas pertenecientes al Barrio de San Rafael, presentaron diferentes pesos moleculares de ARN de lo que indica una infección de probable origen viral.

IZT.

En esta localidad se encontraron los cultivos de 2 plantas ornamentales, maíz, tomate de cáscara, chile, calabaza pepino y frijol (Cuadro 5).

En tomate de cáscara se presentaron perfiles electroforéticos de 1 banda (2.42×10^6 Da) en 2 muestras de 12 analizadas (Figura 13-C), de 2 bandas (2.42 y 0.71×10^6 Da) en 1 muestra de 12 analizadas y 3 bandas (2.42 , 1.21 y 1.15×10^6 Da) en 1 muestra de 12 colectadas, las 8 muestras restantes no presentaron presencia de ARN de.

Las muestras de chile variedad poblano presentó una gran variedad de perfiles que van desde 1, 3, 4, 5 y 7 bandas de ARN de (3.12 , 2.65 , 2.43 , 1.79 , 1.73 , 1.67 , 1.21 , 1.15 , 1.09 , 0.97 , 0.88 , 0.86 , 0.82 , 0.74 , 0.70 , 0.68 , 0.66 , 0.63 , 0.49 y 0.34×10^6 Da) en un total de 15 muestras analizadas (Figura 13-B, E-H), en este caso solamente 3 muestras de 15 analizadas no presentaron los perfiles electroforéticos.

En la muestra de la planta ornamental se observaron 2 perfiles de 2 bandas (1.28 y 1.13×10^6 Da) y 4 bandas de ARN de (2.60 , 2.61 , 1.28 y 1.13×10^6 Da).

La muestra de frijol mostró la presencia de perfiles de 2 bandas (2.99 y 2.43×10^6 Da).

Por último en el sitio de muestreo, las plantas de chile variedad loco presentó 2 perfiles electroforéticos de 5 bandas (2.66 , 2.38 , 1.27 , 1.18 y 1.10×10^6 Da y 2.11 , 1.99 , 1.28 , 1.21 y 1.15×10^6 Da)

Los cultivos analizados de gladiolo, maíz, calabaza y pepino a pesar de la sintomatología que presentaban, no mostró la presencia de ARN de por el análisis electroforéticos (Cuadro 5).



Cuadro 5. Localidad de Tlaxcala con la presencia de diferentes número de bandas y tamaños de ARN dc.

Muestras localidad Tlaxcala Tlax.	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da Aproximado	No. de muestras
<i>P. ixocarpa</i>	0	0	8/12
	1	2.42	2/12
	2	2.42, 0.71	1/12
	3	2.43, 1.21, 1.15	1/12
Gladiolo	0		4/4
<i>C. annuum</i> var Poblano	0		3/15
	1	0.88	2/15
	3	2.43, 1.21, 1.15	1/15
	4	0.88, 0.80, 0.74, 0.68	1/15
	5	3.12, 2.65, 1.09, 0.97, 0.86	4/15
	5	1.73, 0.80, 0.70, 0.63, 0.49	3/15
	7	1.79, 1.67, 0.82, 0.70, 0.66, 0.49, 0.34	1/15
<i>Ornamental</i>	2	1.28, 1.13	1/2
	4	2.60, 2.61, 1.28, 1.13	1/2
<i>Zea maiz</i>	0		22/22
<i>Cucúrbita pepo calabaza</i>	0		1/1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2	2.99, 2.43	1/1
<i>C. annuum</i> var. Loco	5	2.66, 2.38, 1.27, 1.18, 1.10	2/4
	5	2.11, 1.94, 1.28, 1.21, 1.15	2/4
<i>C. pepo pepino</i>	0		1/1

En la figura 14 se realizó la comparación de bandas de pesos moleculares de las especies analizadas provenientes del Estado de Tlaxcala.

Los ARN dc que presentan aproximadamente pesos moleculares similares se encontró en muestras de chile tipo poblano y frijol con bandas de 3.12 y 2.99 X10⁶ Da respectivamente.

La presencia de un ARN dc de aproximadamente 2.6 X10⁶ Da se pudo observar en muestras de plantas ornamental, chile variedad loco y poblano.

El perfil de ARN dc con una banda de 2.4 X10⁶ Da se presentó en chile variedad loco, tomate de cáscara y frijol.

En esta localidad las bandas que más aparecieron fueron en las muestras de tomate de cáscara, ornamental, chile tipo poblano y loco con ARN dc de 1.2 y 1.15 X10⁶ Da.

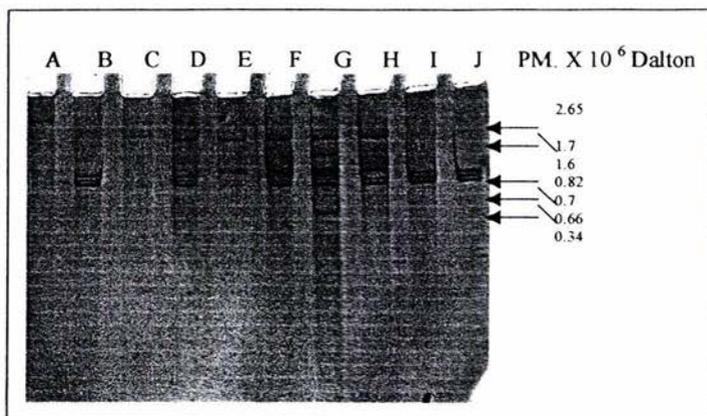


Fig. 13 Muestras de ARN cadena doble purificado a partir de 5gr de tejido y analizados en geles de poliacrilamida al 6%, condiciones de corrida 100 volts 1:45 hrs.. muestras de la localidad Sn Baltazar Tlaxcala . Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) *L. esculentum* (aparente sano), B) *C. annuum* (var. poblano), C) *P. ixocarpa*, D) *C. annuum* (var. serrano), E) *C. annuum* (var. poblano). F) *C. annuum* (var. poblano), G) *C. annuum* (var. poblano), H) *C. annuum* (var. poblano), I) *C. annuum* (var. serrano), J) *C. annuum*. (var, serrano).

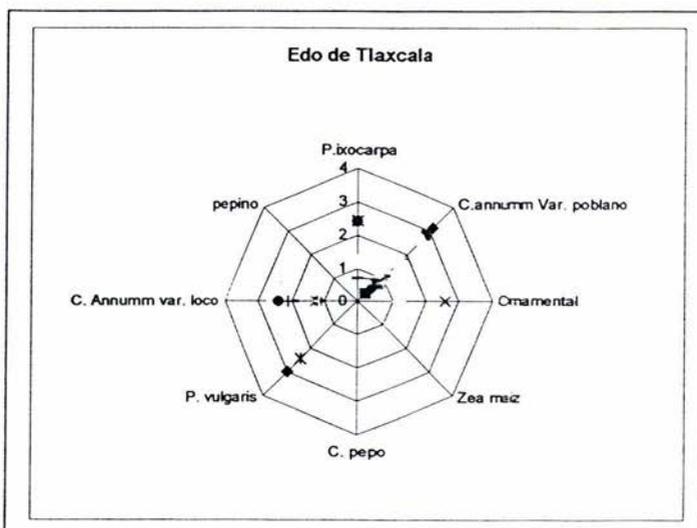


Fig 14 Comparación grafica de cada especie, así como la presencia de sus respectivos ARN dc en cada especie la escala esta dada en $X10^6$ Da.

LOCALIDAD DE ACTOPAN HIDALGO.

El muestreo correspondiente a la localidad de Actopan Hgo., realizado en parcelas de cultivo de chile de las variedades serrano, parabólica y tampico, así como de cultivo de jitomate y tomate de cáscara (Cuadro 6) mostró bandas en los perfiles electroforéticos por lo que se sospecha de ARN de origen viral.

El número total de muestras colectadas fue de 25 en esta localidad, las cuales presentaron diversos síntomas como el amarillamiento, enanismo, aborto floral, necrosis, cálico, marchitamiento, moteado clorótico y enchinamiento. Estos síntomas estaban presente en más de un 50 % de las parcelas visitadas.

Los análisis por electroforesis presentaron, en las muestras de chile diferentes perfiles de ARN dc, como fue el caso de la variedad tampico con 4 bandas (1.33, 1.19, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da).

Las muestras de la variedad parabólica mostró la mayor diversidad de perfiles ARN dc de 2 bandas (0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da) en 1 de 8 muestras (Figura 16-B), 3 bandas de ARN dc (2.46, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da) en 3 de 8 muestras., 4 bandas (2.46, 1.33, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da) en 2 de 8 muestras (Figura 16-J) y 5 bandas (4.2, 1.33, 1.19, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da) en 1 muestra de 8 analizadas.

Las muestras de chile variedad serrano presentó patrones de ARN dc de 3 bandas (2.46, 1.33 y 1.19 $\times 10^6$ Da) 2 muestras de 6 analizadas (Figura 16-D y 17 D, F-I y J), 4 bandas de ARN dc (1.33, 1.19, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da) en 1 muestra de 6 muestras analizadas y hasta de 6 bandas (Figura 16-G) de ARN dc (2.46, 1.33, 1.19, 0.99, 0.87 y 0.5 $\times 10^6$ Da). La ausencia de ARN dc se presentó en las muestras de jitomate y tomate de cáscara para esta localidad, a pesar de presentar sintomatología de origen viral (cuadro 6).

