

31867

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

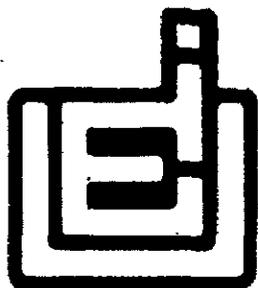
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA

“CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA PARCIAL DE LOS VIRUS
DE *Leonotis nepetifolia* (LABIATAE: ORNAMENTAL) EN EL VALLE
DE ATLIXCO PUEBLA, MÉXICO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE RECURSOS VEGETALES
P R E S E N T A
ELIAS PIEDRA IBARRA

273172

DIRECTOR Y ASESOR:
DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de México, Enero 2000.



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.

LOS ENSAYOS DE INMUNODETECCION VIRAL Y EL MANTENIMIENTO DE LAS
PLANTAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZARON EN EL
LABORATORIO DE VIROLOGIA AGRÍCOLA DEL DEPARTAMENTO DE
FITOPATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHAPINGO CON LA
ASESORIA DE MARIO SALAZAR SEGURA

EL TRABAJO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PRESENTADO EN ESTE
TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL CINVESTAV UNIDAD
ZACATENCO CON LA ASESORIA DE LA BIOLOGA LOURDES MORALES ROJAS

A Bernardino Ibarra López

*Un hombre en la palabra y en los hechos,
amante de su esposa y familia,
de Dios, la tierra y la vida.*

Índice

	Página
Resumen	1
I.- Introducción	3
II.- Revisión de literatura	7
II.1.- Virus en cultivos anuales mexicanos	
II.1.1.- Virus de Gramíneas	7
II.1.2.- Virus de Leguminosas	8
II.1.3.- Virus de Cucurbitáceas	10
II.1.4.- Virus de solanáceas	12
II.2.- Métodos utilizados para la identificación y caracterización de virus de plantas	
II.2.1.- Rango de Hospederos	14
II.2.2.- Microscopía electrónica	14
II.2.3.- Serología	15
II.2.4.- Análisis de perfiles electroforéticos de ácidos nucleicos	15
III.- Justificación y objetivos	17
IV.- Materiales y métodos	
IV.1.- Descripción botánica de <i>Leonotis nepetifolia</i>	19
IV.2.- Descripción del sitio de colecta	19
IV.3.- Aislamiento, identificación y caracterización biológica de virus	
IV.3.1.- Separación e identificación de virus por hospederos indicadoras y diferenciales	20
IV.3.2.- Transmisión con biovectores	21
IV.3.3.- Transmisión por semilla	21
IV.4.- Purificación de virus	21
IV.5.- Obtención de antisuero específico	22

IV.6.- Observación de partículas virales por microscopia electrónica	22
IV.7.- Análisis de inclusiones virales por microscopia óptica	23
IV.8.- Inmunodetección de virus	
IV.8.1.- Inmunodetección enzimática (ELISA) ligado a enzima fosfatasa alcalina	23
IV.8.2.- Inmunodetección por doble difusión en agar	24
IV.9.- Extracción y análisis electroforético de RNAdc viral en geles de poliacrilamida	
IV.9.1.- Obtención de marcadores y controles negativos	24
IV.9.2.- Extracción de RNAdc de tejido vegetal	25
IV.9.3.- Separación electroforética de RNAdc	26
V.- Resultados	27
VI.- Discusión de resultados	53
VII.- Conclusiones	56
VIII.- Bibliografía	57

Resumen

El Cordón de San Francisco (*Leonotis nepetifolia*) es una planta ornamental introducida a nuestro país probablemente de Sudáfrica. Esta planta se utiliza principalmente como follaje seco en arreglos florales. Eventualmente se cultivó en el Valle de Atlixco, pero actualmente sobrevive como maleza en los márgenes de los canales de riego, en donde crece en colonias más o menos densas. Esta planta es resistente a condiciones de sequía, suelos alcalinos y pobres; su propagación es por semilla, la cual se produce abundantemente y tiene una viabilidad muy alta. El Cordón de San Francisco no es competitivo con los cultivos de la región, pero se han localizado colonias de plantas que manifiestan clorosis, mosaicos de color amarillo, enanismo y proliferación de hojas, síntomas al parecer de origen viral. Estas colonias crecen y están asociadas a cultivos de cebolla, alfalfa, frijol ejotero, tomate de cáscara, gladiolo, crisantemo, terciopelo, cempoaxóchitl, calabaza y numerosas especies menores, varias de las cuales son afectadas por diversos virus. Por las características antes descritas, es probable que varios de los virus que afectan a los cultivos señalados se encuentren y sobrevivan en las plantas de *L. nepetifolia* en el Valle de Atlixco, por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar a los virus que afectan al Cordón de San Francisco en Atlixco Puebla.

Se colectaron plantas de *L. nepetifolia* con síntomas de mosaicos de color amarillo, enanismo y proliferación foliar. Los virus se separaron por transmisión mecánica de tejido enfermo macerado en solución amortiguadora de fosfatos-DIECA 0.01 M, pH 7.0, se realizaron pruebas de transmisión por medio del áfido *Myzus persicae* a rango de hospedantes diferenciales e indicadoras; pruebas serológicas de ELISA (Agdia Co.), microscopia electrónica, así como análisis electroforética de RNA de doble cadena (RNAdc) que permitieron establecer la presencia de tres virus.

Se separaron por transmisión mecánica a tres virus. El primero causó moteado y mosaico en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* y *N. occidentalis*), alfalfa (*Medicago sativa*), chícharo (*Pisum sativum*) y moteado sistémico en melón (*Cucumis melo*), pepino (*C. sativus*) y en calabaza gray zuchinii (*Cucurbita pepo*); lesiones cloróticas locales en *Chenopodium quinoa* y *Chenopodium amaranticolor*; en *Datura stramonium* se observó moteado sistémico ligero. Las pruebas serológicas de ELISA, la extracción y electroforesis de RNAdc en geles de poliacrilamida al 6% y la microscopia electrónica indicaron que el

patógeno separado era el virus mosaico del pepino CMV (Cucumber Mosaic Virus. Cucumovirus). Otro virus aislado causó lesiones locales necróticas y después mosaico sistémico severo con deformación de hojas apicales en *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor* y *Gomphrena globosa*. *Datura stramonium* no presentó ninguna clase de síntomas por inoculación mecánica. Las pruebas serológicas de ELISA, la microscopia electrónica, la extracción y electroforesis de RNAdc en geles de poliacrilamida 6%, confirmaron que este virus es el virus mosaico de la alfalfa. AMV (Alfalfa Mosaic Virus. Alfamovirus). Estos dos virus fueron transmisibles en 100% a diversas plantas del rango de hospedantes utilizando al vector *Myzus persicae*. El tercer virus aislado causó lesiones cloróticas locales en *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* L. *nepetifolia*, lesiones necróticas locales en *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* y *N. glutinosa*. Mosaico y deformación foliar en *Pisum sativum*, mosaico ligero en *Lycopersicon esculentum*, mosaico intenso y deformación foliar en *Nicotiana occidentalis*, entre otros. Las pruebas serológicas ELISA, la microscopia electrónica, la extracción y electroforesis de RNAdc indicaron que el virus aislado es el Virus Mosaico del Tabaco. TMV (Tobacco Mosaic Virus. Luteoviridae). Los análisis electroforéticos de RNAdc mostraron la presencia de un RNA de bajo peso molecular asociado al CMV que probablemente corresponda al CARNA-5 y que no pudo ser aislado.

La detección de CMV, AMV y TMV infectando a *Leonotis nepetifolia* indicó que esta planta es un hospedero alternativo muy importante para la sobrevivencia y como fuente primaria de inóculo de los tres virus.

I.- Introducción

Los virus han sido reconocidos como entidades biológicas desde hace aproximadamente cien años. El primer reporte que los presentó como unidades pequeñas y con identidad hereditaria propia apareció en 1898 cuando M.W. Beijerinck describió al virus mosaico del tabaco (TMV) y F. Loeffler identificó otros virus responsables de enfermedades en animales. Durante los cincuenta años siguientes se descubrieron una gran cantidad de virus de plantas, animales y de bacterias, se corroboró su capacidad de atravesar filtros a prueba de bacterias, se desarrolló el concepto que los considera parásitos intracelulares obligados. En 1935, W. M. Stanley aisló y purificó al TMV y le consideró constituido por proteínas, dos años después, F.C. Bawden y N.W. Pirie reportaron la presencia de ácidos nucleicos en el mismo virus. Fue hasta 1952 cuando los experimentos de Hershey y Chase con *Escherichia coli* y con un fago de la serie T, demostraron la capacidad infectiva del DNA del fago y en 1956 cuando se demostró la infectividad del RNA del TMV, estos experimentos además ayudaron a establecer la naturaleza del material genético. Durante este periodo se desarrollaron por separado la virología vegetal y animal hasta 1955 cuando se consideró a la virología como una disciplina unificadora dado que se reconoció que todos los virus poseen características fisicoquímicas y estructurales comunes (Luria et al. 1978).

Los virus consisten de ácido nucleico (RNA o DNA) envuelto por una cápside de naturaleza proteica. Los ácidos nucleicos contienen la información necesaria para la replicación y diseminación viral utilizando parte del sistema enzimático de bacterias, plantas, animales u hongos. Alrededor del 99% de los virus que infectan plantas almacenan su información genética en moléculas de RNA, por lo cual durante mucho tiempo se creyó que los virus de vegetales exclusivamente poseían RNA de cadena sencilla (RNAs) o de doble cadena (RNAdc), sin embargo, en algunos de los *Caulimovirus* y en *Geminivirus* la información genética está almacenada en moléculas de DNA de doble cadena (DNAdc) y de cadena sencilla (DNAs) respectivamente. Los genes o marcos de lectura (Open Reading Frames) de algunos virus de RNA están contenidos en una sola molécula; a éste tipo se le conoce como monopartitas, otros, de RNA o DNA, tienen sus genes distribuidos en dos o más moléculas o componentes y se les conoce como bipartitas, tripartitas o multipartitas.

La cápside viral está constituida por subunidades o monómeros proteicos cuyo arreglo determina la morfología del virus al microscopio electrónico. Vistos así, los virus de plantas aparecen como isométricos (esféricos o icosaédricos), baciliformes o en forma de varilla alargada rígida o flexible. El tamaño de los primeros puede oscilar entre 17 y 70 nanómetros (nm), el de los baciliformes generalmente alrededor de 300 nm y finalmente los virus en forma de varilla pueden medir hasta 2000 nm de longitud. (Walkey 1985).

Los virus de plantas hasta hace algunos años eran agrupados y nombrados con base en el hospedante principal y en la enfermedad producida, a partir de 1976 los criterios en los que se basa su clasificación han sido modificados. Actualmente la clasificación atiende a la naturaleza molecular del genoma viral, al número (1 o 2) de filamentos que constituyen a la molécula hereditaria, a la facilidad para la transcripción reversa y a la polaridad del genoma. Siguiendo estos criterios los virus están clasificados en 233 géneros, de los cuales 204 pertenecen a 64 familias y los 29 restantes no han sido asignados a taxones superiores. Se reconocen 3 órdenes: *Caudovirales*, virus de DNA doble cadena (DNA_{dc}), con tres familias (*Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*), *Mononegavirales*, virus de RNA de cadena sencilla (RNA_s) de sentido negativo que infectan animales o plantas, y que incluye cuatro familias (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y *Bornaviridae*) y el orden *Nidovirales*, virus de RNA_s de sentido positivo, con dos familias (*Coronaviridae* y *Arteviridae*). Al menos 64, la mayoría de RNA, de los 233 géneros reconocidos, tienen representantes que infectan a plantas cultivadas o silvestres (Pringle 1999).

Casi todas las plantas cultivadas en el mundo son susceptibles a la infección de virus o de agentes relacionados con ellos (virus crípticos, virus satélites, RNA satélite, etc.) sufriendo una disminución en la cantidad y/o en la calidad de sus productos. En cultivos anuales, como los cereales, la infección viral puede ocasionar la pérdida total de los cultivos en una estación particular; mientras que en los cultivos perennes, las infecciones virales pueden causar pérdidas más severas ya que los árboles infectados pueden pasar desapercibidos y permanecer así toda su vida permitiendo la diseminación de la enfermedad. Además, cuando son detectados los árboles enfermos deben eliminarse y con frecuencia el terreno no puede ser resembrado con la misma especie durante espacios temporales prolongados (Stevens 1990).

En la naturaleza los virus requieren para sobrevivir de una sucesión de hospedantes susceptibles en los que puedan multiplicarse, así como de mecanismos de transmisión efectivos que les permitan diseminarse de una planta a otra para generar las virosis en los cultivos. En el inicio y desarrollo de muchas enfermedades virales es tan importante la presencia y distribución de hospedantes silvestres como la presencia de los vectores que permiten su diseminación. El inóculo primario de virus puede provenir de distintas fuentes, en ocasiones puede ser de plantas del mismo cultivo, de plantas de diferentes cultivos o de malezas internas o circundantes al cultivo o incluso alejadas de éste. Las malezas circundantes pueden actuar como fuente de inóculo primario al permitir que los virus persistan de un ciclo de siembra a otro. De esta manera el conocimiento de las fuentes de inóculo primario y de los mecanismos utilizados por los virus para su diseminación en los cultivos son aspectos importantes para el diseño y establecimiento de medidas de control de las enfermedades virales (Rocha 1985, Walkey 1985).

La transmisión de virus más común en la naturaleza se da cuando insectos, hongos y/o nemátodos primero se alimentan o se reproducen en plantas con virosis sistémica y posteriormente en plantas sanas (Carter 1973). Entre los biovectores, los insectos son el grupo más importante en la transmisión de virus de importancia económica: de 381 especies de animales vectores, aproximadamente el 94% corresponden al phylum *Arthropoda* y el 6% al *Nematoda*. El 99% de los artrópodos vectores son insectos y de éstos 70% pertenece a los órdenes *Homoptera* y *Aphididae* (Harris 1981). La transmisión de virus por áfidos se ha agrupado en no persistente, persistente circulativa, persistente propagativa y semipersistente dependiendo del tiempo de adquisición, de retención y de la fase de latencia y transmisión (Stevens 1990).

Una vez que los virus han sido transportados de una planta a otra por medios naturales o artificiales y que se han introducido a las células del hospedante, la partícula se desensambla y su programa genético se empieza a expresar con la ayuda del equipo enzimático de la célula. De esta manera se inicia el proceso que culmina con la multiplicación del virus y con su diseminación de una célula a otra o de una planta a otra. Las estrategias utilizadas para la replicación viral varían con la naturaleza de la molécula que almacena la información genética. Por ejemplo, el RNA de los virus de RNA de cadena sencilla (RNAs) de sentido positivo, como el virus mosaico de la alfalfa (AMV), es

copiado en filamentos negativos que sirven como moldes para la síntesis de más cadenas positivas que en las etapas tempranas de la infección pueden ser traducidas o incorporadas en cápsides en la etapa tardía (Nassuth et al 1983, Nassuth and Bol 1983). En los virus de RNA de sentido negativo (*Mononegavirales*) el material genético sirve para la generación de RNA mensajeros que serán traducidos durante la etapa temprana, mientras que en la etapa tardía el mismo filamento negativo será replicado para su incorporación en las cápsides (Conzelmann 1998).

El movimiento viral a través de la planta puede realizarse de dos maneras: de célula a célula adyacente vía plasmodesmos, con velocidades de micras por hora o bien de hoja a hoja vía floema y con velocidades de centímetros por hora. En estos procesos se requiere de la interacción de proteínas virales y hospedantes. Algunos virus (p. ej. *bromovirus*, *comovirus*, *carmovirus* y *cucumovirus*) requieren de la proteína del movimiento (MP) y de la proteína de la cápside (CP) para trasladarse de una célula a otra, mientras que otros (p. ej. *tobamovirus* y *tobravirus*) también requieren de las proteínas para el movimiento de un órgano a otro vía floema (Séron et al. 1996). Para la diseminación o movimiento de los virus de una planta a otra, dada su incapacidad para penetrar la cutícula del hospedante y establecer la infección por sí mismos, se requiere de una herida que se puede lograr mediante contacto directo, injertos naturales y artificiales, vectores habitantes del suelo (hongos o nemátodos) o por vectores aéreos (insectos o ácaros) (Rocha 1985, Walkey 1985).

En México se han detectado y descrito diversos virus en cultivos de frijol, maíz, trigo, cebada, tomate, chile, tomate de cáscara, papa, papaya, pepino, melón y sandía entre otros. Pueden citarse como los más importantes, por su distribución, tipo de hospedantes y por las pérdidas económicas que causan el: virus mosaico del tabaco (TMV), el jaspeado del tabaco (TEV), el de la mancha anular del tabaco (TRSV), el huasteco del chile (PHV), el mosaico de la sandía variantes 1 y 2 (WMS-1 y WMS-2 respectivamente), el mosaico del pepino (CMV), el mosaico de la calabaza y el mosaico amarillo de la calabaza italiana zuchini (ZYMV) entre otros (Alvizo y Rodríguez 1987).

II.- Revisión de literatura

En México la información en torno a los virus que infectan a las especies de interés económico se empezó a generar a partir de los años sesenta. Actualmente se tienen bien caracterizados los virus y cuantificados los daños que ocasionan en los distintos cultivos y en las distintas zonas agrícolas del país. A continuación se presenta una revisión de los virus que afectan a los cultivos anuales de México.

La caracterización de los virus implica la combinación de diversos métodos. En la segunda parte de esta sección se hace una breve presentación del fundamento de cada uno de ellos, también se mencionan las ventajas y desventajas que presentan.

II.1.- Los Virus de las plantas anuales cultivadas en México.

II.1.1- Virus de Gramíneas

La importancia de las gramíneas en México se refleja en el área destinada para su cultivo: 12 194 039.8 Ha. Las especies más importantes son: maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum sativum*), avena (*Avena sativa*), sorgo (*Sorghum vulgare*) y alpiste (*Phalaris canariensis*) (INEGI 1997).

En el mundo se han reportado cerca de 40 virus que infectan el maíz (Damsteegt 1977), en México los primeros reportes se dieron a finales de 1960 cuando se observaron plantas con síntomas que en 1973 fueron relacionados con el virus mosaico enanismo del maíz (MDMV) (Nobmann 1973) y en 1980 con el virus rayado fino del maíz (MRFV) (Rocha et al 1980). A su vez, entre 1979 y 1980 se identificó al virus mosaico del maíz (MMV) (Rocha et al. 1982); finalmente, en 1982 se identificó al virus moteado clorótico del maíz (MCMV) (Tapia 1986).

Los daños ocasionados por el virus MRFV varían en función del genotipo del hospedero y de las condiciones climáticas, entre otros factores. Se ha establecido que si la infección se realiza en estado de plántula se puede alcanzar una reducción en el rendimiento del 92% y que este virus se encuentra ampliamente distribuido en importantes áreas maiceras de los estados de México, Veracruz, Tabasco, Morelos, Nuevo León, Michoacán, Jalisco, Tlaxcala, Hidalgo, Zacatecas, Puebla y Guanajuato (Rocha 1981).

En nuestro país la incidencia del MDMV fluctúa de 10 a 30% y puede ocasionar una disminución en la productividad de hasta 61% cuando es inoculado en plantas de dos hojas. Tiene una distribución extensa en los estados de Jalisco, Guanajuato, México, Michoacán, Querétaro, Veracruz, San Luis Potosí, Nuevo León, Sinaloa, Morelos y Tamaulipas. Se ha establecido que para su diseminación el “zacate johnson” es un hospedero invernante muy importante, dado que a partir de él, algunos áfidos lo diseminan de manera extensiva (Nobmann 1973).

El virus mosaico de maíz (MMV) ha ocasionado infecciones del 20 al 70% en el sureste de México (Campeche, Chiapas, Tabasco y Yucatán) disminuyendo la producción al reducir el tamaño y el llenado de la mazorca (Rocha et al. 1982).

Los daños ocasionados por el virus moteado clorótico del maíz MCMV son más severos (hasta 70%) cuando se encuentra en complejos con el VMEM o con virus mosaico del rayado del trigo (TRMV) y se ha identificado en los estados de Guanajuato, Michoacán, Querétaro y Veracruz (Delgadillo 1987).

Solamente se han reportado dos virus que infectan al resto de gramíneas: el virus mosaico estriado de la cebada (MECV) y el virus del enanismo amarillo de la cebada (VEAC). Aún cuando también se ha encontrado al VEAC en trigo y avena, la cebada es el hospedero principal, alcanzando en este cultivo las pérdidas en el rendimiento hasta el 75%, sin embargo en los estudios de invernadero en México se ha calculado un 32% máximo. El VEAC es responsable de la virosis de mayor importancia mundial, ataca a todos los cereales de grano pequeño (trigo harinero, trigo duro, cebada, avena y triticale) y además infecta al menos a 100 especies de las gramíneas (maíz y arroz entre ellas). En México se le ha reportado con mayor incidencia en cebada, aún cuando también se le encuentra en trigo, sin embargo no se han realizado estudios que establezcan la disminución del rendimiento generada por este virus (Burnett y Gilchrist 1987).

II.1.2.- Virus de Leguminosas

Las especies de esta familia cultivadas en México son: cacahuete (*Arachis hypogaea*), chícharo (*Pisum sativum*), ebo (*Vicia sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer*

arietinum), haba (*Vicia faba*), jícama (*Pachirrizus erosus*), lenteja (*Lens esculenta*) y soya (*Glycine max*). La superficie sembrada en el ciclo 1990-91 alcanzó los 34 624 321.8 Ha, de las cuales 8.12% corresponden al frijol (INEGI 1997).

Las enfermedades virales, al disminuir la producción en algunas áreas agrícolas, son consideradas una de las limitantes más importantes para el cultivo de leguminosas. De los 16 virus que se han reportado a nivel mundial, en México se encuentran en forma extensiva los 4 siguientes: Virus del mosaico común (BCMV), del mosaico sureño (BSMV), del mosaico dorado (BGMV) y el virus del moteado clorótico del frijol (BYSV).

El virus del mosaico común del frijol (BCMV) se encuentra ampliamente diseminado en las zonas tropicales y semitropicales de México en donde no se le considera limitante en la producción, la excepción se presenta en la región de El Bajío, donde la superficie sembrada en el ciclo primavera ha disminuido así como los rendimientos unitarios de la variedad Flor de Mayo (en 43%) (Lepiz 1986).

La enfermedad causada por el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV) se ha detectado en las regiones del Golfo de México y en los estados de Nayarit y Sinaloa en donde se le considera un problema serio dado que la incidencia oscila entre 80 y 100% (Jiménez 1987). En la región de las Huastecas, en las siembras con variedad Jamapa, el BGMV reduce la producción hasta 54%, mientras que en Sinaloa la disminución fluctúa entre 30 y 40%. En el estado de Sinaloa las pérdidas alcanzan el 30% en siembras de otoño-invierno y más del 50% en las de invierno primavera (Lepiz 1986).

El virus del mosaico sureño (BSMV) ha sido reportado en las áreas frijoleras del Centro, del Golfo y del Noroeste de México en donde causa daños menores (Jiménez 1987).

El virus del moteado amarillo también llamado del moteado clorótico del frijol (BYSV) ha sido aislado de plantaciones del Noroeste, principalmente en Sonora y Sinaloa. Su efecto en el rendimiento es leve, pero cuando se encuentra en asociación con BSMV produce daños severos en los cultivos (Jiménez 1987).

Para el resto de las especies de esta familia cultivadas en México no existen reportes de incidencia ni de daños en la producción, sin embargo en este trabajo se realizaron muestreos en cultivos de haba en el estado de Puebla y se determinó la presencia, por análisis de RNA doble cadena (RNAdc), de AMV en plantas con "hojas arrosietadas" (datos no presentados).

II.1.3.- Virus de Cucurbitáceas

Las especies pertenecientes a esta familia actualmente cultivadas en México son: *Cucúrbita pepo*, *C. mostacha*, *C. máxima*, *C. mixta*, *Cucumis melo*, *C. sativus* y *Citrullus lanatus*. A nivel mundial se ha reconocido a las enfermedades virales como los principales obstáculos en el cultivo de estas especies y se han reportado cerca de 30 virus y viroides que las infectan de manera natural. En nuestro país desde hace tiempo se han identificado los virus que se encuentran con mayor frecuencia en estos cultivos en infecciones simples o en combinaciones: el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus mosaico de la calabaza (SqMV), virus del mosaico de la sandía (WMV-2), el virus de la mancha anular del papayo (PRSV-S), el virus de la mancha anular del tabaco (TRSV) y el virus mosaico amarillo zucchini (ZYMV) (Alvizo y Rodríguez 1987).

En la década de los ochentas en México se reconocía al Valle de Apatzingán Michoacán como la principal zona productora de melón (*C. melo*), el cultivo se inició en la década de los cuarentas y tuvo su máximo en los setentas. En el ciclo 1985-86 se sembraron 7580 Ha que producían principalmente fruto con calidad de exportación, sólo cinco años después, en el ciclo 1990 – 1991, se sembraron en el estado un total de 161.276 Ha (INEGI 1997), esta drástica reducción en la extensión de terreno dedicadas a su cultivo ha sido atribuida por varios autores a la incidencia de las enfermedades virales. En 1987 se realizaron muestreos durante el ciclo otoño-invierno en 10 municipios del Valle de Apatzingán y se identificaron en infecciones simples y combinadas al WMV, CMV, TAMV (Delgadillo et al. 1987).

El sur de Tamaulipas es otra región tradicionalmente importante en la producción de melón para exportación. En ese estado aparecieron cultivos con síntomas atribuidos a virosis en 1988 y el rendimiento medio regional se redujo de 600 a 100 cajas/ha. Los virus identificados por serología fueron: CMV, SqMV, WMV-2, PAMV y TAMV los que se encontraron formando cuatro complejos (Yáñez-Morales y Delgadillo 1991).

En el Valle del Grullo y Autlán, Jalisco se sufrió una reducción en la producción de melón calidad exportación del 95% en el ciclo 1983-84 incluso, las virosis, determinaron la desaparición de esta región como entidad productora (Garzón 1985).

En los Estados de Baja California, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco y Veracruz se registraron hasta 1987 las virosis en melón y se atribuyeron a la

participación de los mismos patógenos que en los casos anteriores (Alvizo y Rodríguez 1987).

En el estado de Morelos, en 1994, mediante serología (ELISA) se identificaron virus en plantas de pepino y de calabaza zucchini en las zonas norte y sur del estado. Se reportó al SqMV como el más frecuente en los dos ciclos de cultivo anuales, seguido por el CMV y ZYMV (Aguilar - Rios y Lozoya 1994).

En 1988 en la zona productora de calabaza variedad italiana y calabaza de guía de los Mochis y Culiacán Sinaloa, se observó un síndrome no reportado anteriormente en cucurbitáceas. Los análisis de este material permitieron determinar al geminivirus enrollamiento de la hoja de la calabaza (SqLCV) como agente causal (Silva et al. 1994).

El cultivo de la calabacita tipo verde y tipo amarillo es de los más explotados en el Valle del Mayo Sonora, su producción está destinada en su totalidad a la exportación. Recientemente se observaron síntomas atribuidos a virosis en los cultivos. Se ha determinado la presencia de los virus: CMV, WMV, ZYMV, SqMV y SqLCV, los cuales en infecciones individual o en complejos limitan la producción de frutos en fechas tempranas y tardías evitando su colocación en el mercado de exportación (Ramírez – Arredondo y Gallegos 1995). El virus enrollamiento de la hoja de la calabaza ha sido asociado con las disminuciones del 40% en el crecimiento de plantas de calabaza y de hasta 70% en plantas de sandía observados en el mismo valle (Ramírez – Arredondo et al. 1995). La Comarca Lagunera en Torreón Coahuila es la zona mexicana donde el cultivo de melón se realiza para comercializar en el mercado nacional. En esta zona se ha incrementado la incidencia de enfermedades virosas y se ha reducido el rendimiento regional promedio de 20 a 6 ton/ha a partir de 1990. Entre los virus reportados, los más comunes en esta entidad son: CMV, WMV, PRSV y SqMV (Aguilar - Rios 1994). En esta localidad se colectaron 63 muestras de malezas (*Solanaceae*, *Malvaceae*, *Cruciferaeae*, *Leguminosae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae*) y por serología ELISA se determinó en 31 de ellas la presencia de al menos un virus, siendo CMV el más frecuente. Se ha propuesto que los virus que afectan al melón en esta región se mantienen en estas herbáceas durante el invierno y que posteriormente son transmitidos por insectos vectores (Jiménez-Díaz 1996).

II.1.4.- Virus de Solanáceas

Las especies cultivadas en México son: Chile (*Capsicum annum*), Tomate rojo (*Lycopersicon esculentum*), Papa (*Solanum tuberosum*), Tabaco (*Nicotiana tabacum*) y Tomate verde o tomatillo (*Physalis ixocarpa*), de las cuales se cultivaron 299 679 Ha en el ciclo 1990-91 (INEGI 1997).

Por su distribución en el país y por las pérdidas económicas que causan, los virus más importantes en tomate (*Lycopersicon esculentum*) son: virus mosaico del tabaco (TMV), mosaico del pepino (CMV), jaspeado del tabaco (TEV), enanismo arbustivo del tomate (TBSV), enchinamiento de la hoja del tomate (TCLV), mancha anular del tabaco (TRSV) y el virus huasteco del chile (PHV). También se han identificado virus menos frecuentes: en Puebla se identificó al Virus X de la Papa (PVX) (Rodríguez 1983), en Sinaloa se determinó la presencia del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) en cultivos de *Physalis* sp. y malezas distribuidas por toda la región (Verdugo 1989). En Morelos se aisló y caracterizó al viroide de la Planta Macho del Jitomate PMTV (Galindo et al. 1982). El TBSV fue reportado desde 1965 y asociado con la enfermedad "pinto del jitomate"; en plantaciones del estado de Hidalgo ocasionó manchas en 29% de los frutos y disminuyó entre 30 y 100% su valor en el mercado (Garzón 1987). En Autlán Jalisco, en 1986, las virosis en jitomate alcanzaron incidencia del 70 al 100% y ocasionaron la desaparición de su cultivo para el siguiente ciclo (Martínez 1990).

En 1997 en Puebla a partir de cultivos de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) se aisló e identificó un grupo de virus, entre los que se encontraban algunos ampliamente conocidos a nivel mundial: CMV, TEV, TRSV, TMV y geminivirus, además se encontraron otros hasta entonces desconocidos o no descritos en nuestro país: se aisló un virus, fácil de transmitir mecánicamente y por injerto a solanáceas, que causó un mosaico y moteado amarillo brillante (cálico), al que se denominó *Physalis* cálico virus (PhCaV) (De la Torre 1997).

En México, a partir de 1970 han aumentado los reportes de virosis en cultivo de chile, en ese año se identificó en Guanajuato, Tamaulipas y Sinaloa al virus del jaspeado del tabaco (TEV), posteriormente se le localizó en los estados de Jalisco y Veracruz. En Tamaulipas se registraron daños entre 10 y 100%, en Guanajuato se observaron lotes con incidencia del 100% y en Autlán Jalisco la incidencia alcanzó 90% (Garzón 1987).

El virus del mosaico del pepino (CMV) se encontró por primera vez, en cultivares de chile, a mediados de los setentas en Tamaulipas, en el El Bajío y en el Valle de Cualiacán Sinaloa, actualmente se encuentra además diseminado en los estados de Sonora, Nayarit, Michoacán, Morelos, Guerrero, Veracruz y Tabasco, donde frecuentemente se le ha encontrado asociado a otros virus generando daños que oscilan del 8% al 100% (Garzón 1987).

El virus que infecta a plantas de chile más ampliamente diseminado en México es el mosaico del tabaco (TMV), se le reportó por primera vez en 1974 en el Valle de Culiacán y en el Bajío mexicano, actualmente se sospecha de su presencia en todas las áreas agrícolas del país, sin embargo son pocos los trabajos que han evaluado los daños en estas plantaciones (Garzón 1987).

En 1986 se añadieron a los virus que infectan a los chilares mexicanos el virus Y de la papa (PVY) y el virus de la mancha anular del tabaco (TAV) (Martínez 1987). En esa década en el estado de Sonora se observaron cultivos con síntomas atribuidos a virus, en 1995 se determinó que estaban ocasionados por el virus huasteco del chile (PHV) (Ramírez-Arredondo et al. 1995), simultáneamente en los Valles Altos de México (Edo. de México, Puebla y Morelos) se reportó la presencia del mismo virus en plantas de tomate, chile, calabaza, pepino y tomatillo (De la Torre 1995), así se estableció la presencia de este geminivirus en los cultivos mexicanos y a partir de entonces se le ha localizado en chilares de prácticamente todo el país. En ese mismo año se reportó que el PHV asociado al virus del chile jalapeño (PJV) eran los responsables del “rizado amarillo del chile” (Torres - Pacheco 1995).

De las más de 20 enfermedades virales que atacan a la papa (*Solanum tuberosum*), en México sobresalen las ocasionadas por el virus Y (PVY), el virus X (PVX) y el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV). En ocasiones la incidencia de virosis alcanza hasta el 80% y representa el problema más importante en la producción de papa comercial y de semilla (Piña 1986). El PVX en infecciones simples puede generar disminuciones en la producción de hasta el 40% pero además, en infecciones múltiples con otros virus puede presentar sinergia (Díaz-Valasis et al. 1995).

Aún cuando la mayoría de las especies del género *Nicotiana* es susceptible a una gran cantidad de virus vegetales, los reportes de la incidencia de virosis en México no son

numerosos, tampoco se tiene mucha información acerca de los daños ocasionados en su producción.

II.2.- Medios utilizados para la identificación y caracterización de virus de plantas

II.2.1.- Rango de hospedantes

El rango de hospedantes y los síntomas causados en plantas susceptibles son una herramienta importante en la identificación de los virus de vegetales que actualmente se utiliza en combinación con otros procedimientos.

La determinación experimental del rango de hospedantes está afectada por la sensibilidad del ensayo para detectar la presencia del virus, por lo que algunos autores sólo incluyen dentro del rango a las plantas que además de ser infectadas, permiten la diseminación sistémica del virus. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta, que los síntomas pueden diferir debido a la variación de los patógenos en poblaciones naturales, a la variabilidad de los hospederos utilizados y a las condiciones ambientales (Dawson and Hilf 1992).

II.2.2.- Microscopia electrónica

La observación de la forma y del tamaño de la partícula viral es un requisito importante para identificar al agente causal de enfermedades virales, constituye una vía rápida para establecer, al menos, el grupo al que pertenece el patógeno. Las muestras para analizar pueden ser de savia infectada o bien de muestras purificadas que pueden someterse a procedimientos rápidos y relativamente baratos como el sombreado metálico o bien a tinción negativa. Se han utilizado otras técnicas relativamente sofisticadas que pueden aportar información importante acerca de los procesos de replicación y transporte de los virus en la planta, pero que requieren de una cierta especialización y que resultan caras (Roberts 1986).

II.2.3.- Serología

Las pruebas serológicas son consideradas como definitivas en la identificación de más de 300 virus de plantas y son una herramienta importante en el establecimiento de las relaciones entre cepas y aislados virales, se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse a los antígenos específicos.