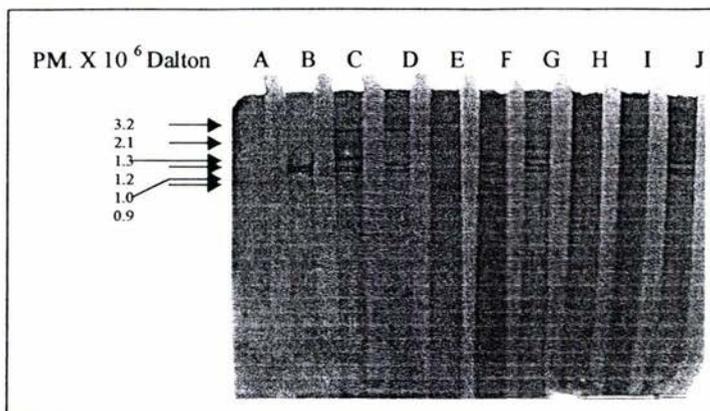


Fig. 15 Muestras de ARN cadena doble de la localidad el Boxtha Edo. de Hidalgo. A) *L. esculentum*, B-C) *C. annuum* (var. parabólica), D-G) *C. annuum* (var. serrano), H) *L. esculentum*, I) *C. annuum* (var. serrano), J) *C. annuum* (var. parabólica).

Cuadro 6. Numero de bandas y tamaños aproximados obtenidas en las muestras de la localidad de Actopan Hgo.

Muestras localidad Actopan Hgo.	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da aproximado	No. de muestras
<i>P. ixocarpa</i>	0		1/1
<i>L. esculentum</i>	0		7/8
	1	3.12	1/8
<i>C. annuum</i> var Tampico	4	1.33, 1.19, 0.99, 0.87	1
<i>C. annuum</i> var Parabólica	0		1/8
	2	0.99, 0.87	1/8
	3	2.46, 0.99, 0.87	3/8
	4	2.46, 1.33, 0.99, 0.87	2/8
	5	4.2, 1.33, 1.19, 0.99, 0.87	1/8
<i>C. annuum</i> var Serrano	3	2.46, 1.33, 1.19	2/6
	4	1.33, 1.19, 0.99, 0.87	1/6
	6	2.46, 1.33, 1.19, 0.99, 0.87, 0.5	3/6

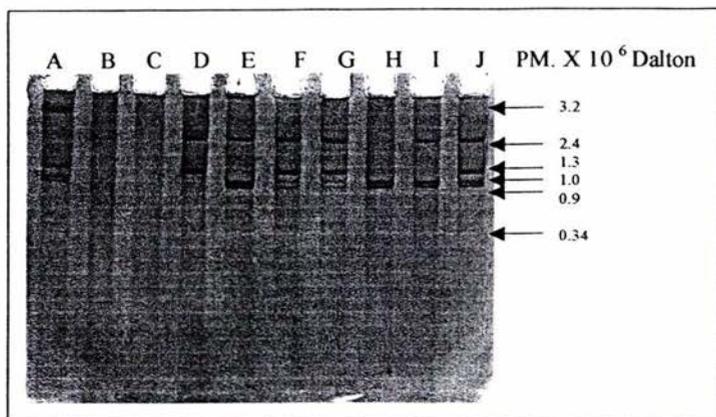


Fig. 16 Muestras de ARN dc, muestras de la localidad de Actopan Hidalgo . Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) *C. annuum* (var parabólica), B) *C. annuum* (var. parabólica), C) *L. esculentum*, D) *C. annuum* (var. serrano), E) *C. annuum* (var. parabólica), F) *C. annuum* (var. serrano), G) *C. annuum* (var. serrano), H) *C. annuum* (aparente sana), I) *C. annuum* (var. parabólica), J) *C. annuum* (var. serrano).

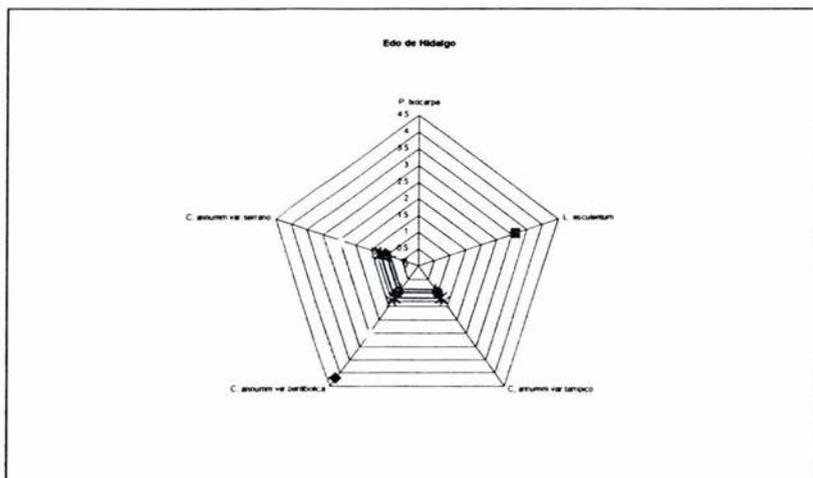


Figura 17. Distribución de los patrones electroforéticos encontrados en las muestras del Estado de Hidalgo, las muestras de *C. annuum* muestran una clara similitud en estos patrones electroforéticos cos, compartiendo el bandas de ARN dc del mismo peso molecular.

Al realizar la comparación gráfica (Figura 17) de los ARN dc encontrados por el análisis electroforético se puede observar como los ARN dc de 2.46, 1.33, 1.19, 0.99, 087 X 10⁶ Da se encuentra en todas las muestras de chile independientemente de la variedad, sin embargo a pesar de la presencia de estas bandas de ARN dc, los cultivos aledaños de jitomate y tomate de cáscara no mostraron la presencia de perfiles electroforéticos de ARN dc.

LOCALIDAD DE TEXCOCO ESTADO DE MÉXICO.

La localidad de Texcoco Edo de Méx. En donde se colectaron un total de 95 muestras, de los cultivos de tomate de cáscara, calabaza con los perfiles electroforéticos característicos de ARN dc, sin embargo las muestras analizadas por electroforesis de jitomate y maíz no presentaron dichos perfiles electroforéticos (Cuadro 7).

Las muestra de tomate de cáscara presentó 3 perfiles electroforéticos de 1 banda de 4.0., 2.4 y 2.18 X10⁶ Da respectivamente cada uno. Dos perfiles más de ARN dc de 2 bandas (1.35 y 1.09 X10⁶ Da) y 4 bandas de ARN dc (2.4, 2.18, 1.35 y 0.48 X10⁶ Da) de ARN dc (datos no mostrados).

Los perfiles encontrados en muestras de calabaza fue de 1 banda (4.0 X10⁶ Da), 2 bandas (4.0 y 1.35 X10⁶ Da) y 4 bandas (4.0, 2.29, 2.06 y 1.35 X10⁶ Da).

Sin embargo de 26 muestras de maíz y 36 de tomate de cáscara (cuadro 7), que mostraron síntomas característicos de infección viral no presentaron perfil alguno por el análisis electroforético (Figura 19 y 20).

Cuadro 7. En la localidad de Texcoco Estado de México se pudo determinar la presencia de CMV debido al patrón electroforéticos característico y la determinación de los pesos moleculares similares a este.

Muestras localidad Texcoco Edo de Méx	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da Aproximado	No. de muestras
<i>Physalis ixocarpa</i>	1	4.0	4/18
	1	2.4	3/18
	1	2.18	5/18
	2	1.35, 1.09	2/18
	4	2.4, 2.18, 1.35, 0.48	4//18
<i>Zea maiz</i>	0		0/26
<i>C. pepo</i>	1	4.0	6/15
	2	4.0, 1.35	4/15
	4	4.0, 2.29, 2.06, 1.35	5/15
<i>L. esculentum</i>	0		0/36

En la comparación gráfica se pudo determinar que las muestras de tomate y calabaza mostraron la presencia de 2 bandas de ARN dc con pesos moleculares similares de 4.0 y 1.35 X10⁶ Da, mientras que las muestras de jitomate y maíz no se observó la presencia de estos ARN dc (Figura 18).

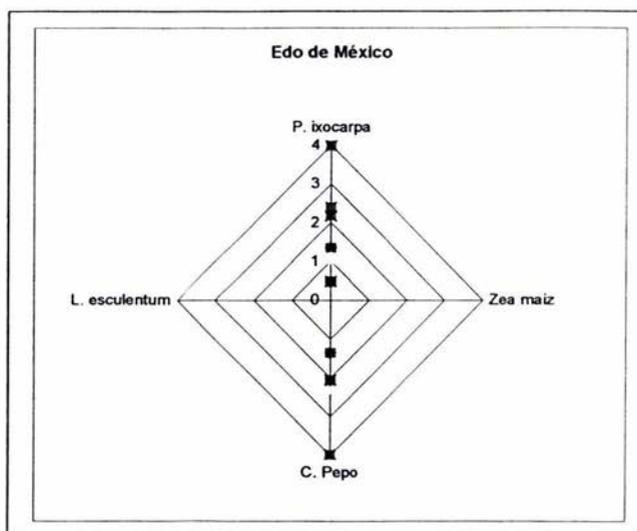


Figura 18. Se muestra la distribución de los pesos moleculares que corresponden a los patrones de peso correspondiente a CMV en tres diferentes localidades.