Los antisueros, obtenidos usualmente en conejos, pueden utilizarse para ensayos de precipitación en pruebas de doble difusión en agar, o conjugados con compuestos radioactivos fluorescentes o con enzimas en ensayos ELISA. De éstas, la técnica más utilizada actualmente es la de sándwich directa o indirecta con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina o peroxidasa. Debe tenerse en cuenta que si no se utilizan otros medios de detección puede pasar inadvertida una gran cantidad de virus o agentes infecciosos relacionados con ellos, como viroides y satélites de virus (Walkey 1985).

II.2.4.- Análisis de perfiles electroforéticos de ácidos nucleicos

Durante la replicación de los virus de RNA en las plantas se produce un intermediario de RNA doble cadena (Replicative Forms) resistente a la degradación enzimática que normalmente no se encuentra en las plantas sanas. Se ha desarrollado un método para el aislamiento y análisis de los RNAdc a partir de plantas y hongos infectados con virus utilizando la capacidad del RNAdc para adherirse a la celulosa en solución amortiguadora (STE) que contiene etanol al 16%. El RNA extraído puede caracterizarse por separación electroforética en geles de agarosa o poliacrilamida, o puede hidrolizarse y marcarse o desnaturalizarse y usarse para preparar DNA complementario (cDNA).

Los grupos virales pueden distinguirse en primer término por la movilidad de los RNAdc de peso mayor y por la movilidad, cantidad, peso, intensidad de bandas, etc de los RNAdc adicionales. Los miembros de un grupo pueden distinguirse en la mayoría de los casos por pequeñas diferencias en la movilidad de los componentes mayores y por la presencia, número e intensidad de los menores. Así mismo las diferencias en los patrones de migración pueden servir para distinguir incluso a nivel de cepas (Dodds 1987).

Algunos inconvenientes del uso de esta técnica son: sólo permite detectar los virus de RNA, se requiere conocimiento del número y tamaño del genoma de los distintos grupos virales; sin embargo, presenta ventajas importantes: permite la detección de mezclas de virus, de virus crípticos y de RNAs satélites, además la técnica resulta útil dada la rapidez y su bajo costo (Valverde et al. 1990).

III.- Justificación y objetivos

Dados los daños que las enfermedades virales pueden ocasionar en las plantas cultivadas, y los cuantiosos daños económicos que son generados a las comunidades agrícolas, y la importancia que las malezas tienen en la diseminación de enfermedades virales que afectan a las especies cultivadas en México, y que el Valle de Atlixco Puebla es una de las regiones agrícolas más importantes del estado en la que se cultivan especies que son susceptibles a la infección por virus. En este trabajo se determinaron y se caracterizaron, biológicamente los virus que infectan a *Leonotis nepetifolia*, una planta ornamental de la familia *Labiatae*, aparentemente introducida de Sudáfrica y que se ha constituido como maleza presentándose durante todo el año en los linderos de los sembradíos del Valle de Atlixco con síntomas atribuidos a virosis.

Objetivo general

Caracterizar biológicamente los virus que infectan a la maleza *Leonotis nepetifolia*:*Labiatae* (Cordón de San Francisco) en la región agrícola de riego de Atlixco Puebla, México.

Objetivos particulares

Aislar y caracterizar los virus que infectan a *Leonotis nepetifolia* mediante plantas indicadoras y diferenciales.

Caracterizar, mediante ensayos inmunológicos, a los virus que infectan en forma natural a *Leonotis nepetifolia* y en las plantas indicadoras para establecer su identidad y participación en los síntomas producidos.

Caracterizar, mediante análisis de RNAdc, a los virus de RNA presentes en *L. nepetifolia* y en las plantas indicadoras y diferenciales susceptibles.

Determinar si los virus que infectan a *L. nepetifolia* son transmisibles por semilla.

Comprobar la transmisión de los virus de *L. nepetifolia* por insectos vectores.

Purificar los virus obtenidos a fin de obtener antisuero específico en conejos de la raza Nueva Zelanda.

Determinar mediante la morfología el tipo de partículas virales presentes.

Evaluar la participación ecológica – epidemiológica de *L. nepetifolia* en la diseminación de las enfermedades virosas en los cultivos aledaños de la zona agrícola de Atlixco Puebla.

IV.- Materiales y métodos

IV.1.- Descripción botánica de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Brown.

Planta herbácea, anual; tallos simples o ramificados desde la base, erectos, hasta de 2 m de alto, con pubescencia retrorsa; hojas sobre peciolo de 2 a 10 cm de largo, limbo ovado a ovado-deltoideo, en ocasiones lanceolado, de 2 a 12 cm de largo, por 1 a 6 cm de ancho, ápice obtuso o agudo, borde crenado a lobulado, base atenuada a subcordada, pubescente; inflorescencia en verticilios globosos, de 4 a 6 cm de diámetro, interruptos a lo largo del eje principal y en los secundarios, pedicelos de 1 a 2 mm de largo, brácteas ovadas o lanceoladas, pubescentes, bractéolas de 8 a 12 mm de largo, pubescentes, atenuadas en una punta rígida; cáliz de 1 a 1.5 cm (o 2.5 cm en fruto) de largo, glabro, con 8 a 10 dientes triangulares, el diente posterior sumamente largo y ancho, los demás pequeños; corola de 1.5 a 4 cm de largo, de color rojizo – naranja, muy vistosos, de aspecto aterciopelado, labio superior densamente pubescente, el inferior glabro o con escasos pelos; filamentos de 1.5 a 1.7 cm de largo; estilo de 3.8 a 4 cm de largo; mericarpos de más o menos 3 mm de largo. Dentro del Valle de México se le ha colectado en los municipios y delegaciones de Tequisquiác, Otumba, Villa G. A. Madero, Coyoacán y Xochimilco. Alt. 2250-2500 m. Orillas de caminos y de habitaciones humanas. Se le ha observado además en Texcoco y en otros sitios del Valle. Es una planta introducida de Sudáfrica como ornamental y naturalizada en muchas partes de América tropical. Se le menciona también como usada en la medicina popular (Rzedowski 1979).

IV.2.- Descripción del sitio de colecta

El municipio de Atlixco Puebla se localiza entre los 18° 55' latitud norte, 97° 56' de longitud oeste, su altitud es 1840 msnm. El clima corresponde a Cb(w1)(w)igw'': Templado lluvioso con temperatura media del mes más frío entre -3 y 18 °C y la del mes más caliente con temperaturas media mayor a 10 °C. Régimen de lluvias en verano, con

porcentaje menor al 5% de lluvias en invierno. La oscilación anual de las temperaturas medias mensuales es menor de 5°. El mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano. La localidad presenta canícula (García 1988). El suelo predominante es Fluvisol eútrico, el secundario es Regosol eútrico ambos con textura gruesa. Es una región agrícola de riego dedicada a cultivos anuales y semipermanentes, principalmente: maíz, cebolla, jitomate, calabaza, gladiolo, zempoalxóchitl, terciopelo y alfalfa (INEGI Cartas de uso de suelo y vegetación y Carta edafológica)

IV.3.- Aislamiento, identificación y caracterización biológica de virus

IV.3.1.- Separación e identificación de virus por plantas hospedantes indicadoras y diferenciales

Hojas de plantas de *Leonotis nepetifolia* con síntomas de virosis se maceraron con solución amortiguadora de fosfatos DIECA 0.02 M pH 7.2 en relación 1:2 (P/V). El macerado se frotó con hisopo de algodón con carborundum 620 mallas, sobre hojas de plantas indicadoras sanas de: *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo* var. Gray Zucchini, *Pisum sativum* var. Sta Elena, *Phaseolus vulgaris* var. Madero, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. xanthi, *N. occidentalis*, *Physalis ixocarpa*, *Lycopersicon esculentum* var. Royal Ace, y *Capsicum annuum* var. Ancho, *Vicia faba*, *Leonotis neptifolia*, *Heleantus annuum*, *Beta vulgaris* y *Medicago sativa*.

Para separar al mayor número de virus transmisibles mecánicamente, se seleccionaron plantas de *L. nepetifolia* con diferentes síntomas y con sus extractos se inocularon plántulas de especies indicadoras. Se escogieron plantas que mostraron diferentes síntomas, para inocular con sus extractos, a otros grupos. Los virus separados fueron mantenidos en *Nicotiana occidentalis*, *Chenopodium amaranticolor* y *Cucurbita pepo* como fuentes de inóculo fresco permanente o en tejido deshidratado.

Los conjuntos de plantas hospedantes que fueron utilizadas como controles negativos fueron frotadas con solución amortiguadora y carborundum.

IV.3.2.- Transmisión con biovectores

En las pruebas de transmisión por insectos se utilizó una colonia sana del pulgón *Myzus persicae*. Individuos ápteros se sometieron a un ayuno de 20 minutos, para después colocarlos con un pincel en *Nicotiana occidentalis* o *Cucurbita pepo* inoculadas mecánicamente 10 días antes del ensayo y con síntomas de virosis. Se permitió la alimentación – adquisición por un periodo de 30 minutos. Posteriormente, 20 pulgones fueron transferidos a un rango de hospederas sanas en las que se dejaron 60 minutos para permitir la alimentación - transmisión.

La transmisión se consideró como positiva por la aparición de los síntomas previamente observados en plantas susceptibles y en algunos casos por análisis electroforético de RNAdc.

IV.3.3.- Transmisión por semilla

En Atlixco Puebla, se colectaron semillas de plantas de *Leonotis nepetifolia* con y sin síntomas de virosis. En invernadero, se germinaron por triplicado lotes de 100 semillas de plantas sanas y enfermas, en recipientes de poliuretano y durante 60 días se dejaron crecer aisladas de plantas enfermas. Durante este periodo se inspeccionaron visualmente y por análisis de RNAdc.

IV.4.- Purificación de virus

100 gramos de hojas con síntomas (de *Nicotiana occidentalis* o *Cucurbita pepo*) de 15 a 20 días después de inoculadas y con síntomas de virosis, se homogeneizaron con 100 ml de K_2HPO_4 , 0.1M, ácido ascórbico 0.1M y 0.2 M de EDTA, pH 7.1 (ajustado con KOH), y se filtraron con manta. El filtrado fue rehomogeneizado con 100 ml de butanol - cloroformo (1:1). La emulsión se centrifugó a 8 000g durante 15 min. A la fase acuosa recuperada, se le agregó 5% (P/V) de Polyetilenglicol (P.M. 8000) y se centrifugó durante 15 min a 8000g, la

pastilla obtenida fue resuspendida en 20 ml de solución de fosfatos (0.01M NaH_2PO_4 , pH 7.0 ajustado con NaOH). La pastilla después de dos ciclos de centrifugación alta - baja (8000g y 76000g respectivamente) fue resuspendida en 2 ml de solución de fosfatos almacenándose a -4°C centígrados en alícuotas de 0.5 ml las cuales fueron usadas para obtener el antisuero y para observación al microscopio electrónico (Vloten-Doting and Jaspars 1972).

IV.5.- Obtención de antisuero específico

Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 3 kg de peso, a los que se inyectó hasta en 8 ocasiones sucesivas con 0.5 mg del virus purificado y 1 ml de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical), con intervalos de 8 días. Ocho días después de la última inyección los conejos fueron sangrados para obtener el antisuero, que se mantuvo a -20°C para su utilización en las pruebas de doble difusión en agar.

Después de cinco inyecciones con el antígeno, se tituló el antisuero enfrentando diluciones seriadas de 1/1 hasta 1/1024 a extractos de planta enferma.

IV.6.- Observación de las partículas virales por microscopía electrónica

Rejillas de cobre con cubierta de Formvar (0.25% P/V en cloroformo) y cubiertas con carbono fueron sumergidas en la suspensión de virus purificado por 3 min. Cada rejilla se colocó en una gota de ácido fosfotúngstico al 2% o en acetato de uranilo 2% con glutaraldehído al 1% en tres ocasiones: en el primero el contrastante se retiró inmediatamente, en el segundo se dejó durante 30 segundos y en el tercero se dejó por 2 minutos. Posteriormente se colocaron en papel filtro, para eliminar el líquido sobrante y observar al microscopio electrónico Jeol M 2000.

IV.7- Análisis de inclusiones virales

Se determinó el tipo de inclusiones que induce el virus mosaico del pepino en microscopio compuesto. Se utilizaron tiras de tejido epidérmico de plantas enfermas (inoculadas mecánicamente), teñidas con azul de bromofenol por 15 minutos, lavadas con agua destilada y montadas con glicerol en porta y cubreobjetos (Cárdenas 1986).

IV.8.- Inmunodetección de virus

IV.8.1.- Inmunodetección enzimática (ELISA) ligado a enzima fosfatasa alcalina.

Se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática en fase sólida de doble sandwich (DAS-ELISA), a desarrollarse en dos días (Clark and Adams 1977), para detectar infecciones por virus directamente en muestras de campo, hospedantes indicadoras así como a los virus purificados.

Los antisueros (Anti-IgG) utilizados en esta prueba, contra muestras de plantas de campo, fueron para TRSV, TMV, TEV, CMV, AMV, TRV, TRSV, PMMoV e INSV y anti-IgG-fosfatasa alcalina para los mismos virus adquiridos de Agdia Co. La lectura de absorbancia a 405 nm se realizó en un espectrofotómetro Bio-Tek Modelo EL-309. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos, diluidos con la solución amortiguadora de extracción. Las plantas indicadoras inoculadas en invernadero y los virus purificados solamente se corrieron contra los antisueros de CMV, AMV y TMV. Se consideraron positivos las muestras cuyas absorbancia superan al triple de las lecturas de los controles negativos.

Las muestras de tejido fresco (0.2 g) fueron maceradas con 2 ml de solución de extracción (Sulfito de sodio 1.3 g, polyvinilpirrolidona 24-4000 20.02 g, azida de sodio 0.2 g, albúmina de huevo de pollo 1.0 g y tween-20 20.0 g por litro con pH 7.4) y depositadas en placas para ELISA, previamente sensibilizadas con el anticuerpo de cubrimiento diluido según las indicaciones del proveedor en buffer de cubrimiento (Carbonato de sodio 1.59 g, bicarbonato de sodio 2.93 g y azida de sodio 0.2 g por litro con pH de 9.6) durante 4 horas. Se permitió la reacción antígeno anticuerpo durante 12 horas y posteriormente se añadió el anticuerpo conjugado y se permitió su incorporación al complejo durante 3 horas a

temperatura ambiente. Finalmente se añadió para-nitrofenil-fosfato 0.5 mg/ml (PNP) disuelto en solución buffer de PNP (Albúmina de suero bovino 2.0g, PVP 24-40000 20g y azida de sodio 0.2 por litro), la placa se colocó en cámara oscura y se realizó la lectura a los 15 y 30 minutos.

IV.8.2.- Inmunodetección por doble difusión en agar.

El ensayo de doble difusión en agar se realizó utilizando el protocolo descrito por Hampton et al 1990, utilizando agar purificado al 1% (Merck) en solución salina 0.85% con azida de sodio 0.5%. Los antisueros utilizados en esta prueba fueron los obtenidos, en los conejos Nueva Zelanda, después de la inmunización con los virus purificados de AMV y CMV.

IV.9.- Extracción y análisis electroforético de RNAdc viral en geles de poliacrilamida 6%

IV.9.1.- Obtención de marcadores y controles negativos de RNA doble cadena

Se aislaron e incrementaron virus conocidos en plantas de *Nicotiana benthaminana*, *N. glutinosa* y *Capsicum annum* entre otras, de donde se obtuvo RNAdc viral para utilizarse como marcadores de peso molecular. Los RNAdc extraídos fueron: virus mosaico del pepino (CMV 2.3, 2.0, 1.4 y 0.7×10^6 Da); mosaico del tabaco (TMV 4.2×10^6 Da), mosaico de la alfalfa (AMV 2.3, 1.5, 1.3 y 0.5×10^6 Da), Aspermia del Tomate (TAV 2.3, 2.0, 1.4 y 0.7×10^6 Da) y Jaspeado del Tabaco (TEV 6.2×10^6 Da).

Los controles negativos fueron preparados de extractos de plantas sanas de *Nicotiana occidentalis*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucúrbita pepo*, *Chenopodium amaranticolor*, y *C. quinoa*.

Para confirmar la presencia de varios de los virus detectados se utilizó la técnica de ELISA, empleando los antisueros (Anti-IgG) y conjugados de antiIgG-fosfatasa alcalina (Agdia Co.) para los virus arriba mencionados (Clark and Adams 1977).

IV.9.2.- Extracción de RNAdc de tejido vegetal.

La extracción de RNAdc se realizó macerando 3.5 g de material vegetal en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El tejido macerado fue transferido a un tubo de centrifuga de 50 ml y se agregó 8.0 ml de STE 1X (NaCl 0.1 M, Tris 0.05 M, EDTA 0.001 M, pH 6.8), 0.5 ml de una suspensión de bentonita al 2% p/v, 1 ml SDS 10% y 9 ml de fenol preequilibrado con STE 1X. El tubo bien tapado se agitó por 30 minutos, después se centrifugó a 8000 g por 15 min. Se recuperaron 10 ml de la fase acuosa superior, se le adicionaron 2.1 ml de etanol al 95%. La mezcla fue almacenada a 4 °C durante 12 h.

Se llevaron a cabo dos ciclos de cromatografía en celulosa para eliminar todo el RNA de cadena sencilla (RNAs), DNA, polisacáridos y proteínas contaminantes. 1 g de celulosa CF-11 suspendida en 25 ml de STE 1X - etanol 16% (v/v) fue vertida en una columna hecha con un tubo de jeringa de plástico de 20 ml taponada con papel filtro, permitiendo el drenado de todo el líquido. La muestra se adicionó a la columna y una vez que drenó el líquido se realizaron dos lavados con 40 ml de STE 1X -etanol 16%. Después se agregaron 2.5 ml de STE 1X a la columna y se permitió su elución. Finalmente se adicionaron 10 ml de STE 1X, una vez eluidos se colectaron en un tubo de centrifuga de 50 ml, agregando 2.1 ml de etanol 96%.