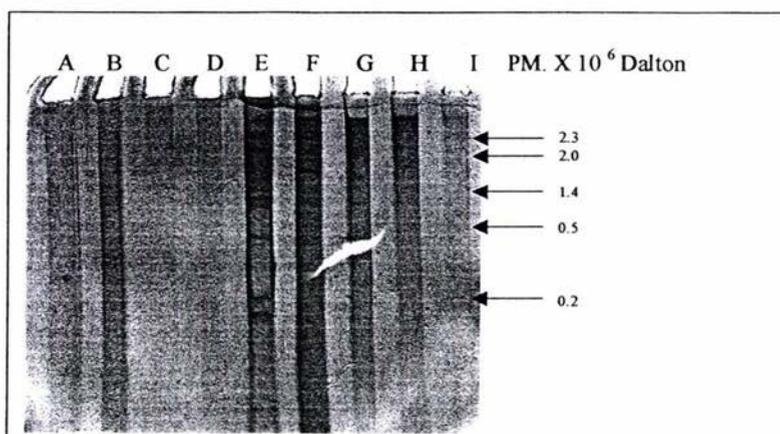


Fig. 19 Muestras de ARN dc purificado a partir de 3gr de tejido y analizados en gels de poliacrilamida al 6%, condiciones de corrida 100 volts 1:45 hrs., muestras de Yautepec Morelos

. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A-D) *L. esculentum*, E) Carna-5, F) TMV, G-I) *L. esculentum*.

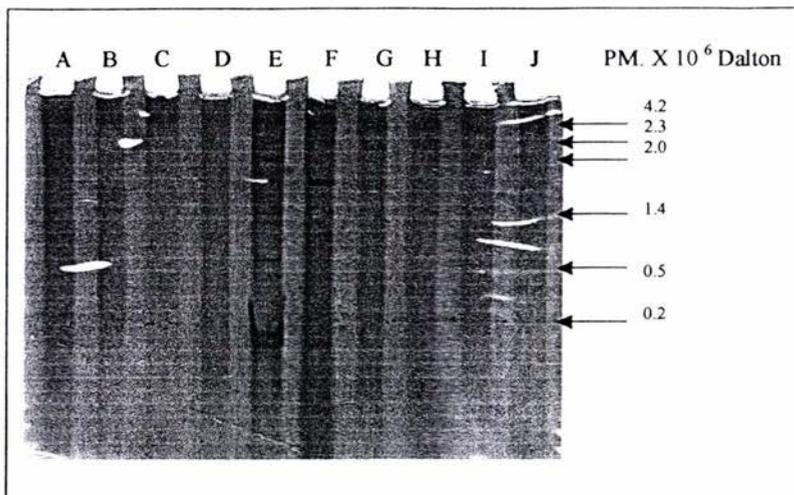


Fig. 20 Muestras de ARN de purificado a partir de 3gr de tejido y analizados en geles de poliacrilamida al 6%, condiciones de corrida 100 volts 1:45 hrs., muestras de Yautepec Morelos. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) Pepino, B-D) *P. vulgaris*, E) Carna-5, F) TMV, G-J) *C. pepo*.

LOCALIDAD DE YAUTEPEC MORELOS.

El último de los sitios de colecta se realizó en Yautepec Morelos donde se colectó un total de 30 muestras de diferentes parcelas y diferentes cultivos. se tomaron muestras de calabaza, jitomate, frijol y pepino en esta localidad solamente fue posible detectar patrones electroforéticos en muestras de calabaza.

Los cultivos más afectados y que presentaron síntomas de origen viral fueron los de calabaza y jitomate.

Se pudo determinar un patrón de 3 bandas (4.2, 1.8 y 1.6 $\times 10^6$ Da) en muestras de calabaza. la cual presentó la deformación de hoja. Las tres especies restantes no presentaron aislamiento de ARN dc (Cuadro 8).

Cuadro 8. Especies de hortalizas del Estado de Morelos, se presentan los pesos moleculares obtenidos por análisis electroforéticos.

Muestras localidad Yautepec Mor.	No. de bandas presentes	PM. X 10 ⁶ Da Aproximado	No. de muestras
<i>C. pepo</i>	0		3/5
	3	4.2, 1.8, 1.6	2/5
<i>L. esculentum</i>	0		16/16
<i>P. vulgaris</i>	0		3/3
<i>C. sativus</i>	0		6/6

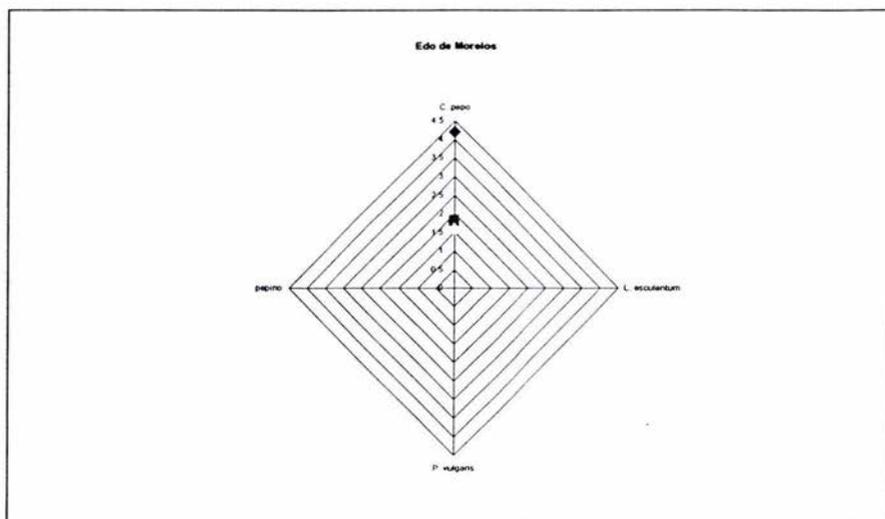


Figura 21. Comparación de la distribución de patrones electroforéticos en las diferentes especies de hortalizas, mostrando una ausencia de dichos patrones en tres especies de hortalizas.

Al realizar la comparación de los patrones electroforéticos encontrados en el Estado de Morelos, se pudo determinar solamente la presencia de ARN de de 4.2, 1.8, 1.6 X 10⁶ Da en muestras de calabaza (Figura 21).

Comparación de perfiles electroforéticos de diferentes localidades

Al comparar los patrones electroforéticos de los cultivos analizados provenientes de muestras de Atlixco, Puebla, Texcoco y Estado de México (figura 21), se pudo observar la presencia de bandas de pesos similares en muestras de *C. annuum* (var. poblano) con pesos moleculares de 2.54 , 2.02 y 0.71×10^6 Da (carril A y C) y *C. annuum* (variedad poblano, asintomático) con la presencia de una banda de 2.02×10^6 Da. Sin embargo no se pudo determinar la presencia de bandas de ARN dc en *P. ixocarpa* (carril D-E), *Gladiolus sp* (carril F y J), *Zea mais* (carril G), *L. esculentum* (carril H), y *Cucurbita pepo* (carril I).

En la comparación de los perfiles electroforéticos de muestras de cultivos pertenecientes a parcelas de Sn Baltazar Tlaxcala, Tepeyanco Tlaxcala, Atlixco Pue, y Sn Mateo Pue. Se pudo observar que existen un mayor numero de bandas de pesos aproximados (figura 23), entre las muestras de *C. annuum* (var. poblano) con patrones electroforéticos de 2.3 , 1.28 , 1.31×10^6 Da (carril A), *P. ixocarpa* con patrones electroforéticos de 2.43 , 1.28 , 1.21 y 1.15×10^6 Da, *P. vulgaris* con la presencia de dos bandas de 2.43 y 2.0×10^6 Da aproximadamente (carril C), Crisantemo con patrones electroforéticos de 2.43 , 2.0 , 1.28 , 1.21 , 1.15×10^6 Da, Maleza (compuesta no determinada) con ausencia de bandas (carril H-I) y *C. annuum* (var. serrano) con ausencia de bandas (carril J).