El segundo ciclo de cromatografía se realizó de igual forma que el anterior pero al final se agregaron y colectaron 6 ml de amortiguador STE 1X. El eluido fue precipitado con 0.5 ml acetato de sodio 3M y 20 ml etanol 96% frío y se almacenó durante 12 h a -20 °C.

Las muestras con etanol y acetato de sodio fueron centrifugadas a 8000 g por 25 min. El etanol se desechó y el tubo se colocó sobre papel secante en forma invertida por 1 a 2 horas. El RNAdc fue resuspendido en 200 µl de agua bidestilada - desionizada y almacenado a 4 °C (Valverde et al. 1990).

IV.9.3.- Separación electroforética de RNAdc.

La separación electroforética de RNAdc se realizó en geles de poliacrilamida (6%), utilizando un minigel (1.75 mm x 7 cm x 8 cm), montado en una mini cámara Biorad doble. El volumen del extracto de ARN-cd, viral y de testigos fue de 40 μ l por muestra. Las condiciones de electroforesis fueron 100 volts por 2.15 o 1.45 h a temperatura de laboratorio. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata 0.011M, secados y fotografiados en un transiluminador de luz blanca (Sambrook 1989).

V.- Resultados

En el Valle de Atlixco Puebla, en los márgenes de sembradíos de cebolla, alfalfa, frijol ejotero, tomate de cáscara, gladiolo, crisantemo, terciopelo, cempoaxóchitl, calabaza y otros cultivos menores se localizó una población de *Leonotis nepetifolia* (Foto no. 1) que se mantiene durante todo el año. Las plantas de *L. nepetifolia* en cualquier época presentan síntomas atribuidos a virosis y que fueron agrupados en: A) Cálculo amarillo, B) Cálculo blanco, C) Enchinamiento y reducción foliar y D) Mosaico (Foto no. 2).

De esta población, se realizaron colectas de plantas y semillas durante las épocas de lluvia y estiaje de 1998 y 1999, los ejemplares fueron determinados, herborizados y depositados en el herbario de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala y utilizadas para aislar y caracterizar los virus de RNA que las utilizan como hospedantes naturales.

En invernadero las muestras colectadas se utilizaron para determinar rango de hospedantes experimental mediante la inoculación mecánica de 21 especies de plantas de las familias: *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cucurbitacea*, *Leguminosae*, *Labiatae* y *Solanaceae*, para analizar el patrón electroforético de RNAdc viral y para la determinación de los virus por serología (ELISA). Las plantas del rango de hospedantes inoculadas con savia infectiva de *L. nepetifolia* y los controles negativos fueron mantenidas bajo observación por periodos no mayores a 60 días en invernaderos con fotoperíodo y temperatura natural. En los ensayos de determinación inmunoenzimática de virus en los ejemplares de campo, se utilizaron nueve anticuerpos (Agdia Co.) en la técnica desarrollada en dos días. Plantas sanas de *L. nepetifolia* y algunas del rango de hospederos experimental fueron sometidas al ensayo de extracción y análisis electroforético de RNAdc para evidenciar la posible presencia de RNAdc que pudiera ser considerada como de origen viral. Ninguna produjo bandas en geles de poliacrilamida 6%.

Por la diversidad de síntomas de *Leonotis nepetifolia* en campo así como por los síntomas producidos tras la inoculación mecánica en las especies del rango de hospederos se sospechó de la presencia de un complejo viral que pudimos separar mediante plantas diferenciales. La aparición de mosaico sistémico en *Cucurbita pepo* y en *Datura stramonium* indicaba la posible presencia de CMV; las lesiones cloróticas o mosaico en

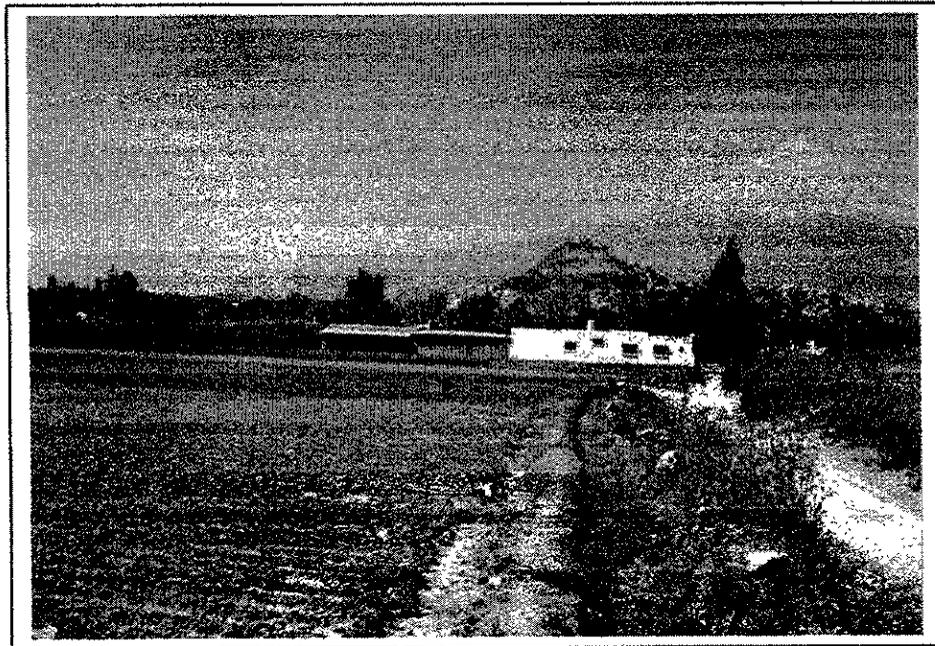
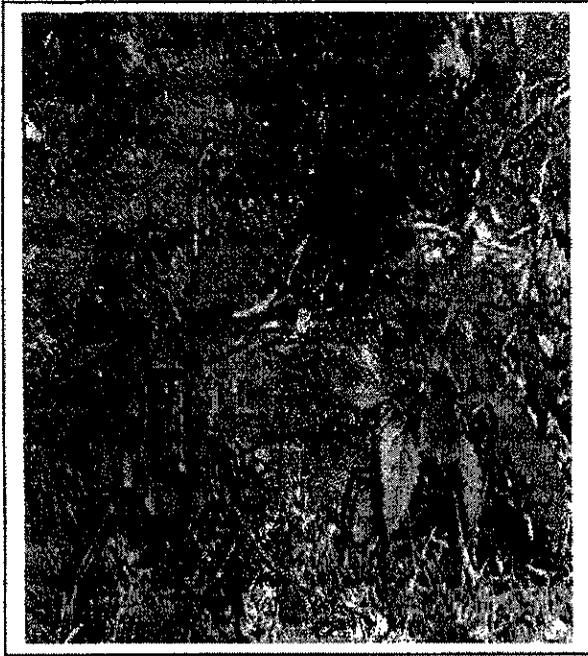


Foto no. 1.- Zona de muestreo en Atlixco Puebla, México. Las fotografías muestran parte de la colonia de *Leonotis nepetifolia* en periodo de lluvia (superior) y de estiaje (inferior).



(A)



(B)

(C)



(D)

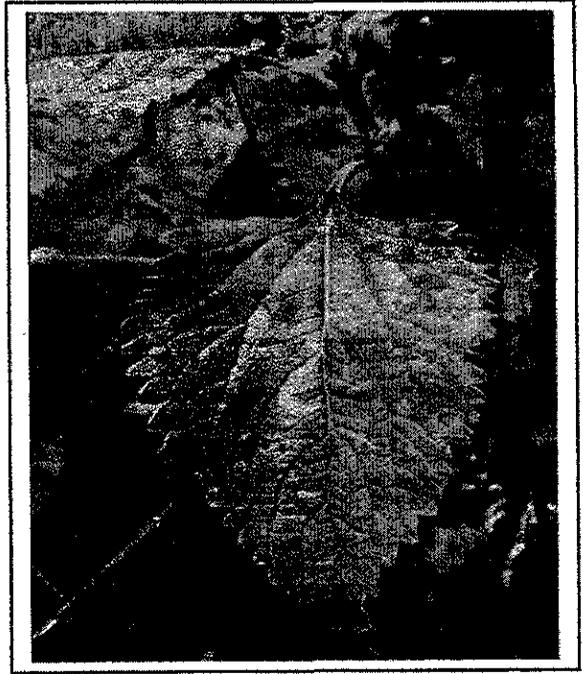


Foto no. 2.- *Leonotis nepetifolia* en condiciones naturales con síntomas de virosis. A) Cálculo amarillo, B) Cálculo blanco, C) Reducción y enchinamiento foliar y D) Mosaico.

Chenopodium amaranticolor y en *C. quinoa* sugerían la presencia de AMV; las lesiones necróticas en *Nicotiana glutinosa* y *N. rustica* hicieron suponer la presencia de al menos otro virus.

Aislamiento, determinación y caracterización de CMV, TMV y AMV en plantas indicadoras

En el Cuadro no. 1 se presentan los síntomas observados en cada una de las especies del rango de hospedantes tras su inoculación con mezcla de savia de plantas de *Leonotis nepetifolia* con cálico, mosaico y reducción foliar.

La aparición de lesiones cloróticas en *Cucurbita pepo*, en *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*, inoculadas con savia de *L. nepetifolia* silvestre, permitió establecer la presencia de virus del mosaico del pepino (CMV), la aparición de mosaico y deformación foliar sistémica en las dos *Chenopodiaceae* permitieron sospechar de la presencia del virus mosaico de la alfalfa (AMV). Se utilizó a estas plantas como fuente de inóculo para conjuntos de plantas formadas por *C. pepo*, *Gomphrebna globosa*, *C. quinoa* y *C. amaranticolor*. De las hojas cotiledonales de *C. pepo* con lesiones cloróticas se recuperó al CMV y el AMV fue aislado de hojas jóvenes (no inoculadas) de *C. amaranticolor* y *C. quinoa* que presentaron mosaico y deformación foliar. Con savia de estas hojas se inoculó mecánicamente y por separado al conjunto de especies del rango de hospedantes. Las plantas inoculadas con estos dos virus generalmente empezaron a manifestar los síntomas ocho días después de la inoculación. La presencia de los virus se confirmó por análisis de RNAdc y por ELISA.

El virus del mosaico del tabaco (TMV) fue aislado en *Nicotiana rústica*. La infección de TMV en esta planta se manifestó inicialmente por lesiones cloróticas sistémicas que posteriormente se convirtieron en lesiones necróticas en forma de anillos. Este virus fue transferido a plantas de *N. occidentalis* para mantenerlo como fuente de inóculo fresco. Los síntomas producidos por este virus en las plantas del rango de hospederos generalmente se manifestaron antes de los seis días.

Cuadro No. 1

SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR SAVIA INFECTIVA DE *Leonotis nepetifolia*
CON SÍNTOMAS DE VIROSIS EN LAS ESPECIES
DEL RANGO DE HOSPEDANTES

ESPECIE	SINTOMAS
CHENOPODIACEAE	
<i>Beta vulgaris</i>	Ninguno
<i>Chenopodium. quinoa</i>	Lesiones cloróticas locales, lesiones cloróticas sistémicas deformación foliar.
<i>C. amaranticolor</i>	Lesiones cloróticas locales, lesiones cloróticas sistémicas y deformación foliar.
<i>Gomphrena globosa</i>	Lesiones necróticas locales y mosaico amarillo
COMPOSITAE	
<i>Heliantus annuus</i>	Ninguno
CUCURBITACEAE	
<i>Cucumis melo</i>	Moteado sistémico
<i>C. sativus</i>	Mosaico
<i>Cucurbita pepo</i> var. Gray Zucchini	Moteado sistémico
LABIATAE	
<i>Leonotis nepetifolia</i>	Cálico amarillo – blanco, mosaico y lesiones cloróticas locales
LEGUMINOSAE	
<i>Medicago sativa</i>	Mosaico
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Madero	Lesiones necróticas locales y mosaico
<i>Pisum sativum</i> var. Sta Elena	Mosaico y deformación foliar
<i>Vicia faba</i>	Ninguno
SOLANACEAE	
<i>Capsicum annum</i> var. Ancho	Cálico, mosaico y lesiones necróticas sistémicas
<i>Datura stramonium</i>	Moteado sistémico
<i>Lycopersicon esculentum</i> var. Royal Ace,	Mosaico ligero
<i>Nicotiana occidentalis</i>	Mosaico y deeformación foliar
<i>N. rustica</i>	Lesiones cloróticas y lesiones necróticas sistémicas
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	Mosaico
<i>N. glutinosa</i>	Lesiones necróticas locales y mosaico amarillo verdoso intenso.
<i>Physalis ixocarpa</i>	Ninguno

Las plantas fueron inoculadas mecánicamente y mantenidas en condiciones de invernadero para su observación durante 60 días. Se inocularon al menos tres conjuntos de plantas para corroborar los síntomas. Se resumen los síntomas mostrados tras la inoculación con savia *L. nepetifolia* con cálico, mosaico y enchinamiento foliar.

Los virus una vez aislados y determinados se utilizaron para inocular al menos a tres conjuntos de rango de hospedantes para comparar los síntomas con los reportados.

Los síntomas generados por la inoculación del virus mosaico de la alfalfa (AMV) en las especies del rango de hospedantes se presentan en el Cuadro no. 2 y en las Fotos no. 3 y 4.

El AMV produjo lesiones cloróticas locales, mosaico sistémico y deformación foliar en tres de las cuatro especies *Chenopodiaceae* utilizadas (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* y *Gomphrena globosa*). Tanto las cucurbitáceas como *Heliantus annuus* (*Compositae*,) no mostraron síntomas aparentes durante los 60 días que se mantuvieron en observación. Las plantas de *L. nepetifolia* fueron inoculadas mecánicamente con AMV en las primeras hojas verdaderas, al cabo de 8 días presentaron cálico amarillo que en algunas hojas viró a blanco después de 30 días de la inoculación. De las leguminosas utilizadas solamente *Medicago sativa* y *Phaseolus vulgaris* presentaron síntomas, la primera presentó mosaico amarillo verdoso sistémico, la segunda mostró lesiones necróticas en las hojas inoculadas al cabo de 8 días, en ningún ejemplar de frijol se presentaron síntomas sistémicos. Ocho especies de solanáceas se incluyeron en el rango de hospedantes, cuatro de ellas, *Nicotiana glutinosa*, *N. rústica*, *Datura stramonium* y *Physalis ixocarpa* nunca presentaron síntomas. Entre las demás, *Lycopersicon esculentum* presentó mosaico ligero, *Capsicum annum* mostró cálico amarillo, *N. occidentalis* después de ocho días de la inoculación presentó mosaico intenso, marchitamiento y necrosis en las hojas inoculadas, éstas plantas generalmente se recuperaron mostrando cálico intenso y deformación de las hojas nuevas, *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* mostró mosaico con amarillamiento intervenal ligero.

El Cuadro no. 3 y la Foto no. 5 presentan los síntomas generados por el virus mosaico del pepino (CMV) inoculado en las especies del rango de hospederas experimentales a partir de savia infectiva de *Cucúrbita pepo*.

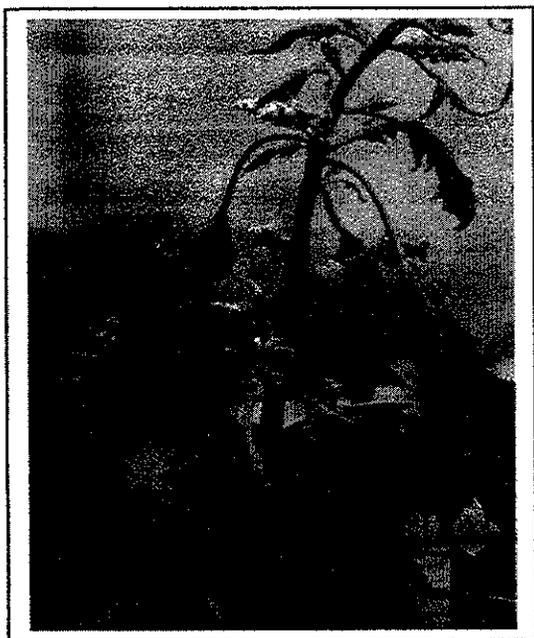
Las lesiones cloróticas y necróticas producidas por CMV en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* solamente afectaron a las hojas inoculadas, mientras que *Gomphrena globosa* solamente presentó un ligero mosaico con deformación foliar. Las tres cucurbitáceas que integraron el rango mostraron mosaico tras la inoculación. *Cucumis melo* y *C. sativus* evidenciaron mosaico sistémico ligero mientras que en *Cucurbita pepo* el moteado o mosaico fue intenso y se presentó en el 100% de las plantas inoculadas. En *L. nepetifolia* el

Cuadro No. 2

SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR SAVIA INFECTIVA DE *Chenopodium. amaranticolor*
CON LESIONES CLORÓTICAS SISTÉMICAS EN LAS ESPECIES
DEL RANGO DE HOSPEDANTES

ESPECIE	SINTOMAS
CHENOPODIACEAE	
<i>Beta vulgaris</i> ,	Ninguno
<i>Chenopodium quinoa</i>	Lesiones cloróticas locales, sistémicas y deformación foliar
<i>C. amaranticolor</i>	Lesiones cloróticas locales, sistémicas y deformación foliar
<i>Gomphrena globosa</i>	Lesiones necróticas locales, mosaico amarillo verde
COMPOSITAE	
<i>Heliantus annuus</i>	Ninguno
CUCURBITACEAE	
<i>Cucumis melo</i>	Ninguno
<i>C. sativus</i>	Ninguno
<i>Cucurbita pepo</i> var. Gray Zucchini	Ninguno
LABIATAE	
<i>Leonotis nepetifolia</i>	Cálico amarillo y blanco
LEGUMINOSAE	
<i>Medicago sativa</i>	Mosaico
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Madero	Lesiones necróticas locales
<i>Pisum sativum</i> var. Sta Elena	Ninguno
<i>Vicia faba</i>	Ninguno
SOLANACEAE	
<i>Capsicum annum</i> var. Ancho	Cálico
<i>Datura stramonium</i>	Ninguno
<i>Lycopersicon esculentum</i> var. Royal Ace.	Mosaico ligero
<i>Nicotiana occidentalis</i>	Mosaico intenso deformación foliar y necrosis
<i>N. rustica</i>	Ninguno
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	Mosaico
<i>N. glutinosa</i>	Ninguno
<i>Physalis ixocarpa</i>	Ninguno

Las plantas fueron inoculadas mecánicamente y mantenidas en condiciones de invernadero para su observación durante 60 días. Se inocularon al menos tres conjuntos de plantas para corroborar los síntomas. Los síntomas empezaron a manifestarse a partir del octavo día.