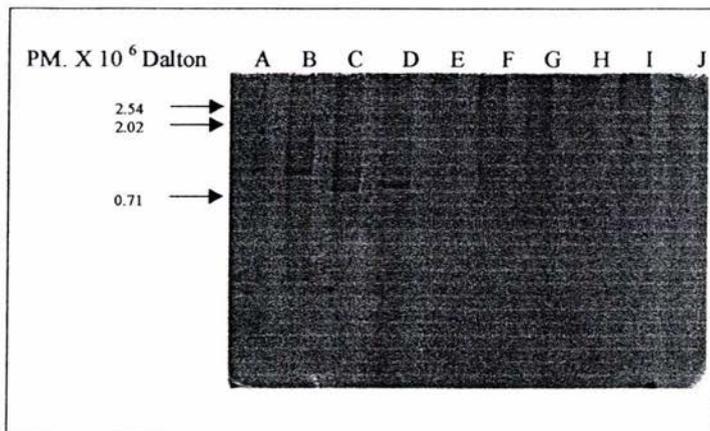


Figura 22 Perfiles electroforéticos de ARN cadena doble., localidades de Atlixco Puebla. (A, B, C, D, E y J., Atlixco Pue. (F y G) y Texcoco Edo de Méx (H e I) . A) *C. annuum* (var. poblano). B) *C. annuum* (var. poblano aparente sano), C) *C. annuum* (var. poblano), D) *P.*

ixocarpa, E) *P. ixocarpa*, F) Gladiolo, G) *Zea. mais*, H) *L. esculentum*, I) *Cucurbita.pepo*, J) Gladiolo.

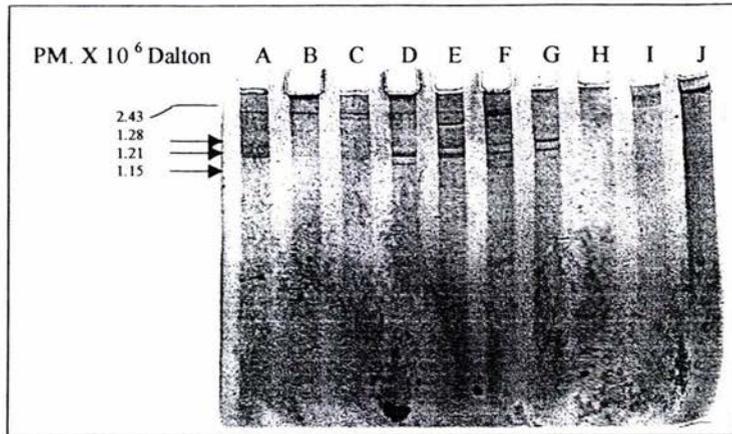


Figura 23 Perfiles electroforéticos de ARN cd., de las localidades de Sn Baltazar Tlaxcala (A,B y C), Tepeyanco Tlaxcala (D), Atlixco Pue. (E, F , G e I), Sn Mateo Pue. (H y J) . Los gels fueron teñidos con nitrato de plata y montados en papel celofán. A) *C. annuum* (var. poblano), B) *P. ixocarpa*, C) *P. vulgaris*, D) *P. Ixocarpa* (aparente sana), E) *P. ixocarpa*, F) Crisantemo, G) Flor (terciopelo), H) Maleza (compuesta), I) Maleza, J) *C. annuum* (var. serrano).

Comparación de perfiles electroforéticos de las especies analizadas

Se realizó la comparación de muestras de *Capsicum annuum* tipo poblano provenientes de los Estados de Tlaxcala, Puebla, así como las muestras de *Capsicum annuum* del tipo serrano, parabólica y tampico del estado de Hidalgo. Las muestras que presentaron mayor relación en el número de bandas de ARN de fueron entre los Estados de Puebla e Hidalgo con bandas de 1.33 , 0.99 y 0.87×10^6 Da (fig. 30), lo que nos indica una probable distribución en ambos Estados del mismo virus o variantes de este.

En comparación de los patrones electroforéticos de *C. annuum* tipo poblano en donde presentó una mayor cantidad de bandas ARN de, pero de pesos moleculares entre los 3.12 y 0.34×10^6 Da, estos pesos corresponden a los descritos por Arancibia en donde menciona a los virus crípticos, en este caso se podría sospechar de infecciones por estos virus en plantas que no presentan síntomas.

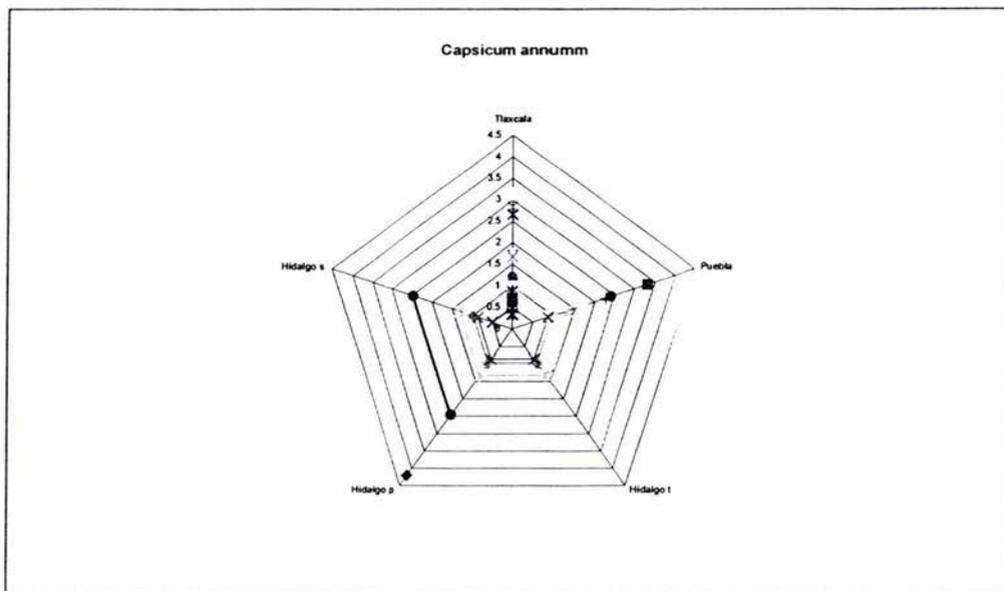


Figura 24. Comparación gráfica de los pesos moleculares encontrados en muestras de chile de diferentes variedades determinadas en tres de los estados muestreados.

Las muestras de jitomate (*L. esculentum*), provenientes de los Estados de México y Puebla, presentaron un patrón electroforético idéntico, ya que compartieron bandas de pesos idénticos de 4, 2.29, 1.33, 1.2, 1.01, 0.99 y 0.87 $\times 10^6$ Da.

En comparación los patrones electroforéticos obtenidos de muestras provenientes del Estado de Hidalgo, solamente se determinó la presencia de una banda de 3.2 $\times 10^6$ Da, por lo que no guardaba relación alguna con los perfiles de las muestras anteriormente descritas (Figura 25).

Sin embargo las muestras de jitomate del estado Morelos no presentaron los perfiles electroforéticos de ARN dc.

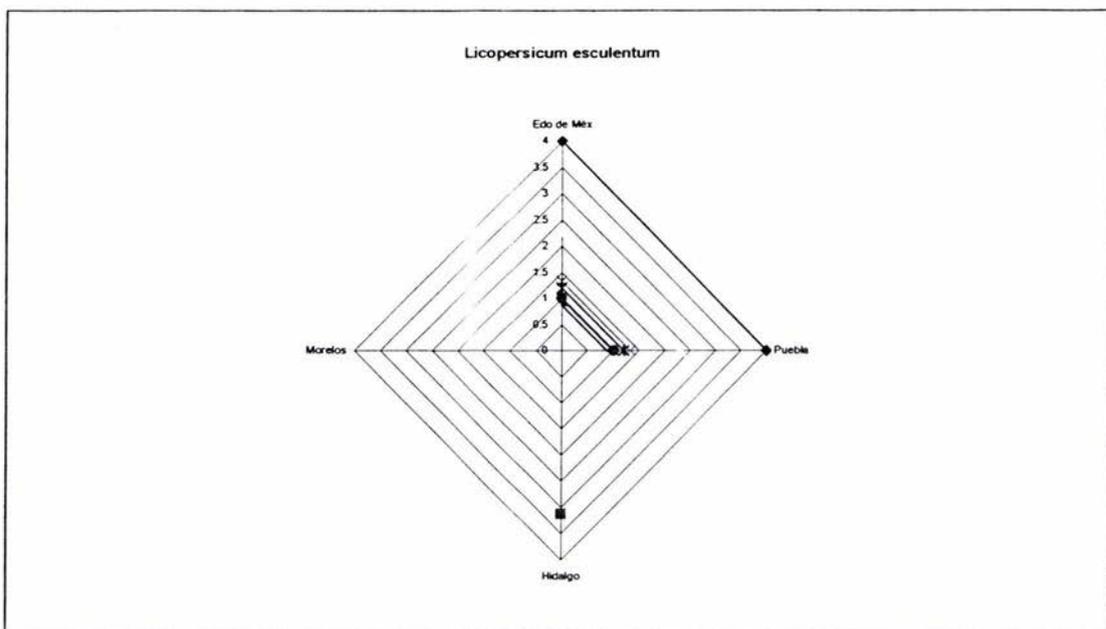


Fig 25. Distribución de los pesos moleculares encontrados en cada sitio de las muestras de *L. esculentum*, la escala en cada uno de los ejes esta dada en $\text{Da} \times 10^6$ Da.

Al realizar la comparación de muestras de tomate de cáscara (*P. ixocarpa*), los patrones electroforéticos encontrados difieren entre las diferentes localidades lo cual nos menciona una infección de posibles virus no determinados.