(A)



(B)

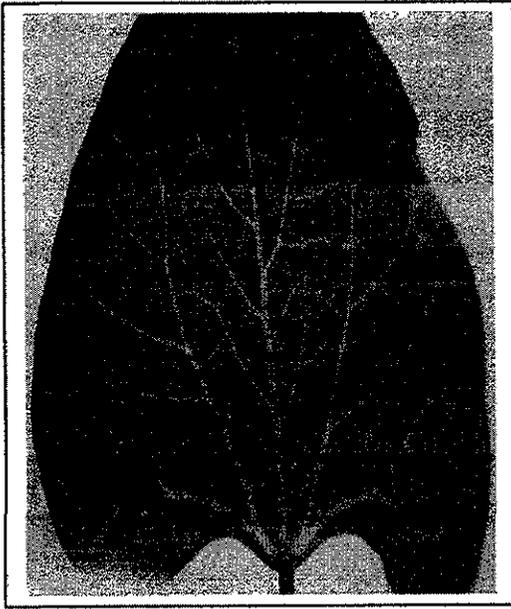
(C)



(D)



Foto no. 3.- Síntomas en plantas inoculadas mecánicamente con AMV aislado de *L. nepetifolia*. A) *Chenopodium quinoa* con lesiones cloróticas sistémicas (mosaico), B) *Ch. amaranticolor* con lesiones cloróticas y deformación foliar, C) *Gomphrena globosa* con mosaico, en las hojas inoculadas presentó lesiones necróticas y D) *Nicotina tabacum* var. White Burley con mosaico. Los síntomas se empezaron a manifestar generalmente a partir del octavo día después de la inoculación

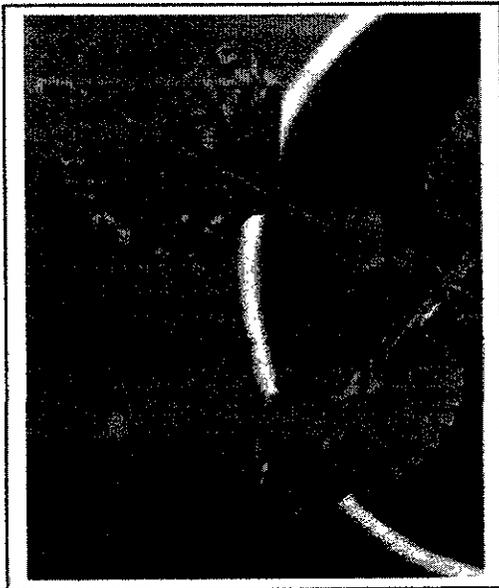


(A)



(B)

(C)



(D)



Foto 4.- Síntomas en plantas inoculadas mecánicamente con AMV aislado de *L. nepetifolia* A) *Phaseolus vulgaris* con lesiones necróticas locales, B) *Ph. vulgaris* con mosaico sistémico, C) *L. nepetifolia* con cálico amarillo y D) *Capsicum annuum* con cálico amarillo. Los síntomas se empezaron a manifestar generalmente a partir del octavo día después de la inoculación.

Cuadro No. 3

SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR SAVIA INFECTIVA DE *Cucurbita pepo*
CON MOTEADO SISTÉMICO EN LAS ESPECIES
DEL RANGO DE HOSPEDANTES

ESPECIE	SINTOMAS
CHENOPODIACEAE	
<i>Beta vulgaris</i>	Ninguno
<i>Chenopodium quinoa</i>	Lesiones cloróticas y necróticas locales
<i>C. amaranticolor</i>	Lesiones cloróticas y necróticas locales
<i>Gomphrena globosa</i>	Ninguno
COMPOSITAE	
<i>Heliantus annuus</i>	Ninguno
CUCURBITACEAE	
<i>Cucumis melo</i>	Moteado sistémico ligero
<i>C. sativus</i>	Moteado sistémico ligero
<i>Cucurbita pepo</i> var. Gray Zucchini	Moteado local y sistémico severo
LABIATAE	
<i>Leonotis nepetifolia</i>	Mosaico
LEGUMINOSAE	
<i>Medicago sativa</i>	Mosaico
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Madero	Ninguno
<i>Pisum sativum</i> var. Sta Elena	Mosaico
<i>Vicia faba</i>	Ninguno
SOLANACEAE	
<i>Capsicum annuum</i> var. Ancho	Ninguno
<i>Datura stramonium</i>	Moteado sistémico
<i>Lycopersicon esculentum</i> var. Royal Ace	Mosaico leve
<i>Nicotiana occidentalis</i>	Mosaico
<i>N. rustica</i>	Ninguno
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	Mosaico
<i>N. glutinosa</i>	Ninguno
<i>Physalis ixocarpa</i>	Ninguno

Las plantas fueron inoculadas mecánicamente y mantenidas en condiciones de invernadero para su observación durante 60 días. Se inocularon al menos tres conjuntos de plantas para corroborar los síntomas. Los síntomas empezaron a manifestarse a partir del octavo día.



(A)



(B)

(C)



(D)

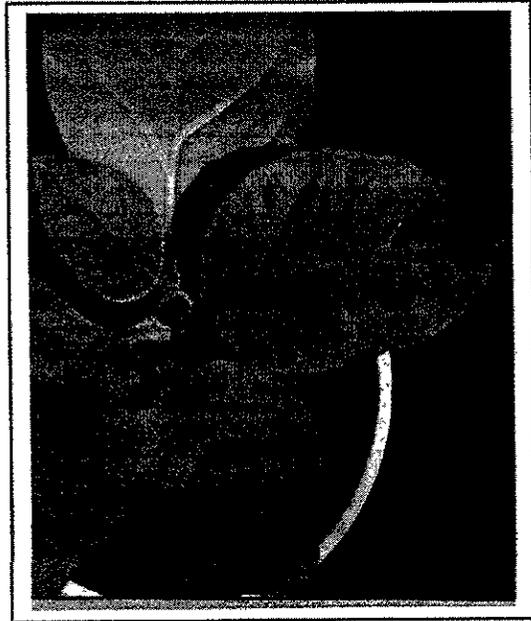


Foto no. 5.- Síntomas en plantas inoculadas mecánicamente con CMV aislado de *L. nepetifolia*. A) *Cucurbita pepo* con moteado o mosaico sistémico, B) *Nicotiana occidentalis* con mosaico C) *Lycopersicon esculentum* con mosaico y D) *N. tabacum* var. *xanthi* con mosaico. Los síntomas se empezaron a manifestar a partir del octavo día después de la inoculación.

mosaico sistémico ligero disminuyó o desapareció con las disminuciones en las temperaturas ambientales (variable no controlada). De las leguminosas probadas solamente *Medicago sativa* y *Pisum sativum* mostraron mosaico tras 8 días de la inoculación. En cuatro especies de las solanáceas (*Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana occidentalis* y *N. tabacum*) el CMV ocasionó mosaico sistémico.

El virus mosaico del tabaco (TMV) fue aislado tras la inoculación del rango de hospedantes con *L. nepetifolia* con enchinamiento y reducción foliar; *Nicotiana rustica* presentó síntomas que no habían sido producidos por ninguno de los dos virus aislados previamente: lesiones cloróticas a partir del sexto día y que se convirtieron en lesiones necróticas en forma de anillo después de 20 días aproximadamente. La naturaleza del patógeno fue corroborada mediante serología y en algunos casos por análisis de RNAdc. La savia infectiva de *Nicotiana occidentalis* fue utilizada para inocular mecánicamente al menos tres conjuntos de rango de hospedantes para confirmar los síntomas (Foto no. 6, Cuadro no. 4) y para compararlos con los reportados. El aislamiento de TMV generó la aparición de lesiones cloróticas locales de aproximadamente 3 mm en *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*. *Leonotis nepetifolia* presentó lesiones cloróticas y en algunas ocasiones necróticas en las hojas inoculadas. Entre las leguminosas probadas, solamente *Phaseolus vulgaris* mostró lesiones necróticas locales y *Pisum sativum* mostró mosaico y deformación foliar intensos. Seis de las solanáceas incluidas en el rango de hospedantes mostraron síntomas tras la inoculación con TMV: *Nicotiana occidentalis* presentó mosaico verde intenso y deformación (embolsamientos) de las hojas, *N. rustica* lesiones cloróticas y anillos necróticos sistémicos, *N. glutinosa* y *N. tabacum* lesiones necróticas locales de aproximadamente 5 mm de diámetro. Los síntomas generalmente empezaron a manifestarse a partir del sexto día de la inoculación.

Tres lotes de cuatro plantas de *Leonotis nepetifolia* fueron utilizadas para confirmar los síntomas producidos, en infección mixta, por los dos virus que se diseminaron sistémicamente en ella. Estas plantas fueron inoculadas mecánicamente con mezcla (1:1 p/p) de savia infectiva de CMV y AMV, los síntomas se presentan en la Foto no. 7 (Pág. 42). Las plantas infectadas con mezcla de CMV y AMV presentaron el mosaico verde

Cuadro No. 4

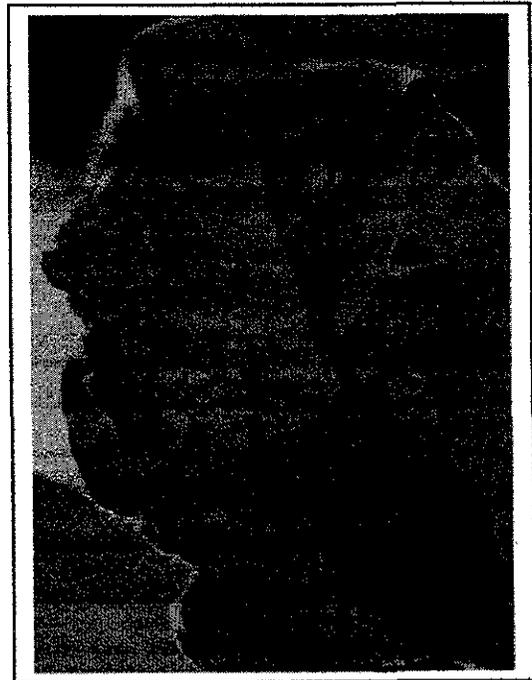
**SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR SAVIA INFECTIVA DE *Nicotiana occidentalis*
CON MOSAICO SISTÉMICO Y DEFORMACIÓN FOLIAR EN LAS
ESPECIES DEL RANGO DE HOSPEDANTES**

ESPECIE	SINTOMAS
CHENOPODIACEAE	
<i>Beta vulgaris</i> ,	Ninguno
<i>Chenopodium quinoa</i> ,	Lesiones cloróticas locales
<i>C. amaranticolor</i>	Lesiones cloróticas locales
<i>Gomphrena globosa</i>	ninguno
COMPOSITAE	
<i>Heliantus annuus</i>	Ninguno
CUCURBITACEAE	
<i>Cucumis melo</i> ,	Ninguno
<i>C. sativus</i> ,	Ninguno
<i>Cucurbita pepo</i> var. Gray Zucchini,	Ninguno
LABIATAE	
<i>Leonotis nepetifolia</i> ,	Lesiones cloróticas locales
LEGUMINOSAE	
<i>Medicago sativa</i>	Mosaico
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Madero	Lesiones necróticas locales
<i>Pisum sativum</i> var. Sta Elena	Mosaico y deformación foliar
<i>Vicia faba</i>	Ninguno
SOLANACEAE	
<i>Capsicum annuum</i> var. Ancho	Lesiones necróticas sistémicas
<i>Datura stramonium</i>	Lesiones locales necróticas, deformación foliar
<i>Lycopersicon esculentum</i> var. Royal Ace	Mosaico ligero
<i>Nicotiana occidentalis</i>	Mosaico intenso con deformación foliar
<i>N. rustica</i>	Lesiones cloróticas y lesiones necróticas sistémicas
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	Lesiones necróticas locales
<i>N. glutinosa</i>	Lesiones necróticas locales
<i>Physalis ixocarpa</i>	Ninguno

Las plantas fueron inoculadas mecánicamente y mantenidas en condiciones de invernadero para su observación durante 60 días. Se inocularon al menos tres conjuntos de plantas para corroborar los síntomas. Los síntomas empezaron a manifestarse a partir del sexto día

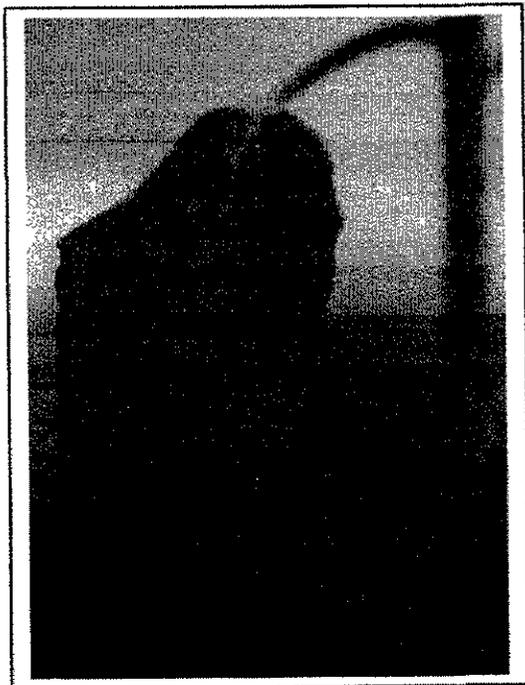


(A)



(B)

(C)



(D)

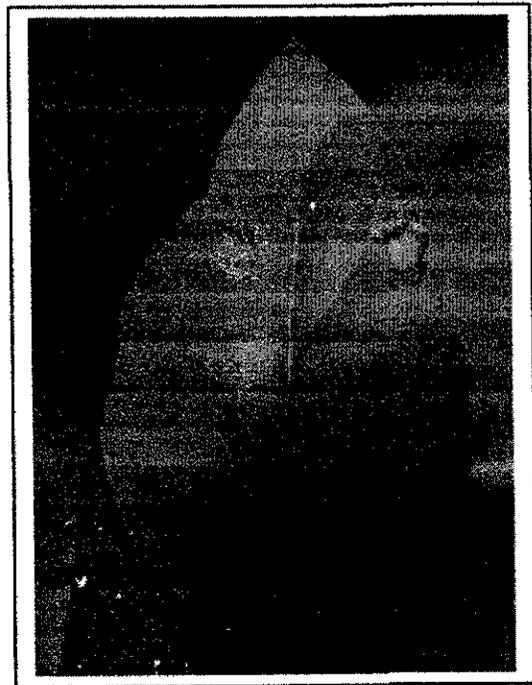


Foto no. 6.- Síntomas en plantas inoculadas con TMV aislado de *L. nepetifolia*. A) *Nicotiana occidentalis* con mosaico sistémico y deformación foliar, B) *N. rustica* con lesiones necróticas sistémicas que iniciaron como moteado clorótico, C) *Chenopodium amaranticolor* con lesiones cloróticas locales y D) *N. glutinosa* con lesiones necróticas locales. Los síntomas se empezaron a manifestar a partir del sexto día.

amarillento típicamente generado en infecciones simples por CMV. La presencia y diseminación sistémica de los virus inoculados fue verificada por serología DAS ELISA en una planta elegida al azar. Los resultados confirmaron la presencia de los dos virus aún cuando la absorbancia (a 405 nm) para AMV, cuando es inoculado en mezcla, correspondió aproximadamente al 50% de la lectura correspondiente al mismo virus en infección simple (Cuadro No. 5).

Transmisión con biovectores

Los ensayos de transmisión con biovectores se realizaron al menos por triplicado utilizando por lote tres plantas receptoras sanas con la misma edad que las plantas utilizadas para la transmisión mecánica.

El virus mosaico del pepino (CMV) fue transmitido con eficiencia del 100% por *Myzus persicae* de *Cucúrbita pepo* a plantas sanas de *Nicotiana occidentalis* y *C. pepo* los síntomas característicos aparecieron después del octavo día de la transmisión, la presencia y naturaleza del patógeno fue corroborada en *C. pepo* por la aparición de los síntomas, por serología (ELISA) y por el análisis del patrón de corrimiento electroforético del RNAdc en geles de poliacrilamida 6% (Foto no. 9 carril C).

El virus mosaico de alfalfa se transmitió con eficiencia de 100% de plantas de *Chenopodium amaranticolor* a plantas sanas de *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *Nicotiana occidentalis*, *N. glutinosa* y *N. tabacum* var. *xanthi* utilizando *Myzus persicae*. La transmisión del virus fue verificada por la aparición de los síntomas y en *N. occidentalis* por análisis electroforético de RNAdc (Foto 11 carril a).