Sin embargo se pudo obtener el aislamiento de ARN de de 2.8×10^6 Da que se encontró en muestras de los Estados de México y Puebla (Figura 26).

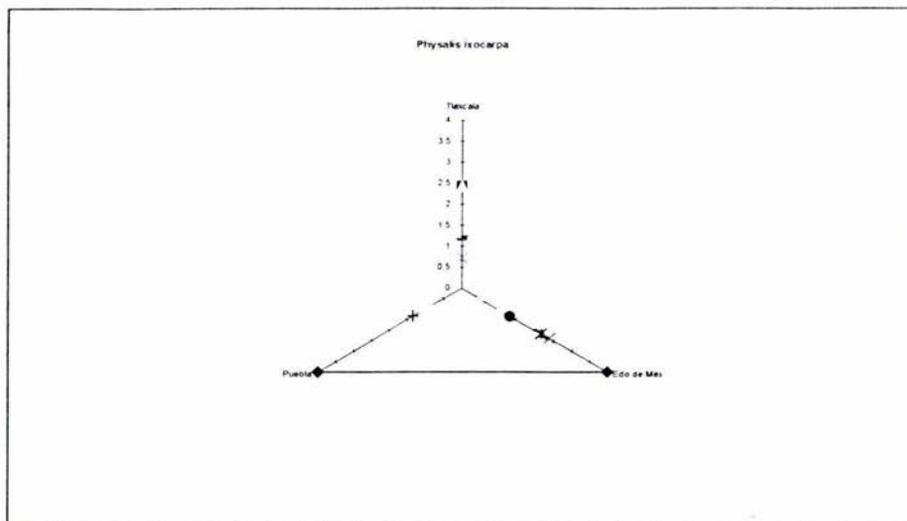


Fig 26. Distribución de los patrones electroforéticos de *P. ixocarpa* en los tres estados en donde se colectó. La escala de cada eje esta dada en $X10^6$ Da.

Al realizar la comparación de los pesos moleculares obtenidos, en todas las localidades y con las muestras colectadas se observó una distribución en un rango que fue desde 0.2 a 4.2×10^6 Da como se muestra en la figura 27. En esta figura la distribución representada en el eje de las X., fue del 1 al 8 en el orden siguiente tomate de cáscara, chile poblano, ornamental, maíz, calabaza, frijol, chile variedad loco y pepino que correspondieron al Estado de Tlaxcala., del 13 al 15 de las muestras de tomate de cáscara, maíz y calabaza del Estado de México., del 16 al 24 de muestras de tomate de cáscara, gladiolo, chile poblano, maíz, jitomate, chile loco, crisantemo, chilacayote y *L. nepetifolia* pertenecientes al Estado de Puebla y del 25 al 28 con muestras de jitomate, chile tampico, parabólica y serrano del Estado de Hidalgo y por último la única muestra que mostró perfiles electroforéticos del Estado de Morelos en la posición 29 (figura 27).

La distribución de los ARN dc mostró que las muestras pertenecientes a Puebla e Hidalgo (especies en la posición 15-28 de la figura 27), presentaron el mayor número de muestras con patrones electroforéticos con pesos que se encontraron en los intervalos de 0.87 a 1.7×10^6 Da.

La presencia de bandas de ARN de entre 1.7 y 0.85×10^6 Da, encontrados frecuentemente tanto en plantas con síntomas o asintomáticas principalmente en tomate de cáscara y chile colectadas en campo podrían corresponder a virus crípticos, no reportados con anterioridad (Boccardo, *et al*, 1987). Los virus crípticos se transmiten en alta proporción por semilla. Su presencia parece no inducir algún tipo de síntoma en su hospedante, pero su papel biológico no ha sido suficientemente estudiado (Arancibia, *et al*, 1994).

Distribución de los diferentes ARN dc de muestras colectadas

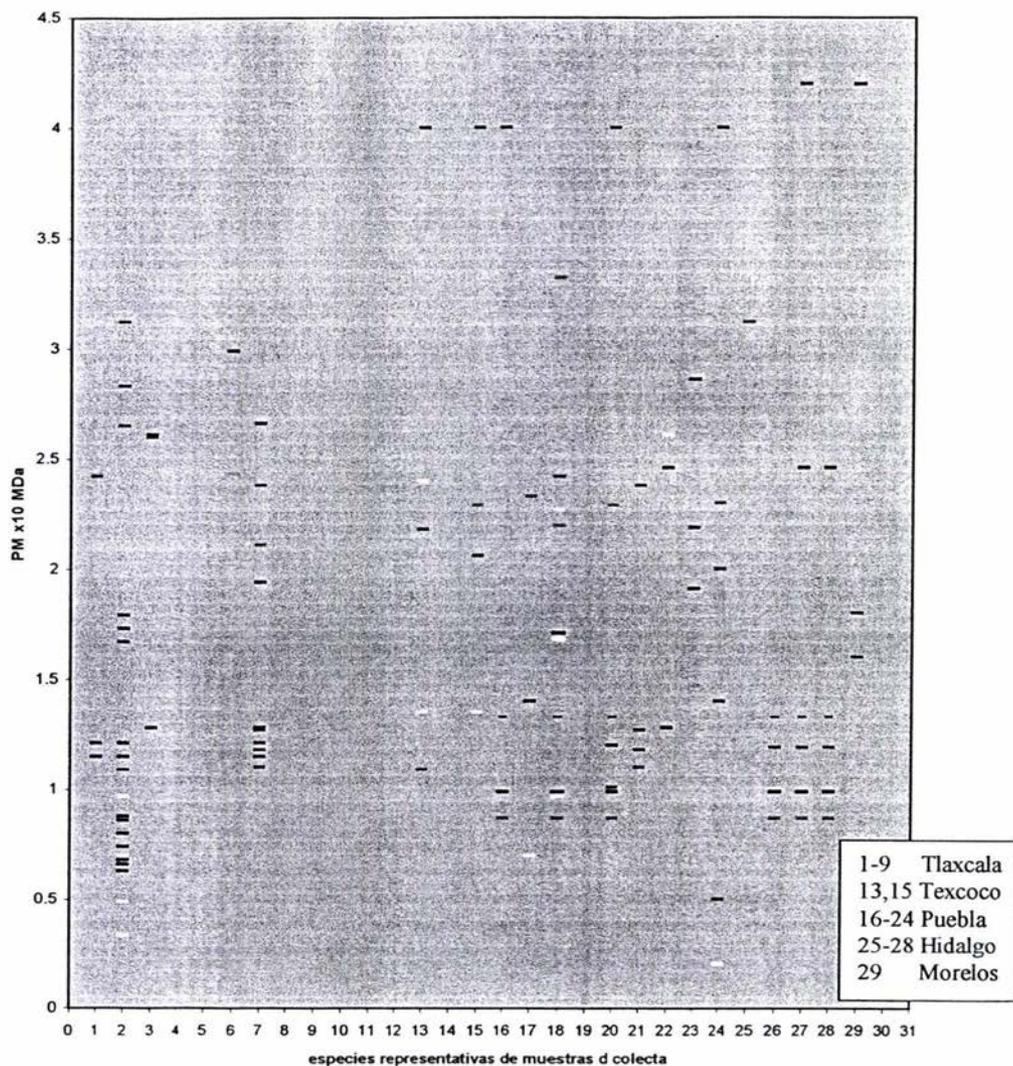


Fig 27. Distribución de las bandas con sus diferentes pesos moleculares ($\times 10^6$ Da) de tomate de cáscara (1,13 y 16), Chile poblano (2 y 18), ornamental (3), maíz (4 y 19), calabaza (5,15 y 29), frijol (6), chile loco (7 y 21), pepino (8), gladiolo (17), jitomate (20 y 25), crisantemo (22), chilacayote (23), Leonotis (24), chile tampico, parabolica y serrano (26, 27 y 28) analizadas.

DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que fue frecuente el encontrar bandas de RNA-dc en los cultivos de tomate de cáscara, chile, maíz, calabaza, jitomate y frijol, con síntomas de mosaicos cloróticos, enanismo, enchinamiento, necrosis, deformación de hojas, a los que se les relaciono con probables infecciones por virus; Sin embargo, también se pudieron detectar bandas de RNA-dc en algunas plantas que no mostraron ningún síntoma de origen viral, lo que señala que es muy probable la infección latente de virus en muchas de las plantas analizadas. Estos ARN dc son presumiblemente de un origen viral el cual esta fundamentado en las FR de los ARN cs de los genomas de virus. Algunos de estos perfiles fueron muy semejantes a los patrones de peso molecular utilizados como marcadores. Sin embargo la presencia de otros perfiles de ARN dc fueron completamente distintos en cuanto a peso molecular y número de bandas presente de las plantas colectadas.

La evidencia de obtener RNAs de cadena doble, a sido confirmada mediante la presencia de bandas obtenidas por el análisis electroforéticos en todas las muestras colectadas y analizadas en este trabajo, así como análisis con Dnasa y Rnasa, tal como lo menciona Jordan y colaboradores en 1983 al analizar un total de 280 muestras de aguacate en donde solo 22 no presentaron los patrones de RNA doble cadena por lo que se determinó la infección por virus.