Pruebas de transmisión por semilla

Ninguna de las plantas de *Leonotis nepetifolia* germinadas en invernadero a partir de semillas de plantas con síntomas de virosis colectadas en Atlixco Puebla presentó síntomas, tampoco mostraron patrones de corrimiento electroforético de RNAdc relacionado con

Cuadro No. 5
DETECCIÓN POR ENSAYO INMUNOLOGICO LIGADO
A ENZIMAS (ELISA) DE AMV Y CMV EN *L. nepetifolia*
INOCULADA MECANICAMENTE

Muestra	Absorbancia a 405 nm con anticuerpos vs.		Lectura
	AMV	CMV	
CALICO	0.26	0.06	15 min
	0.48	0.12	30 min
MOSAICO	0.07	0.50	15 min
	0.14	0.85	30 min
MOSAICO*	0.13	0.48	15 min
	0.28	0.75	30 min
NEGATIVO	0.04	0.02	15 min
	0.06	0.04	30 min

Las determinaciones se realizaron según el protocolo para prueba DAS ELISA (Clark and Adams 1977), Doble anticuerpo sándwich usando enzima fosfatasa alcalina. Se consideran positivas las muestras que superan el triple de los controles negativos. La muestra indicada con *asterisco fue inoculada con con mezcla de AMV/CMV y corresponde a la imagen central de la foto no. 7.

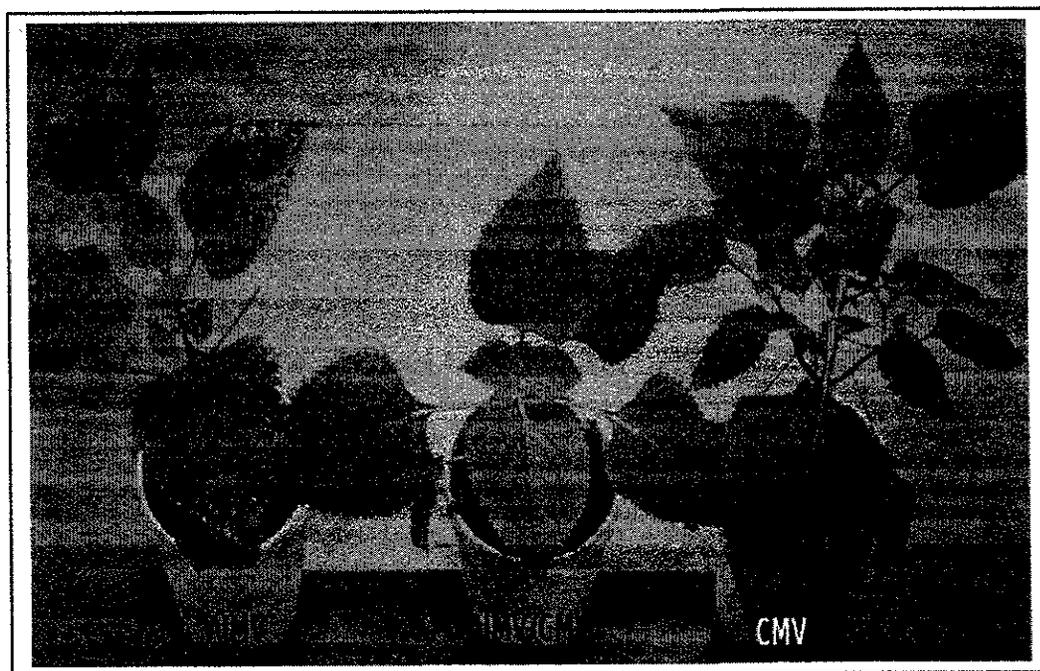


Foto no. 7.- Síntomas de *L. nepetifolia* inoculadas mecánicamente con savia infectiva de AMV (izquierda), CMV (derecha) y mezcla de AMV/CMV 1:1 p/p (al centro).

algún virus. Las plantas se mantuvieron aisladas de los rangos de hospederas inoculadas con los virus aislados.

Purificación de virus y obtención de antisuero específico

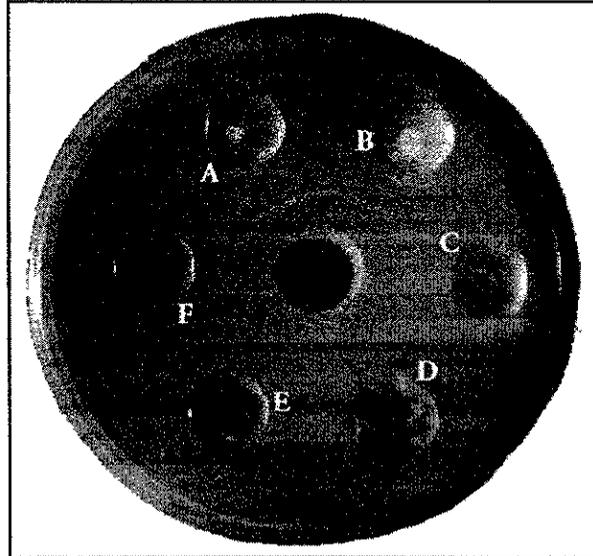
El AMV fue incrementado en 30 plantas de *Nicotiana occidentalis* y purificado 15 días después de la inoculación. Para incrementar el CMV se tomó inóculo de *Cucurbita pepo* con mosaico y se transmitió mecánicamente a lotes de 40 plantas de la misma especie que fueron utilizadas 15 días después de la inoculación. Alícuotas de los purificados fueron utilizadas para confirmar la presencia del virus por serología ELISA, para obtención del antisuero específico y para observación al microscopio electrónico.

El antisuero específico contra AMV se obtuvo inyectando cada ocho días 0.5 mg del purificado durante ocho semanas a un conejo de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 3 Kg de peso. El título del antisuero (1/8) se determinó una semana después de la última inyección. El suero sin diluir fue enfrentado en pruebas de doble difusión en agar con savia de plantas con AMV aislado de *L. nepetifolia*, AMV aislado de *Physalis ixocarpa* del Edo. de México, CMV de *L. nepetifolia* y contra controles negativos. La foto no. 13 muestra la reacción positiva del antisuero contra los aislamientos de AMV de *Leonotis nepetifolia* y de *Physalis ixocarpa*.

Observación de inclusiones virales

La epidermis de las plantas del rango del hospedantes fueron utilizadas para la observación de inclusiones virales. Las muestras de epidermis se procesaron a 5 y 10 días después de la inoculación. Inclusiones de tipo globular amorfo fueron observadas para CMV en plantas de *Cucurbita pepo* var. *zucchini* (Foto no. 14).

**REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN DE ANTISUERO
ESPECÍFICO CONTRA AMV EN ENSAYO DE DOBLE
DIFUSIÓN EN AGAR**



A) AMV de *L. Nepetifolia* en *N. Occidentalis*, B) AMV de *Physalis ixocarpa* del Edo. de México en *N. occidentalis*, C) CMV de *L. nepetifolia* en *C. pepo*. E) y F) *C. pepo* y *N. occidentalis* sanas, respectivamente.

Foto no. 13.- El antisuero contra AMV se obtuvo en conejos de raza Nueva Zelanda y se utilizó sin diluir.



Foto no. 14.- Inclusiones citoplásmicas globulares vacuoladas, (4000 X), en plantas de *Cucurbita pepo* después de 10 días de la inoculación con CMV aislado de *L. nepetifolia*.

Análisis de RNAdc

Las muestras de *Leonotis nepetifolia* de campo se separaron por sus síntomas para realizar la extracción de RNAdc y para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida 6%. Las muestras con cálico se dividieron por el color en amarillo y cálico blanco - amarillo, las de mosaico se separaron en mosaico ligero e intenso, finalmente las muestras con enchinamiento y reducción foliar.

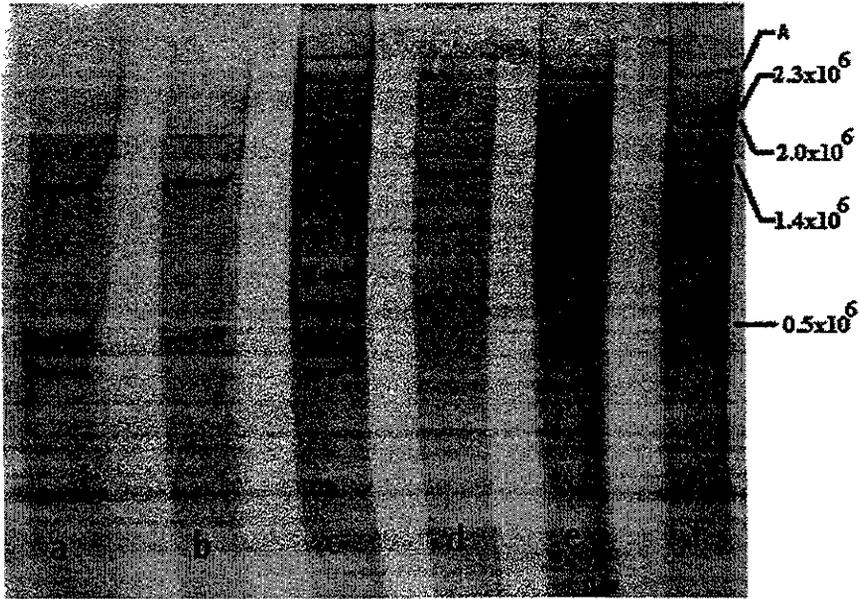
El patrón electroforético del RNAdc de todas las muestras de *Leonotis nepetifolia* coincide con el producido por CMV (Foto no. 8), las bandas más densas corresponden a los RNAdc 3 y 4 (1.4 y 0.5×10^6 Da). En los carriles c, e y f (cálico amarillo y blanco, mosaico intenso y enchinamiento foliar, respectivamente) se presenta además una banda de alto peso molecular (marcada con A) que probablemente corresponde al RNAdc (4.6×10^6 Da) del virus mosaico del tabaco.

Con savia de *Cucurbita pepo* con mosaico sistémico se inoculó a otros conjuntos de hospederas, para confirmar la presencia del CMV, se extrajo el RNAdc de las plantas y se obtuvo el patrón de corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida 6%. El patrón de corrimiento de las bandas (Foto no. 9) de todas las muestras con síntomas coincide con el producido por el CMV. En *Gomphrena globosa* y *Physalis ixocarpa*, además de las 4 bandas características del CMV puede observarse una banda de alto peso molecular cuya identidad no fue precisada.

La presencia del virus mosaico de la alfalfa en las plantas del rango de hospedantes inoculadas con savia infectiva de *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* con mosaico sistémico y deformación foliar, se confirmó por el patrón de corrimiento electroforético de RNAdc en geles de poliacrilamida 6%. En la Foto no. 10, 11 y 12 se presenta el patrón producido por algunas de las hospederas, se observa la distribución características de los RNAdc 1, 2, 3 y 4 (2.3 , 1.5 , 1.3 y 0.5×10^6 Da respectivamente) de AMV.

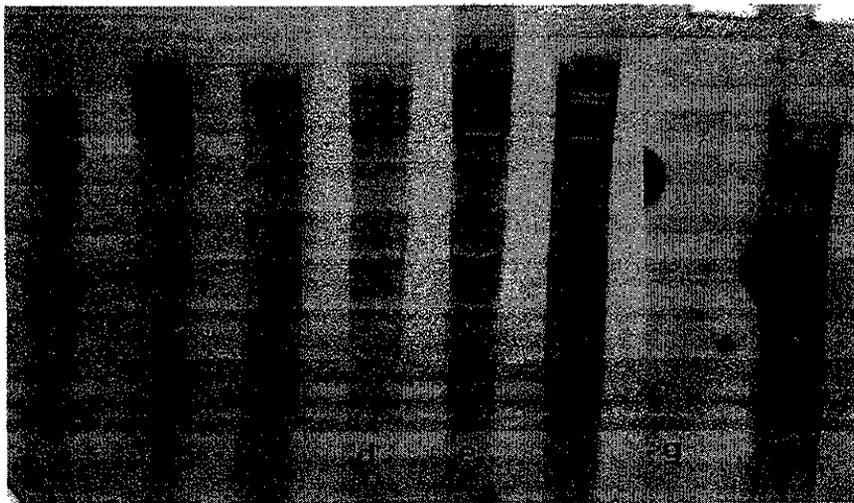
La transmisión de AMV con *Myzus persicae* se confirmó por inspección visual y por análisis de RNAdc. En las fotos no. 11 y 12 se presenta el patrón de corrimiento electroforético del RNAdc extraído de *Nicotiana occidentalis* y *N. glutinosa* inoculadas mecánicamente y mediante el áfido con AMV.

**PATRON ELECTROFORÉTICO DE RNA dc
DE MUESTRAS DE CAMPO DE *Leonotis nepetifolia***



Carriles a) CMV, b) Mosaico leve, c) Cálico amarillo y blanco, d) Cálico amarillo intenso. e) Mosaico intenso v f) Enchinamiento v reducción foliar.

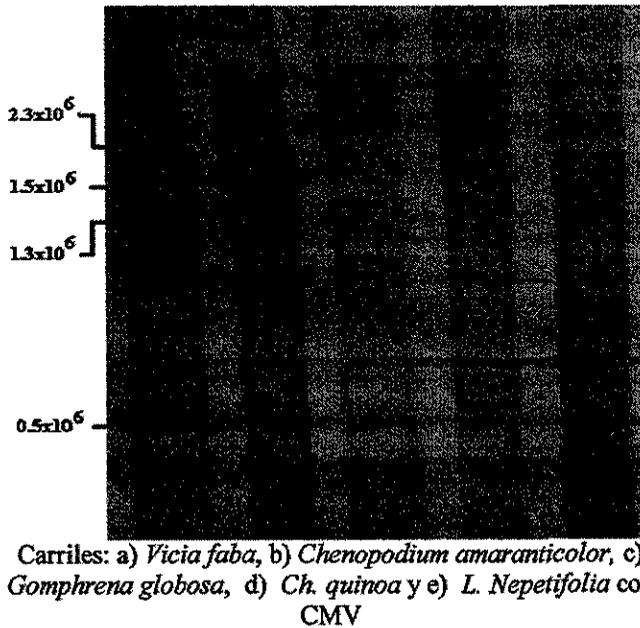
**PATRON ELECTROFORETICO DE RNA de DE DISTINTAS ESPECIES
INOCULADAS CON CMV AISLADO DE *L. nepetifolia***



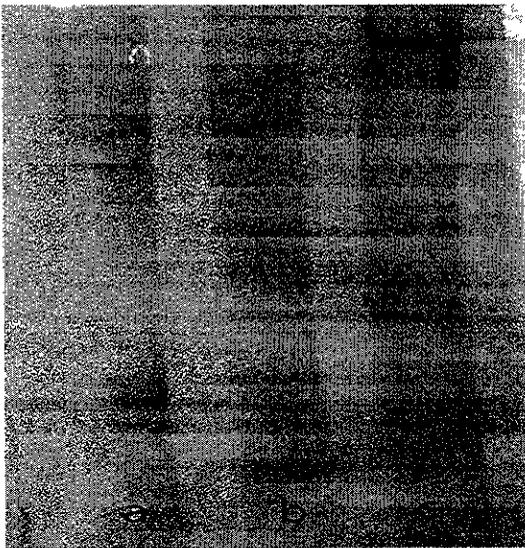
Carriles a) AMV, b) *Gomphrena globosa* con mosaico ligero con deformación foliar, c) *Cucurbita pepo* con mosaico (inoculado con *Myzus persicae*), d) *Nicotiana occidentalis* con mosaico, e) *Physalis ixocarpa* con mosaico y reducción foliar f) *C. pepo* con mosaico g) *Picum sativum* con mosaico ligero y h) CMV

Fotos no. 8 y 9.- Las condiciones de extracción y corrimiento de RNA dc se indican en materiales y métodos.

**PATRONES ELECTROFORETICOS DE RNAdc DE
DISTINTAS ESPECIES INOCULADAS CON AMV
AISLADO DE *Leonotis nepetifolia***

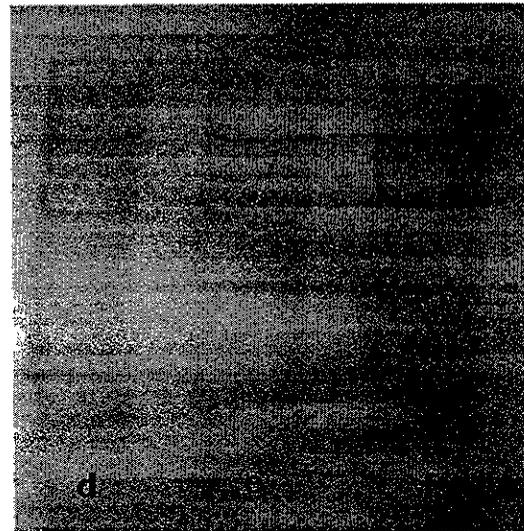


**PATRON ELECTROFORETICO DE RNAdc
DE *N. occidentalis* CON MOSAICO**



a) Inoculada vía *Myzus persicae*. b) Inoculado mecánicamente y c) *Helianthus annuus* sin síntomas aparentes.

**PATRON ELECTROFORETICO DE RNAdc
DE *N. glutinosa* SIN SÍNTOMAS
APARENTES**



d) Inoculada vía *M. Persicae* e) Inoculada mecánicamente y f) CMV (control)

Fotos no. 10, 11 y 12.-Las condiciones de extracción y corrimiento de RNAdc se indican en materiales y métodos.

Las plantas de *Nicotiana glutinosa* inoculadas con AMV mecánicamente o con biovectores no mostraron síntomas durante el periodo de observación. Sin embargo el análisis del RNAdc viral, evidenció la presencia del virus en ambos casos (Foto no. 12).

En la Foto no. 9 carril c) se presenta el patrón electroforético del RNAdc característico de CMV obtenido de *Cucurbita pepo* con mosaico sistémico inoculada con el biovector.