Los patrones electroforéticos de RNA-cd analizados y procedentes de la mayoría de las plantas colectadas en el campo, correspondieron con los patrones de RNA-cd de virus conocidos, como CMV, TMV y CARNA 5. Estos virus fueron reportados por serología y análisis de ARN dc por Piedra en el 2000, en una maleza (*Leonotis nepetifolia*) de el Valle de Atlixco Puebla, la cual se ha observado en la periferia de las parcelas de cultivo, por lo que muy probablemente este sirviendo como un reservorio natural. Sin embargo, algunos de los patrones electroforéticos de RNA-cd, proceden de las plantas asintomáticas, fueron similares con los de virus crípticos, que no causan síntomas aparentes, y algunos parecen corresponder a virus desconocidos o no descritos aun en México.

Fue frecuente observar en algunas plantas un elevado número de bandas de ARN dc, todas procedentes de una sola planta, que indica la probable infección múltiple de varios virus, lo que explica la diversidad de síntomas encontrados en el campo, incluso en una misma planta.

Los resultados indican la presencia de CMV o variantes de este, debido a que se pudo observar perfiles electroforéticos de 4 bandas parecidas al marcador de CMV utilizado y con pesos aproximadamente del mismo tamaño, una de estas bandas es de origen subgenómico tal como lo menciona Dodds *et. al.* En 1985 donde describe este tipo de perfiles y que esta relacionado con CMV. Este mismo virus a sido reportado en Estados Unidos y Sinaloa con el mismo perfil electroforético (Can, *et. al.* 1991., Pacheco y Apodaca, 1992., citado por De La Torre *et. al.* 1995).

De igual manera cuando se requiere de conocer variantes de este tipo se realizan pruebas de sensibilidad térmica para determinar los serotipos. Una buena caracterización de variantes de CMV por medio de los patrones electroforéticos estandarizados correctamente ayudaría para el diagnóstico de la patogenicidad del virus presentes en México. Trabajos de este tipo podrían ayudar para detectar y conocer su distribución y aun más los posibles hospederos dentro de las plantas consideradas como malezas y que sirven como reservorio de virus fitopatógenos que atacan a los cultivos.

La importancia de llevar a cabo una caracterización biológica de CMV y sus variantes, se debe a que es un virus ampliamente distribuido a nivel mundial, además de infectar un gran número de especies vegetales de importancia agrícola. (Owen y Palukaitis 1988).

Para el caso de TSWV fue difícil diferenciar el ARN dc en muestras de campo, por lo que se recomienda utilizar algunas pruebas complementarias como son la detección por serología y rango de hospederos.

El caso de los síntomas de epinastia media de las hojas, mosaicos, amarillamiento intervenal y enanismo, así como la proliferación y reducción de hojas, denominado también como “chino” se relacionaron con las infecciones causadas por el virus jaspeado del tabaco (TEV), el cual pertenece al grupo de los potyvirus y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, fue detectado con cierta dificultad por la técnica de electroforesis en algunas de las muestras colectadas de campo.

Fue frecuente encontrar infecciones mixtas, principalmente con CMV, TMV y posiblemente TSWV, y en varios casos se encontraron bandas adicionales perteneciente a virus desconocidos.

Por último se pudo obtener también ARN de alto peso molecular (12×10^6 Da) el cual ha sido detectado en plantas sanas y enfermas, y se atribuye muy probablemente de origen celular el cual ha sido observado en otros trabajos. Este tipo de ARN de es considerado enigmático, ya que se desconoce su origen y papel funcional que tiene en la planta (De la Torre *et. al.*, 1995., Fukuhara, *et. al.*, 1993., Valverde, *et. al.*, 1990). Se observa una distribución marcada entre 0.7 y 2.5×10^6 Da, correspondiente a posibles virus crípticos, los cuales son partículas esféricas de 30nm de diámetro, que se transmiten en alta proporción por semilla. Se desconoce el papel biológico que juegan ya que no han sido estudiados suficientemente (Arancibia *et. al.*, 1994).

La presencia de este tipo de infección se presentó en muestras de Chile, en donde se ha reportado que causan esterilidad masculina impidiendo que la semilla germine cuando es transmitido por polen, el origen de estos virus es desconocido, debido a la dificultad que presenta detectar en plantas ya que no causan síntomas visibles, que indiquen su presencia (Arancibia, *et. al.*, 1994., Boccardo *et.al.*, 1987., Valverde, *et. al.* 1990)

La técnica de análisis de ARN de resulto ser una prueba de diagnóstico para la detección de algunos agentes virales responsables de causar daños en los cultivos, por lo que es importante utilizar esta técnica para detectar virus que son desconocidos. Con esta técnica también se pudo detectar infección en mezcla en muestras de los Estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos.

La técnica utilizada por extracción y análisis de ARN de demostró la presencia de probablemente otros virus, los cuales son desconocidos, por lo que se desconoce también su papel patogénico.

Las moléculas de ARN de puede ser usado como reactivo o templete, tal como lo mencionan Dodds 1993, en donde los ARN de purificados, pueden ser utilizados para la síntesis de ADNc para ARN o clonación de ADNc, como sonda para Northern o Southern blotting incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fukuhara y colaboradores en 1993, pudieron detectar ARNs de cadena doble de origen desconocido en tejido de plantas de arroz en sus diferentes estados fonológicos con un número constante de copias, estos RNAs fueron utilizado para comparar por hibridación con otros RNAs de diferentes variedades de arroz en donde encontraron que la homología era diferente entre estas.

El uso de estas moléculas como inmunogeno, y este como resultado nos podrá proporcionar la producción de anticuerpos específicos monoclonal o policlonal para detectar RNA cd por ELISA así como ensayos de dot blot para algunos y no todos los extractos de plantas.

La frecuencia de los patrones electroforéticos nos pueden ayudar en cierta medida a indicar que la latencia de los virus puede ser debido a una retransmisión por vectores o bien que estos puedan ser transmitidos por semilla en un alto rango tal como lo menciona Jordan *et al.* en 1983 al determinar una alta frecuencia de un virus en plantas de aguacate.

CONCLUSIONES

El efecto de las infecciones en cultivos por posibles virus detectados por análisis de bandas correspondientes a ARN de en geles de poliacrilamida nos proporciona una idea del grado de infección en los cultivos por virus en algunos casos de origen desconocido.

Los patrones electroforéticos de ARN de analizados en el presente trabajo posiblemente correspondan a virus que no han sido caracterizados y que representan un inóculo potencialmente peligroso para estos cultivos o bien que pudiesen ser transmitidos a cultivos más susceptibles a estos patógenos.

Con la obtención y aislamiento de las formas replicativas de ARN es factible realizar ensayos para realizar su caracterización molecular mediante técnicas de amplificación clonación, hibridación o bien utilizadas como sondas como una técnica de diagnóstico.

La misma técnica de extracción de ARN de es un método el cual sirve dentro del uso de las demás técnicas para realizar la caracterización de virus, que por otros métodos no es posible realizar y mucho menos detectar.

La técnica de análisis de ARN de presenta una gran ventaja sobre las demás técnicas esto debido a que no es selectiva para un solo virus.

La técnica por sí sola representa una desventaja, ya que solo detecta las formas replicativas, otro inconveniente es que cuando se encuentran estas formas en bajas concentraciones es difícil de poder detectar.

La técnica de ARN de con uso de otros métodos de caracterización es indispensable como una herramienta para corroborar los datos de virus conocidos y la detección de mezclas de virus aun no descritos.

Los ARN de son moléculas muy estables aun a procesos de extracciones de ácidos nucleicos prolongados, en donde el tejido es solubilizado y desproteinado y no es necesario adicionar inhibidores de ribonucleasas ya que es suficiente con el tratamiento con el uso de dodecyl sulfato (SDS) y fenol durante la extracción.

APENDICE I

Se realizaron los cálculos correspondientes para cada muestra analizada, con los valores obtenidos se realizó la comparación de los pesos moleculares de cada muestra. Se realizó la comparación con los geles de poliacrilamida de todas las muestras colectadas. Con los datos se obtuvo los resultados mostrados en los cuadros 15 al 20.

En el cuadro 15 se muestran los pesos moleculares calculados de las localidades correspondientes a los estados de Puebla, Hidalgo y Tlaxcala las cuales incluyen muestras de maleza (*Leonotis nepetifolia*), *Campisum annuum*, y *Physalis ixocarpa*

Los cuadros 16 y 17 muestran los pesos moleculares calculados para muestras del estado de Tlaxcala y Puebla en los que se incluyen muestras de chile (*Capsicum annuum*) tanto de la variedad poblano y del denominado chile Loco en algunos casos se puede evidenciar de bandas de ARN de en muestras que no presentaban síntomas, maleza (*L. nepetifolia*) y *P. ixocarpa*, además se presenta el número de bandas totales así como el RF calculado para cada una y su peso aproximado en Da, se puede observar que en su mayoría presenta más de tres bandas llegando hasta un total de 8 bandas de diferentes pesos moleculares.

En el cuadro 18 se observa los perfiles electroforéticos los cuales varían con la presencia de 2 y hasta 6 bandas presentes principalmente en cultivos de chile de el estado de Puebla así como malezas asociadas a estos como *L. nepetifolia* el cual fue utilizado como marcador por presentar CMV característico en su patrón electroforético.

El cuadro 19 presenta la muestra representativa de jitomate muestreada en Puebla, así como los pesos moleculares correspondientes a los marcadores utilizados para calcular sus RF, así como muestras de *L. nepetifolia* con el patrón electroforético correspondiente a CMV.

El cuadro 20 muestra los pesos moleculares calculados para muestras de cultivos aledaños a hortalizas y que presentaron indicios de probable infección viral por los síntomas presentes en estos, también incluye muestras de algunas flores como gladiolo que mostraba síntomas de infección viral.

No.	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.09	2.46
		2	0.14	1.94
2	CMV	1	0.09	2.30
		2	0.11	2.0
		3	0.17	1.4
		4	0.40	0.5
3	TMV	1	0.03	4.2
4	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. Enchinamiento	1	0.03	4.2
		2	0.09	2.3
		3	0.11	2.0
		4	0.18	1.4
		5	0.41	0.5
5	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. Sin síntomas	1	0.34	0.68
6	<i>Capsicum annumm</i> Var. parabólica Actopan Hgo.	1	0.04	3.17
		2	0.12	2.09
7	<i>Capsicum annumm</i> Var. parabólica Actopan Hgo.	1	0.09	2.51
		2	0.13	2.02
		3	0.21	1.30
		4	0.22	1.23
		5	0.26	1.01
		6	0.29	0.87
		7	0.47	0.33
		8	0.64	0.13
8	<i>Capsicum annumm</i> Var. serrano Actopan Hgo.	1	0.09	2.46
		2	0.21	1.33
		3	0.23	1.19
		4	0.26	0.99
		5	0.29	0.87
9	<i>Capsicum annumm</i> Var. poblano Sn. Baltasar Tlaxcala.	1	0.05	3.12
		2	0.08	2.65
		3	0.25	1.09
		4	0.27	0.97
		5	0.29	0.86
10	<i>P. ixocarpa.</i> Sn Baltasar Tlaxcala.	1	0.08	2.65
		2	0.10	2.42
		3	0.17	1.59
		4	0.20	1.40
		5	0.24	1.11
		6	0.30	0.81
		7	0.32	0.74
		8	0.41	0.45
		9	0.97	0.02

Cuadro 15. Se presentan las muestras de infectadas con CMV que fueron utilizadas como marcadores y muestras de *Capsicum annumm* provenientes de Actopan Hgo.

No.	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	C. annum. var. Poblano. Sn Baltazar Tlaxcala	1	0.10	1.73
		2	0.24	0.8
		3	0.27	0.7
		4	0.29	0.63
		5	0.33	0.49
		6	0.46	0.24
2	C. annum. var. poblano. Sn Baltazar Tlaxcala	1	0.10	1.79
		2	0.11	1.67
		3	0.24	0.82
		4	0.28	0.66
		5	0.40	0.34
3	C. annum. var. poblano. Sn Baltazar Tlaxcala Sin síntomas.	1	0.23	0.88
4	C. annum. var. poblano. Sn Baltazar Tlaxcala	1	0.23	0.88
		2	0.24	0.80
		3	0.26	0.74
		4	0.27	0.68
		5	0.29	0.61
5	P. ixocarpa. Sn Baltazar Tlaxcala	1	0.07	2.02
		2	0.26	0.71
		3	0.89	0.02
6	L. nepetifolia Atlixco Pue. Sin síntomas	1	0.33	0.5
7	L. nepetifolia Atlixco Pue. cálculo	1	0.11	1.7
		2	0.15	1.33
8	L. nepetifolia Atlixco Pue. cálculo blanco	1	0.05	2.3
		2	0.07	2.0
		3	0.15	1.4
		4	0.33	0.5
9	CMV	-	-	-
10	CMV	1	0.12	1.56

Cuadro 16. Se presentan muestras de *Capsicum annum* y *Physalis ixocarpa* de la localidad de Sn Baltazar Pue, se utilizaron como marcadores a *L. nepetifolia* y CMV.

	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.07	2.05
		2	0.20	1.43
		3	0.22	1.35
		4	0.23	1.31
		5	0.25	1.23
		6	0.27	1.18
		7	0.43	0.75
		8	0.46	0.70
2	CMV	1	0.06	2.09
		2	0.26	1.20
3	TMV	1	0.22	1.33
		2	0.24	1.27
		3	0.27	1.18
		4	0.29	1.12
4	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. Enchinamiento	1	0.06	2.09
		2	0.10	1.9
5	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. Sin síntomas	1	0.09	2.30
		2	0.11	2.00
		3	0.17	1.4
		4	0.42	0.5
		5	0.97	0.2
6	<i>Capsicum annuum</i> Var. loco Tepetitla Pue.	1	0.10	1.88
		2	0.15	1.65
7	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Tepetitla Pue.	1	0.09	1.93
		2	0.12	1.80
		3	0.17	1.53
		4	0.42	0.78
8	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Tepetitla Pue.	1	0.03	2.30
		2	0.20	2.36
9	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Tepetitla Pue.	1	0.20	2.36
		2	0.08	1.98
		3	0.10	1.90
		4	0.17	1.57
		5	0.43	0.76
10	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.33	0.98

Cuadro 17. Se observan los pesos moleculares calculados de muestras de *Capsicum annuum* variedad poblano y loco de la localidad de Tepetitla Puebla, utilizando como marcadores de peso molecular plantas de *L. nepetifolia* proveniente de Atlixco Puebla, así como CMV y TMV.

No.	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Sn Baltazar Pue.	-	-	-
2	<i>P. ixocarpa</i> . Sn Baltazar Tlaxcala.	1	0.18	2.54
		2	0.28	2.03
		3	0.32	1.82
3	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Sn Baltazar Pue.	1	0.20	2.42
		2	0.23	2.27
		3	0.36	1.68
		4	0.91	0.48
4	<i>Capsicum annuum</i> Var. poblano Sn Baltazar Pue.	1	0.06	3.32
5	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálico	1	0.05	4.20
		2	0.20	2.30
		3	0.23	2.00
		4	0.39	1.40
		5	0.92	0.50
6	MARCADOR	-	-	-
7	MARCADOR	1	0.22	2.31
		2	0.55	1.08
		3	0.59	1.00
		4	0.69	0.88
8	MARCADOR	1	0.23	2.24
		2	0.53	1.13
		3	0.57	1.05
		4	0.63	0.91
		5	0.68	0.81
9	MARCADOR	1	0.57	1.05
		2	0.68	0.81
10	MARCADOR	1	0.58	1.02
		2	0.61	0.94

Cuadro 18. Se presentan los pesos moleculares calculados para muestras de *C. annuum*. Variedad poblano y *P. ixocarpa* provenientes de la localidad de Sn Baltazar Puebla, en este ensayo se probaron nuevos marcadores y a *L. nepetifolia* proveniente de Atlixco Puebla.

No.	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.05	2.31
		2	0.10	1.97
		3	0.14	1.71
2	CMV	1	0.08	2.30
		2	0.09	2.00
		3	0.18	1.40
		4	0.42	0.50
3	MEV	1	0.05	2.31
		2	0.06	2.21
4	TMV	1	0.02	4.20
5	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.08	2.30
		2	0.09	2.00
		3	0.16	1.40
		4	0.40	0.50
		5	0.96	0.20
7	<i>L. esculentum</i> Tecamachalco Pue.	1	0.05	2.29
8	<i>L. esculentum</i> Tecamachalco Pue.	1	0.26	1.20
		2	0.32	1.01
9	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.09	2.31
		2	0.13	2.05
10	CMV	1	0.06	2.48
		2	0.11	2.15
		3	0.18	1.76
11	MEV	1	0.06	2.50
		2	0.07	2.43
12	TMV	1	0.07	4.2
13	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.12	2.30
		2	0.13	2.00
		3	0.20	1.40
		4	0.35	0.50
		5	0.97	0.20
14	<i>Capsicum annumm</i> Var. loco Sn Baltazar Pue.	1	0.04	2.66
		2	0.08	2.38
		3	0.28	1.27
		4	0.30	1.18
		5	0.33	1.10
15	<i>Capsicum annumm</i> Var. loco Sn Baltazar Pue.	1	0.03	2.72
		2	0.07	2.43
		3	0.12	2.11
		4	0.14	1.94
		5	0.28	1.28
		6	0.30	1.21
		7	0.31	1.15

Cuadro 19. Se presentan los pesos moleculares de muestras de *L. esculentum* de la localidad de Tecamachalco Pue. y muestras de *C. annumm* var loco de la localidad de sn Baltazar Pue. Utilizando como marcadores a *L. nepetifolia*, CMV, TMV y MEV.