Detección de virus por ensayo inmunológico ligado a enzima (fosfatasa alcalina) ELISA

En el Cuadro no. 6 se enlistan los antisueros ligados a fosfatasa alcalina (Agdia Co.) contra 9 virus (pertenecientes a 6 familias virales) utilizados en la detección de virus en *L. nepetifolia*. Las muestras de plantas de campo fueron agrupadas, según su síntoma, en mosaico, cálico amarillo - blanco, cálico amarillo y enchinamiento con reducción foliar y sometidas por triplicado a este análisis del que solamente resultaron positivas para los virus TMV, CMV y AMV. En el Cuadro no. 7 se muestran los valores de absorbancia a 405nm en uno de los ensayos. Todas las muestras de *Leonotis nepetifolia* que resultaron positivas para el CMV, a su vez, las que presentaron cálico (amarillo o blanco) invariablemente resultaron positivas para CMV y AMV. Las muestras con enchinamiento y reducción foliar invariablemente dieron resultados positivos para el TMV y CMV. En ninguna de las muestras sometidas a este ensayo dieron positivo para AMV exclusivamente.

El Cuadro no. 5 (Pág. 42) presenta los valores de absorbancia de luz de 405 nm para la detección de CMV y AMV en muestras de *L. nepetifolia* inoculadas mecánicamente con CMV, AMV en infecciones simples y mixtas (1:1 p/p de tejido enfermo). Los resultados confirmaron la presencia y distribución sistémica de ambos virus en las plantas inoculadas con mezclas.

Microscopía electrónica de partículas virales

El virus mosaico del tabaco (foto no. 15) fue observado a partir de muestras de savia de *Nicotina occidentalis* con mosaico intenso y deformación foliar sometida a contrastación

Cuadro No. 6
ANTISUEROS UTILIZADOS POR INMUNOABSORCION
ENZIMATICA (ELISA) PARA DETECCION DE VIRUS EN
Leonotis nepetifolia DE ATLIXCO, PUEBLA.

Antisuero vs.		Resultado ^a
AMV	(<i>Alfalfa mosaic virus: Bromoviridae</i>)	+
CMV	(<i>Cucumber mosaic virus: Bromoviridae</i>)	+
TEV	(<i>Tobacco etch virus: Potyviridae</i>)	-
TMV	(<i>Tobacco mosaic virus: Luteoviridae</i>)	+
TBSV	(<i>Tomato bushy stunt: Tombusviridae</i>)	-
TRV	(<i>Tobacco ratle virus: Luteoviridae</i>)	-
PMMoV	(<i>Pepper mild mottle virus: Luteoviridae</i>)	-
TRSV	(<i>Tobacco ringspot virus: Comoviridae</i>)	-
INSV	(<i>Impatiens Necrotic Spotted Virus: Bunyaviriae</i>)	-

Las determinaciones se realizaron según el protocolo para prueba DAS ELISA (Clark and Adams, 1977). Doble anticuerpo sándwich usando la enzima fosfatasa alcalina.

^a += Positivo, -= Negativo.

Cuadro No. 7
DETECCIÓN DE AMV, CMV Y TMV POR ENSAYO INMUNOLÓGICO
LIGADO A ENZIMAS (ELISA) EN *Leonotis nepetifolia*
COLECTADAS EN ATLIXCO PUEBLA

Muestra	Absorbancia a 405 nm con anticuerpo vs.			Lectura
	ALMV	CMV	TMV	
MOSAICO	0.0	0.377	0.018	15 min
	0.005	0.987	0.043	30 min
CALICO BLANCO	0.037	0.314	0.007	15 min
	0.103	0.814	0.009	30 min
CALICO AMARILLO	0.031	0.329	0.005	15min
	0.085	0.860	0.009	30min
ENCHINAMIENTO FOLIAR	0.028	0.321	0.079	15 min
	0.076	0.836	0.174	30 min
NEGATIVOS	0.009	0.040	0.023	15 min
	0.0016	0.115	0.048	30 min

Las determinaciones se realizaron según el protocolo para prueba DAS ELISA (Clark and Adams 1977).

Doble anticuerpo sándwich usando enzima fosfatasa alcalina. Solo se presentan las lecturas para anticuerpos resultaron positivos al menos en una muestra.

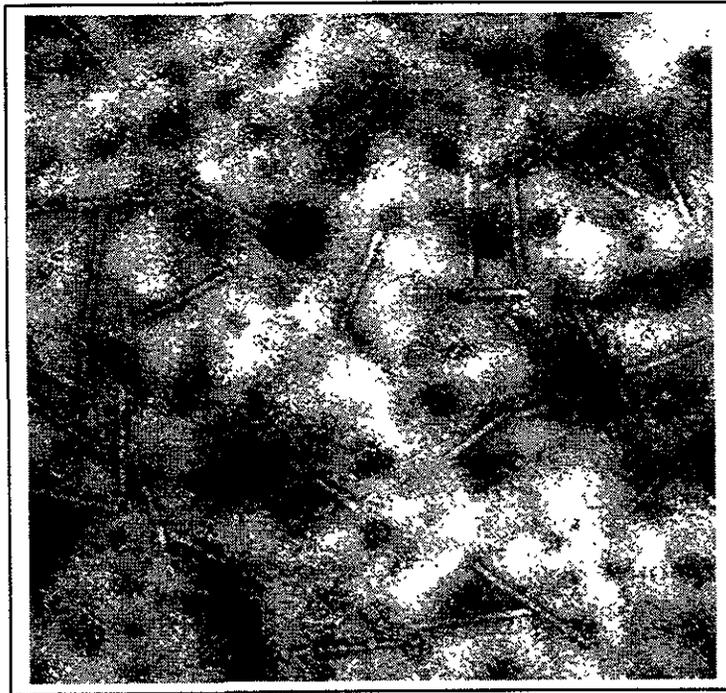


Foto no. 15.- Partículas de varilla rígida de 350 nm de longitud en savia de *Nicotiana occidentalis* inoculada con TMV. Contrastado con acetato de uranilo 2% (64000 X).

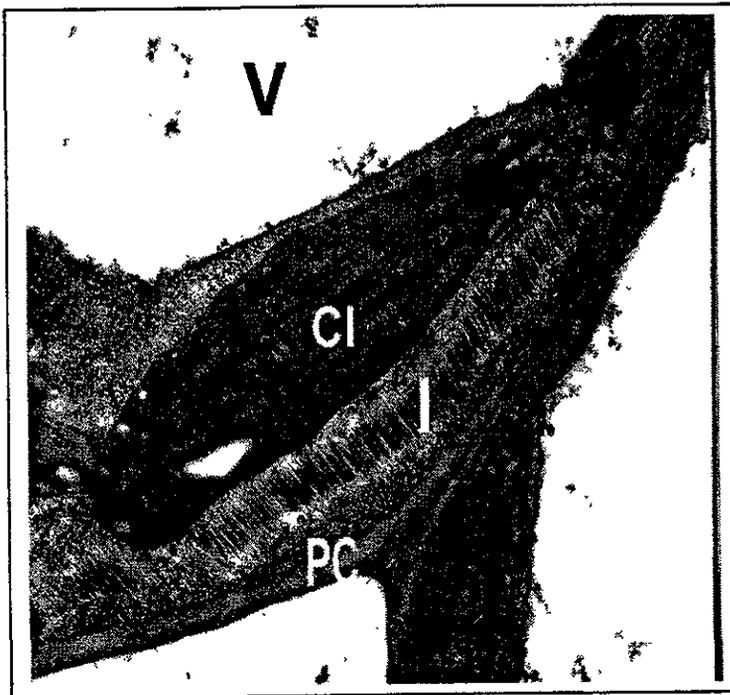


Foto No. 16.- Inclusión viral en célula de *Nicotiana rustica* infectada con TMV. V: Vacuola, Cl: cloroplasto, PC Pared celular e I: Inclusión viral de 350 nm de espesor y 3714nm de longitud aproximadamente. El tejido fue incluido en resina Spurr, fijado con glutaraldehído y contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo.

con acetato de uranilo 2% según se indica en materiales y métodos. Las varillas rígidas de aproximadamente 350 nm de longitud y 20 nm de espesor fueron observadas a partir de 25000 aumentos.

Muestras de tejido de hojas de *Nicotiana rústica* con lesiones cloróticas y necróticas sistémicas fueron fijadas en glutaraldehído y preparadas para su infiltración con resina Spurr para localizar las partículas virales en el interior de la célula vegetal. En la foto no. 16 se distinguen inclusiones virales de 350 nm de espesor y 3700 nm de longitud que contienen gran cantidad de partículas varilla rígida que corresponden al TMV y que están íntimamente asociadas al cloroplasto.

Alícuotas de los purificados de AMV fueron fijados con glutaraldehído 1% y contrastados con acetato de uranilo 2%. En la Foto no. 17 se muestran las partículas con longitud aproximada de 60, 50, 40 y 30 nm del AMV.

Las preparaciones de CMV fueron elaboradas con alícuotas del purificado y contrastadas con acetato de uranilo 2%. En la Foto no. 18 se observan las partículas icosaédricas, aparentemente vacías, con diámetro aproximado de 18 nm.

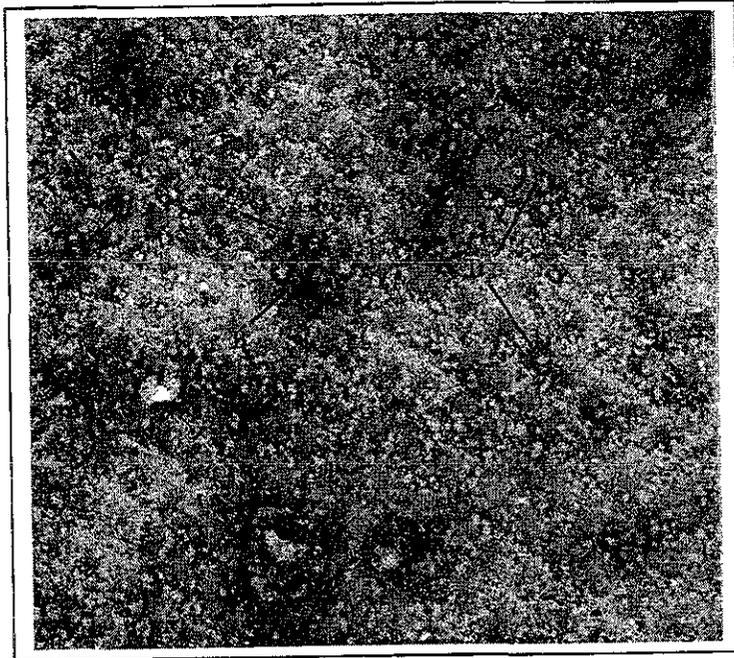


Foto no. 17.- Partículas de AMV en savia infectiva de *Gomphrena globosa* (84000X) fijadas con glutaraldehído 1% y contrastadas con acetato de uranilo 2%. Se indican las partículas A, B, C y D de 60, 50, 40 y 26 nm respectivamente.

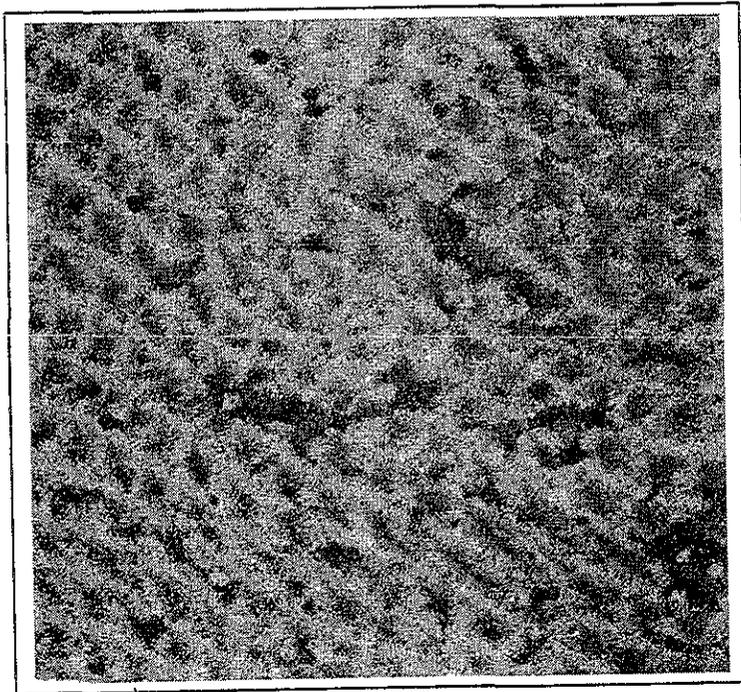


Foto no. 18.- Partículas icosaédricas de 18 nm de diámetro en savia de *Cucurbita pepo* inoculada con CMV de *Leonotis nepetifolia*. Contrastadas con acetato de uranilo 2% (218000 X).

VI.- Discusión de resultados

Desde hace tiempo se ha reconocido la participación de hospedantes alternos silvestres como fuente de inóculo primario en la diseminación de virosis que afectan a las plantas cultivadas. Sin embargo los trabajos enfocados a la identificación y caracterización de los virus en malezas no son abundantes, a pesar de la certeza que el entendimiento de la ecología de los virus que afectan a un cultivo en una localidad es esencial para la implementación y desarrollo de métodos apropiados de control (Rocha 1985). En 1996 Jiménez-Díaz colectó en la Comarca Lagunera plantas silvestres de 11 especies (de 9 familias botánicas) asociadas a cultivos de melón con síntomas de virosis y detectó la presencia de cinco virus (CMV, PRSV, ZYMV, WMV-2 y SqMV) y los asoció con la presencia de áfidos *Aphis gossypii* y *Myzus persicae*. En 1995 Hernández et al. colectaron malezas, plantas de chile y jitomate en nueve localidades de Yucatán y detectaron la presencia la TMV, TEV, TRSV y PEV. Bravo et al. en 1995 identificaron por hibridación molecular los hospedantes alternos de algunos geminivirus con la finalidad de plantear estrategias de manejo integrado para reducir los daños causados por el “chino del chile”. Aquilar – Rios y Lozoya 1995 detectaron la presencia del CMV, ZMV, TMV y FYMV por medio de ELISA en 19 especies de 11 familias asociadas al cultivo de cucurbitáceas.

En este trabajo, dada la abundancia de malezas con síntomas de virosis en los linderos de los sembradíos de Atlixco Puebla se decidió determinar los virus presentes en *Leonotis nepetifolia* y caracterizarlos biológicamente. *Leonotis nepetifolia*, a pesar de ser considerada planta anual, se encuentra durante todo el año en los linderos de los sembradíos en la localidad de agricultura de riego de Atlixco Puebla, lo que la hace un buen hospedante alternativo de virus durante las temporadas del año en las que no se cultivan las zonas aledañas. En este trabajo se combinó el análisis de los patrones electroforéticos de RNAdc, la microscopia electrónica, la formación de inclusiones virales, el rango de hospedantes y la serología para la identificación y caracterización de todos los patógenos de RNAdc de *Leonotis nepetifolia* colectada en las riveras de los sembradíos de Atlixco Puebla considerando que en la detección de virus por PCR, ELISA o hibridación de ácidos nucleicos, pueden pasar inadvertidos virus que no correspondan a los antisueros, cebadores o sondas probados. Por otro lado, la determinación de virus por los síntomas en el rango de

hospedantes requiere de experiencia para su reconocimiento, la variación en las condiciones ambientales afecta su expresión, la variabilidad en las poblaciones virales y la de las variedades hospedantes pueden modificar la manifestación de síntomas (Dodds 1987).

En el análisis de plantas silvestres de *L. nepetifolia* con síntomas de virosis, fue frecuente encontrar complejos virales. Se determinó la presencia de dos representantes de la familia *Bromoviridae*: el virus mosaico del pepino (CMV) y el virus mosaico de la alfalfa (AMV) y un virus de la familia *Luteoviridae*: el virus mosaico del tabaco (TMV) además de un RNA de bajo peso molecular (CARNA 5) probablemente asociado al CMV que no fue posible transmitir por medios mecánicos ni caracterizar. Los ensayos serológicos ELISA indicaron la presencia de AMV en muestras con cálico blanco, cálico amarillo-blanco y con enchinamiento y reducción foliar; el CMV se encontró en las muestras con mosaico, en algunas de ellas se encontró asociado al TMV; éste se localizó frecuentemente en muestras con enchinamiento foliar y con cálico amarillo intenso. El análisis de patrones electroforéticos de RNAdc de plantas de *L. nepetifolia* evidenció al CMV en todas las muestras y al TMV en algunas (cálico amarillo, mosaico y reducción foliar). En ninguna de las muestras se identificó el patrón de corrimiento característico de AMV. El patrón de corrimiento de RNAdc de plantas de *L. nepetifolia* inoculadas en invernadero con mezcla de CMV y AMV evidenció la presencia únicamente del primero, sin embargo el ensayo ELISA demostró la presencia de AMV. De esta manera, aún cuando el análisis de RNAdc ofrece ventajas, es posible que en mezclas de virus la eficiencia de la técnica sea limitada.

Los tres virus de *L. nepetifolia* fueron transmitidos mecánicamente a las plantas indicadoras utilizadas de manera eficiente, excepto el probable CARNA 5. El AMV y CMV son virus transmitidos de manera no persistente por muchas especies de áfidos (Brunt et al. 1996). En el presente trabajo se transmitió con una eficiencia del 100% a estos virus utilizando *Myzus persicae*, la presencia del virus en las plantas infectadas fue corroborada por inspección visual y a través del análisis de RNAdc. La presencia constante del complejo AMV/CMV en las plantas analizadas puede ser explicada por la diseminación de ambos por áfidos.

El CMV es un virus con distribución mundial del cual se han aislado una serie de variedades que difieren en su rango de hospederos y en su patogenicidad y que pueden ser agrupados, con base en relaciones serológicas, en el subgrupo DTL distribuido en regiones

tropicales y subtropicales y que genera síntomas severos, y en el subgrupo ToRS que se distribuye en regiones templadas (Rizos et al 1992). Recientemente se han denominado, con base en su sensibilidad térmica, como CMV-I y CMV-II (Hasse et al. 1989), el primero no es sensible a 32 °C, causando síntomas aún a mayores temperaturas. Variantes de este subgrupo se encuentran en regiones tropicales y subtropicales. El subgrupo CMV-II causa síntomas a 25 °C, pero no a 32 °C y sus variantes se localizan en regiones templadas (Owen and Palukaitis 1988). El aislamiento de CMV obtenido a partir de *L. nepetifolia* se identifica como variante que pertenece al subgrupo I dado que se aisló y mantuvo en condiciones de invernadero donde las temperaturas fluctúan entre los 25 y 40 °C.

EL AMV es un virus de distribución mundial cuyas variantes no han sido agrupadas. Los síntomas del aislamiento de *Leonotis nepetifolia* en *Vigna unguiculata* y en 10 variedades criollas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en distintas regiones del Estado de Puebla se compararon con los producidos por el aislamiento de AMV obtenido de *Physalis ixoparpa* colectadas en el Estado de Morelos, Puebla y Estado de México por De la Torre en 1995. En ocho de las 10 variedades de *P. vulgaris* el aislamiento de *L. nepetifolia* produjo lesiones necróticas locales, mientras que solo 6 variedades de *P. vulgaris* y *V. unguiculata* mostraron el síntoma tras ser inoculadas con el aislamiento de De la Torre. Estas observaciones permiten sospechar de variaciones en los aislamientos que habría que caracterizar.

El virus mosaico del tabaco (TMV) fue fácil de separar, aunque no fue el más frecuente en el material colectado y muy difícil de eliminar cuando se encontró con otros virus. TMV es de fácil transmisión mecánica; no se conocen insectos vectores que lo distribuyan por el campo y la transmisión por semilla no existe, por lo que la posibilidad de distribución de este virus es principalmente por contaminación inducida por el hombre durante las prácticas de manejo, que explica el bajo número de muestras que se encontraron con este virus (Zaitlin and Israel, 1975).

Plantas de *Leonotis nepetifolia* fueron inoculadas con CMV, AMV y con mezcla AMV/CMV (tejido enfermo en proporción 1:1), como se mencionó en párrafos anteriores los síntomas mostrados por cada una de ellas fueron mosaico, cálico amarillo y mosaico respectivamente. El análisis de RNAdc evidenciaron la presencia de AMV y de CMV en los lotes inoculados de manera individual. En el lote coinfectado el análisis de RNA dc

evidenció el patrón electroforético característico de CMV por lo que se procedió a la detección de por ELISA en hojas no inoculadas, como se indica en el Cuadro no. 7. Del resultado se deduce que la concentración de los RF's de AMV no están en niveles suficientes para ser evidenciados mediante RNAdc y que el movimiento de la proteína de la cápside o del RNA3 o del fragmento subgenómico (RNA4) no se vio impedida por la presencia de CMV. Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten distinguir el tipo de interacción que se establece en la coinfecciones AMV/CMV. Sería interesante utilizar en posteriores trabajos técnicas que permitan cuantificar la concentración de los RNA de cada uno de los virus para intentar establecer si la cinética de síntesis de cada uno se ve alterada en la coinfección.

En *Leonotis nepetifolia* AMV, CMV y TMV forman mezclas en numerosas muestras, por lo que fue evidente que esta maleza es susceptible y reservorio de diferentes virus, cuyo comportamiento epidemiológico podría evaluarse en el futuro.

VII.- Conclusiones

Los síntomas de virosis en las poblaciones *Leonotis nepetifolia* de Atlixco Puebla son producidas por un complejo viral en el que participan al menos el virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV), y el virus mosaico del tabaco (TMV).

Los aislamientos del virus mosaico de la alfalfa y el mosaico del pepino, aislados de *L. nepetifolia*, son transmitidos eficientemente por el áfido *Myzus persicae* en condiciones de laboratorio.

Los resultados del presente trabajo indican que ninguno de los virus determinados en las poblaciones naturales de *L. nepetifolia* son transmitidos por semilla.

Leonotis nepetifolia es un hospedante alternativo importante para la sobrevivencia y como fuente primaria de inóculo de los tres virus.

evidenció el patrón electroforético característico de CMV por lo que se procedió a la detección de por ELISA en hojas no inoculadas, como se indica en el Cuadro no. 7. Del resultado se deduce que la concentración de los RF's de AMV no están en niveles suficientes para ser evidenciados mediante RNAdc y que el movimiento de la proteína de la cápside o del RNA3 o del fragmento subgenómico (RNA4) no se vio impedida por la presencia de CMV. Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten distinguir el tipo de interacción que se establece en la coinfecciones AMV/CMV. Sería interesante utilizar en posteriores trabajos técnicas que permitan cuantificar la concentración de los RNA de cada uno de los virus para intentar establecer si la cinética de síntesis de cada uno se ve alterada en la coinfección.

En *Leonotis nepetifolia* AMV, CMV y TMV forman mezclas en numerosas muestras, por lo que fue evidente que esta maleza es susceptible y reservorio de diferentes virus, cuyo comportamiento epidemiológico podría evaluarse en el futuro.

VII.- Conclusiones

Los síntomas de virosis en las poblaciones *Leonotis nepetifolia* de Atlixco Puebla son producidas por un complejo viral en el que participan al menos el virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del pepino (CMV), y el virus mosaico del tabaco (TMV).

Los aislamientos del virus mosaico de la alfalfa y el mosaico del pepino, aislados de *L. nepetifolia*, son transmitidos eficientemente por el áfido *Myzus persicae* en condiciones de laboratorio.

Los resultados del presente trabajo indican que ninguno de los virus determinados en las poblaciones naturales de *L. nepetifolia* son transmitidos por semilla.

Leonotis nepetifolia es un hospedante alternativo importante para la sobrevivencia y como fuente primaria de inóculo de los tres virus.

VIII.- Bibliografía

Aguilar – Rios R. y Lozoya – Saldaña H. 1995. Virus en malezas asociadas a cucurbitáceas. Congreso Nacional de Fitopatología. México.

Aguilar-Rios R y Lozoya S. H. 1994 Virosis de Cucurbitáceas en el Estado de Morelos. Rev. Mex. de Fitopatología 12,1:11-13.

Alvizo V. H. y Rodríguez M. R. 1987 Virus de Cucurbitáceas En: Alvizo V. H. y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. Mex. de Fitopatología. México. pp 182-199.

Bravo L., Frías G.A., Garzón J.A., Rivera R., Gilbertson R y Rojas M. 1995 Hospederos alternantes del virus del chile en Ramos Arizpe Coahuila. Congreso Nacional de Fitopatología. México.

Brunt A.A., Crabtree K., Dallwits M.J., Gibbs A.J., Watson L. and Zurcher E.J. 1996 Plant viruses online: descriptions and lists from de VIDE database. Version:20th. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>

Burnett P. A. y Gilchrist L. 1987 Virosis que afectan los cereales de grano pequeño en México. En: Alvizo V. H y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. Mex. de Fitopatología. México. pp. 200-224.

Cárdenas S. E. 1986 Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales. Colegio de Postgraduados. México.

Carter W. 1973 Ecological aspects of plant virus transmission. En: Carter W. Insects in relation to plant diseases. 2a. Ed. John Wiley and Sons. USA.

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

Conzelmann K-K. 1998 Nonsegmented negative-strand RNA viruses: Genetics and manipulation of viral genomes. Annu. Rev. Genet. 32:123-162.

Damsteegt V.D. 1981 Exotic virus and viruslike disease of maize. En: Gordon D.T., Knoke J.K. and Scott G.E. Virus and viruslike disease of maize en the United States. South. Coop. Ser. Bull. USA.

Dawson W. O. and Hilf M.E. 1992 Host-range determinants of plant viruses. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 43:527-555.

De la Torre A. R. 1997 Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. México.

De la Torre A. R., Guevara R.G., Ascencio J. T. y Rivera-Bustamante R. 1995 Detección y determinación de geminivirus en diversos cultivos en los Valles Altos de México. XXII Congreso Nal. de Fitopatología. México.

- Delgadillo S. F. 1987 Principales virus del maíz en México. En: Alvizo V. H y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. de Mex. de Fitopatología. México. pp 113-137.
- Delgadillo S. F., Vega P. A. y Garzón T. J. A. 1987 Identificación y distribución de los virus del melón en el Valle de Apatzingán, Michoacán. Rev. Mex. de Fitopatología. 5:17-20.
- Díaz-Valasis M., Cadena-Hinojosa M. A., García-Espinoza R. y Estañol-Botello E. 1995 Efecto de dos aislamientos del virus "X" de la papa en los principales cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) sembrados en México. Rev. Méx. de Fitopatología. 13:10-17.
- Dodds A. 1987 The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. En: Jones R.A. and Torrance L. Developments and applications in virus testing. Association of applied biologists. Great Britain.
- Galindo A. J., Smith D.R., and Diener T.O. 1982 Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. Phytopathology 72:49-54.
- García E. 1988 Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Ed. Enriqueta García de Miranda. México.
- Garzón T. J. 1985 Informe anual de Investigación en virus del melón en México. INIA, SARH. México.
- Garzón T. J. A. 1987 Presencia de Virus en los cultivos de chile (*Capsicum annuum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) en México. En: Alvizo V. H y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. Mex. de Fitopatología. México. pp 156-180.
- Goldbach R., Rezelman G. and Van Kammen A. 1980 Independent replication and expression of B-component RNA of cowpea mosaic virus. Nature 286, 297-300.
- Hamptom R., Ball E. and De Boer S. 1990 Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. The American Phytopathological Society. APS Press. pp. 387.
- Harris K.F. 1981 Arthropod and Nematode vectors of plant viruses. Ann. Rev. of Phyto. 19:391-426.
- Hasse A., Richter J. and Rabenstein F. 1989 Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. J. Phytopathology 127:129-136.
- Hernández E., Pinto B.C. y Cárdenas S.E. 1995 Virosis en chile, jitomate y maleza en nueve localidades de Yucatán y evaluación de tolerancia de *Lycopersicon spp.* Congreso Nacional de Fitopatología. México.
- Houwing C.J., P. van de Putte and E.M.J. Jaspars. 1998 Regulation of single-strand RNA

synthesis of alfalfa mosaic virus in non-transgenic cowpea protoplast by the viral coat protein. Arch. Virol. 143: 489-500.

INEGI. 1997 Cultivos anuales de México VII Censo Agropecuario. México.

Jiménez G. E. 1987 Virus del frijol. En: Alvizo V. H y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. Mex. de Fitopatología. México. pp 138-142.

Jiménez G. E. 1987 Virus del mosaico sureño -MSV. En: Alvizo V. H y Lozoya S. H. Temas en Virología II. Soc. Mex. de Fitopatología. México. pp 144-147.

Jiménez-Díaz F. 1996 Maleza hospedera de virus, fluctuación poblacional de vectores y su relación con enfermedades virales del melón (*Cucumis melo*) en la Comarca Lagunera, México. Rev. Mex. de Fitopatología. 14,1:31-37.

Kong Q., Wang J. and Simon A. E. 1997 Satellite RNA-mediated resistance to Turnip Crinkle Virus in *Arabidopsis* involves a reduction in virus movement. The Plant Cell 9:2051-2063.

Lepiz I. R. 1986 Enfermedades del frijol en México. Rev. Mex. de Fitopatología. 4:176-181.

Luria S.E., Darnell J.E., Baltimore D. and Campbell A. 1978 General Virology. John Wiley and Sons 3a. Ed. U.S.A.

Martínez R. J. L. 1990 Manejo integrado de virosis en jitomate. Rev. Mex. de Fitopatología. 8:132-134.

Martínez S. J. P. 1987 Procedimiento simple para el diagnóstico de las virosis del chile serrano elaborado para no especialistas. Rev. Mex. de Fitopatología. 5:148-150.

Morris T.J., Dodds J.A. and Ohr H.D. 1979 Isolation and analysis of double stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69:854-858.

Mushegian A. R., Malysenko S. I., Taliansky M. E. and Atabekov J. G. 1989 Host-dependent suppression of temperature-sensitive mutations in tobacco mosaic virus transport gene. J. Gen. Virol. 70:3421-3426.

Nassuth A., Bruggencate G. T. and Bol J. F. 1983 Time course of alfalfa mosaic virus RNA and coat protein synthesis in cowpea protoplast. Virology 125, 75-84.

Nassuth N. and Bol J. F. 1983 Altered balance of the synthesis of Plus and minus strand RNAs induced by RNAs 1 and 2 of Alfalfa mosaic virus in the absence of RNA 3. Virology 124: 75-85.

Nishinguchi M., Motoyoshi F. and Oshima N. 1978 Behavior of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. J. Gen. Virol. 39:53-61.

Nobmann de O. B. 1973 El virus del mosaico del maíz en México. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de posgraduados. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México.

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

Piña R. J. 1986 Detección del virus enrollamiento de la hoja de papa (SEP) por medio de la técnica inmuno-enzimática (ELISA). *Rev. Méx. de Fitopatología*. 4:93-97.

Pringle C.R. 1999 Virus taxonomy 1999 The universal system of virus taxonomy, update to include the new proposals ratified by International Committee on Taxonomy of viruses during 1998. *Arch. Virol* 144,2:421-429.

Pruss G., Ge X., Shi M.X., Carrington J.C and Vance V.B. 1997 Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell*. 9:859-868.

Ramírez-Arredondo J. A. y Gallegos J. G. 1995 Comportamiento de cultivares de calabacita a virosis en el Valle del Mayo, México. *Rev. Mex. de Fitopatología*. 13:57-63.

Ramírez-Arredondo J. A., Armenta-Cárdenas I., Delgadillo-Sánchez F., Rivera-Bustamante R. F y Garzón-Tiznado J. A. 1995 Virus transmitidos por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) Genn. en los cultivos de chile y calabacita en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Rev. Mex. de Fitopatología*. 13:100-105.

Rao A. L. N. T. Hatta y R. I. B. Francki. 1982 Comparative studies on Tomato Aspermy and Cucumber Mosaic Viruses. *Virology* 116: 318-326.

Rizos H., Gunn L.V., Pares R.D and Gillings M.R. 1992 Differentiation of cucumber mosaic virus using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* 73:2099-2103.

Roberts I.M. 1986 Practical aspects of handling, preparing and staining samples containing plant virus particles for electron microscopy. En: Jones R. A. C. and Torrance L. *Developments and applications in virus testing*. Association of applied Biologists. Great Britain.

Robinson D.J., Barcker H., Harrison B.D. and Mayo M. A. 1980 Replication of RNA 1 of tomato black ring virus independently of RNA 2. *J. Gen Virol*. 51: 317-326.

Rocha P. M. A. 1981 Algunos aspectos relacionados con el virus rayado fino del maíz en México. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo México.

Rocha P. M. A. 1985 Aspectos ecológicos en la diseminación de enfermedades virosas. En: Rocha P. M. A y González G. R. *Temas en Virología*. Soc. Mex. de Fitopatología. México.

Rocha P. M. A. Galindo J. y Rodríguez M. 1980 Identificación del virus rayado fino del maíz en México. Resúmenes IX Congreso Nacional de Fitopatología. Soc. Mex. de Fitopatología. Uruapan Michoacán, México.

Rocha P. M. A., Becerra N. y Ruíz P. 1982 Presencia del enanismo rayado del maíz en México. Resúmenes X Congreso Nacional de Fitopatología. Soc. Mex. de Fitopatología. Culiacán Sinaloa, México.

Rodríguez G. S. 1983 El virus X de la papa en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Mex. P 44.

Rzedowski G. C. 1979 La flora fanerogámica del Valle de México. Ed. Rzedowski. Compañía Editorial Continental. México.

Sambrook J., Fritsch E.S. and Maniatis T. 1989 Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor N.Y.

Scott H.A. 1963 Purification of Cucumber mosaic virus. *Virology* 20: 103-106.

Séron and Haenni A. 1996. Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 6:435-442.

Silva V. S., Rodríguez M. R., Garzón T. J. A., Delgadillo S. F. y Cárdenas S. E. 1994 Efecto de una variante del virus enrollamiento de la hoja de la calabaza (VEHC, squash leaf curl virus, SqLCV) en genotipos de cucurbitáceas. *Rev. Mex. Fitopatología*. 12,1:15-20.

Smith. C. H. and E. M. Jaspars. 1982 Evidence that RNA 4 of Alfalfa mosaic virus does not replicate autonomously. *Virology* 117, 271-274.

Stevens W.A. 1990 *Virology of flowering plants*. Glasgow and London. USA.

Tapia G.J. 1986 Caracterización y purificación del virus moteado clorótico del maíz en México. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

Torres-Pacheco I. 1995 Interacción entre el virus huasteco del chile y el virus jalapeño del chile. XXII Congreso Nal. de Fitopatología. Jalisco México.

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

Verdugo G.F. 1989 Etiología de una nueva enfermedad en tomate. XVI Congreso Nacional de Fitopatología. México p 14.

Vloten-Doting L.V. and Jaspars E.M.J. 1972. The uncoating of alfalfa mosaic virus by its own RNA. *Virology* 48:699-708.

Walkey D.G.A. 1985 *Applied plant Virology*. John Wiley and Sons. New York. USA.

Yáñez-Morales M. J. y Delgadillo S. F. 1991 Las virosis del melón (*Cucumis melo*) en el sur de Tamaulipas, México. Rev. Mex. de Fitopatología 9:1-4.

Zaitlin M. and Israel H.W. 1975 Tobacco mosaic virus (type strain). CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 151.