No.	Muestras	No. de bandas presentes	RF	Peso aproximado en Da
1	<i>Flor ornamental</i> Atlixco Pue.	1	0.30	1.28
		2	0.34	1.13
2	<i>Maleza</i> (Cultivo chile poblano) Atlixco Pue.	1	0.08	2.61
		2	0.10	2.46
3	<i>Maleza</i> (Cultivo crisantemo) Atlixco Pue.	1	0.04	2.99
		2	0.10	2.43
4	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. Mosaico, clorosis, amarillamiento	-	-	-
5	<i>Chilacayote</i> Atlixco Pue. Mosaico, enchinamiento	1	0.05	2.86
		2	0.13	2.19
		3	0.17	1.91
		4	0.39	0.95
		5	0.43	0.82
6	<i>L. esculentum</i> Actopan Hgo.	1	0.43	0.82
7	<i>L. nepetifolia</i> Atlixco Pue.	1	0.21	1.68
8	CMV.	1	0.07	2.73
		2	0.08	2.61
9	MVE.	1	0.05	4.20
10	<i>Leonotis nepetifolia</i> Atlixco Pue. cálculo	1	0.06	4.20
		2	0.09	2.30
		3	0.11	2.00
		4	0.18	1.40
		5	0.43	0.50
		6	0.94	0.20

Cuadro 20. Se analizaron muestras de cultivos de flor ornamental, malezas, chilacayote cercanos a cultivos de hortalizas y que presentaron síntomas característicos de infecciones virales en la localidad de Atlixco Pue. así como muestras de *L. esculentum* proveniente de Actopan Hgo, utilizando marcadores de peso molecular conocidos como *L. nepetifolia*, CMV y MEV.

BIBLIOGRAFIA

Alviso, V.H. y Lozoya, S.H. 1987. Temas en virología II. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. 156-181.

Antignus, Y. y Cohen, S. 1994. Complete nucleotide sequence of an infection clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopathology* 84: 707-712

Arancibia, R.A., Valverde, R.A. y Can, F. 1994. Properties of a cryptic virus from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathology*. 43: 1-5.

Boccardo, G., Lisa, V., Louisoni, E. and Milne, R.G. 1987. Cryptic plant viruses. *Advances in virus Research* 32: 171-214. L.Bishop. New York: Elsevier

De Graaff, M., Houwing, C.J., Lukacs, N., Jaspars, E.M.J. 1995. Title RNA duplex unwinding activity of alfalfa mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *FEBS Letters* 371 (3) 219-222.

De la I. De Bauer, M.L. 1984. Fitopatología. Ed. Futura. Centro de fitopatología. Colegio de Postgraduados. Méx. p-374.

De La Torre, A.R., Teliz, O.D., Barron, B.L., Cardenas, E., Garcia, L.E., Cardenas, M and Valverde, R.A. 1995. Detección of a viral complex in tomatillo *Physalis ixocarpa* in the Central High Plateau of México. *Phytopathology* 85: 509-

Díaz, B.V. y Alvarado, B.S. 1991. Etiología, incidencia y cuantificación de daños de las enfermedades que atacan al tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en el estado de Morelos XVIII Congreso Nacional de fitopatología, Puebla. p 46.

Dickinson, C.H. y Lucas, J.A. 1987. Patología Vegetal y Patógenos de Plantas. Ed. Limusa. Méx. p-305.

Dodds, J.A., Morris T.J. and Jordan R.L. 1994. Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22:151-168.

Dodds, J.A. 1993. dsRNA in diagnosis. En: *Diagnosis de plant viruses Diseases*, Matthews, R.E.F., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.,

Dodds, J.A., Lee, S.Q. y Tiffany M. 1985. Cross Protection between Strains of Cucumber Mosaic Virus: Effect of Host And Type Of Inoculum on Accumulation of Virions and Double- Stranded RNA of the Challenge Strain. *Virology* 144: 301-309.

Fukuhara T., Moriyama H., Pak J.Y., y Nitta T. 1993. Enigmatic double-stranded RNA in Japonica rice. *Plant Molecular Biology*. 21: 1121-1130.

Galindo. A.J. 1987. Generalidades sobre los viroides y sus enfermedades que causan. En : Temas en virología II. (Editores: Alvizo, V.H.y Lozoya, S. H.). Sociedad Mexicana de Ftopatología. 78-104.

Galindo. A.J., Smith, D.R. and Diener, T.O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology* 72: 49-54.

Gallitelli, D., Vovlas, C., Martelli, Montasser, M.S., Tousignant, M.E., y Kaper, J.M. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease* 75: 93-95.

Garcia-Luque, I., Brieva, A, Diaz-Ruiz, J.R y Rubio, N. 1986. Isolation and Partial Characterization of a Monoclonal Antibody Specific for a Naturally Occurring Double-Strandend RNA. *Virology* 152: 252-255.

Garzón, T.J.A., Torres, P.I., Ascencio, I.J.T., Herrera, E.L. y Rivera, B.R.F. 1993. Inoculation of peppers whit infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83: 514-521.

German. L. T., Ullman E.D., y Moyer W.J. 1992. Tospos virus: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.

Gillings, M.R., Tesoriero, L.A., y Gunn, L.V. 1993. Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathology*. 42: 6-15.

Goldbach. R., y Peters, D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5: 113-120.

Habili, N. 1993. Detection of australian field isolates of Citrus Tristeza Virus by double-stranded-RNA analysis. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 138: 308-316.

Harris, E.L.V y Angal S. 1992. Protein Purification Methods : Práctical Approach. IRL Press, Inglaterra.317 pages

Jordan., R.L., Dodds, J.A. y Ohr H.D. 1983. Evidence for Viruslike Agents in Avocado. *Phytopatology*. 55: 1130-1134

Marzachi,C., Milne, R.G y Boccardo, G. 1988. In Vitro Synthesis of Double-Stranded RNA by Carnation Cryptic Virus-Associated RNA-Dependent RNA Polymerase. *Virology* 165 : 115-121.

Matthews,R.E.F. 1970 *Plant virology*. Academic Press.New York. U.S.A. p 751.

Matthews,R.E.F. 1993. *Diagnosis of plant Virus Diseases*. Ed. CRC Press, Inc. U.S.A

Montasser, M.S., Tousignant, M.E. and Kaper, J.M. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Disease* 75: 86-92.

Morris, T.J. 1983a Virus-specific double-stranded RNA: Functional role in RNA virus infection. *Plant infectious agents. Current communications in molecular biology*. Cold Spring Harbor Lab. 1983. p.80-83.

Morris, T.J., Dodds, J.A., Hillaman, B., Jordan, R.L., Lommel, S.A... y Tamaki, S.J. 1983b. Viral specific dsRNA: diagnostic value for plant viruses disease identification. *Plant Molecular Biology Reported* 4: 21-25.

Orozco, V.G., y Galindo, A.J. 1986. Ecology of tomato planta macho viroid. I. Natural host plantas, agroecosistem effect on viroid incidence and influence of temperature on viroid distribution. *Revista Mexicana de Fitopatología* 4 (2): 19-28.

Owen, J., y Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.

Palukaitis, P., Gonsalves, D., y Zaitlin, M. 1983. A comparison of four satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Plant Infectious agente. Current communications in molecular biology*. Cold Spring Harbor.Lab. p. 171-174.

Piedra, I.E. 2000. Caracterización Biológica parcial de los virus de *Leonotis nepetifolia* (LABIATAE: ORNAMENTAL) EN EL Valle de Atlixco Puebla, México. Tesis de Maestría. UNAM. ENEP-Iztacala. México.

IZT.

Pontis., V.R.E. Virosis. En: Fitopatología curso moderno (Sarasola., A.H y Rocca de Sarasola., M.A. Editors). Ed Hemisferio sur. Tomó III. pp. 61-65.

Ramírez L. M.R. 1990. La investigación interdisciplinaria y el manejo integrado de enfermedades. Rev. Méx. Fitopatología 8 (2) : 201-205.

Reddy, D.V.R., y Wightman, J.A. 1988. Tomato Spotted Wilt Virus: thrips transmisión and control. En Advances in Disease Vector research. (editor Harris K.F.). New York. Vol. 5. paginas 203-220.

Rezaian, M.A., Krake, L.R., Cunying, Q., Hazzalin, C.A. 1991. Detection of virus-associated dsRNA from leafroll infect grapevines. Journal of Virological Methods. 31 (2/3): 325-334.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

Silva V. S. y Delgadillo S.F. 1993. Virosis de la sandía (*Citrullus vulgaris Sch.*) en el norte de Sinaloa. Rev. Méx. Fitopatología 11(2) : 175-179.

Stephen, J.G., Turpen, T., Carrington, J.C., Morris, T.J., Jordan, R.L., Dodds, J.A., Grill L.K. 1983. Rapid Detection of plant RNA viruses by Dot blot hybridization. Plant. Mol. Biol 1(1): 21-25

Tercero, J.C., Dinman, J.D y Wickner, R.B. 1993. Yeast MAK3 N-Acetyltransferase Recognizes the N-Terminal Four Amino Acids of the Major Coat Protein (gag) of the L-A Double-Stranded RNA Virus. Journal of Bacteriology. 175 (10): 3192-3194.

Valverde, R.A., Nameth, S.T. y Jordan, R.L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease 74: 255-258.

Walkey D.G.A. 1991. Applied Plant Virology. Edit. John Wiley & Sons. New York.



U.N.A.M. CAMPUS