



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS ASOCIADO A
RAYADO DEL PLÁTANO EN MONTE
BLANCO, VERACRUZ**

OLIVIA NABOR ROMERO

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

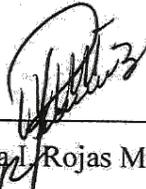
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS ASOCIADO A RAYADO DEL PLÁTANO EN MONTE BLANCO, VERACRUZ**, realizada por la alumna: Olivia Nabor Romero bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

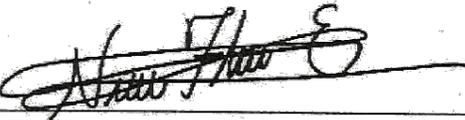
**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 
Dra. Reyna L. Rojas Martínez

DIRECTOR: 
Dr. Juan Carlos Noa Carrazana

ASESORA: 
Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESORA: 
Dra. Norma Flores Estévez

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Noviembre 2014

RESUMEN
IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS ASOCIADO A RAYADO DEL PLÁTANO EN
MONTE BLANCO, VERACRUZ.

Olivia Nabor Romero, MC.
Colegio de Postgraduados, 2014.

El plátano (*Musa* spp.) es uno de los cultivos más importantes en México, debido a que su fruto forma parte de la dieta básica en nuestro país. Es afectado por diversas enfermedades entre las que destacan las inducidas por virus que limitan la producción, en algunos países han ocasionado pérdidas económicas hasta del 90%. En Monte blanco, Fortín de las flores, Veracruz, se observaron plantas con síntomas parecidos a los inducidos por los virus *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) y *Banana streak badnavirus* (BSV), caracterizados por un rayado clorótico que progresivamente se torna necrótico. Con la finalidad de determinar cuál de los virus es el causante de esta sintomatología, se colectaron hojas con síntomas evidentes, se realizó la transmisión mecánica y biológica con pseudocóccidos, se purificó al virus y se realizaron cortes ultraestructurales de tejido enfermo para conocer la morfología de la partícula viral mediante microscopía electrónica de transmisión, y finalmente mediante PCR se realizó la identificación molecular. Las pruebas de transmisión mecánica fueron negativas; sin embargo, con el pseudocóccido *Pseudococcus longispinus*, alimentado previamente en plantas enfermas, se logró transmitir la enfermedad, reproduciéndose la sintomatología observada en campo; en las plantas que desarrollaron los síntomas se comprobó la presencia de virus por PCR. La purificación no fue exitosa y en los cortes ultraestructurales no se observaron partículas virales, no obstante, la desorganización de tilacoides y muerte celular fueron evidentes en el tejido enfermo. Con base en la reproducción de la sintomatología y el resultado del análisis molecular se concluyó que el rayado del plátano en Veracruz, México es ocasionado por BSV.

Palabras clave: *Banana streak badnavirus*, *Pseudococcus longispinus*, PCR, plátano, rayado clorótico y necrótico.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF THE VIRUS ASSOCIATED TO BANANA STREAK IN MONTE BLANCO, VERACRUZ

Olivia Nabor Romero, MC.
Colegio de Postgraduados, 2014.

The banana (*Musa* spp.) is one of the most important crops in Mexico because its fruit is part of the staple diet in our country. It is affected by various diseases among which are induced by viruses that limit production, in some countries caused economic losses of up to 90%. In Monte blanco, Fortin de las flores, Veracruz, were observed plants with similar symptoms to those induced by *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) and *Banana streak badnavirus* (BSV), characterized by a chlorotic streak to become progressively necrotic. In order to determine which virus is causing these symptoms, leaves were collected with obvious symptoms, was performed mechanical transmission and biological with mealybugs, was purified to virus and ultrastructural cuts of diseased tissue were performed to determine the morphology of viral particles by transmission electron microscopy, and finally molecular identification by PCR was performed. The mechanical transmission tests were negative; however, with mealybug *Pseudococcus longispinus*, previously fed on infected plants, it was possible to transmit the disease, reproducing the symptomatology observed in the field; in plants developed symptoms, the presence of viruses was checked by PCR. Purification was unsuccessful and no ultrastructural cuts virus particles were observed; however, disorganization of thylakoids and cell death was evident in the diseased tissue. Based on the reproduction of symptoms and the results of molecular analysis concluded that striped banana in Veracruz, Mexico is caused by BSV.

Keywords: *Banana streak badnavirus*, *Pseudococcus longispinus*, PCR, banana, streak chlorotic and necrotic.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** y al **Instituto de Fitosanidad** por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de maestría; así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el financiamiento otorgado durante mis estudios.

Al Proyecto No. 179879. Convocatoria Ciencia Básica – SEP-CONACYT -2012-01, por el financiamiento recibido para realizar la presente investigación.

A mi consejera, **Dra. Reyna I. Rojas Martínez** por toda la paciencia y confianza depositada en mí, por compartir conmigo sus conocimientos y por su valioso tiempo en la revisión continua de mi trabajo, así como en el seguimiento de mi formación académica.

Al **Dr. Juan Carlos Noa Carrazana** por orientarme en la formulación de la tesis así como en la supervisión de la misma, y por el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía** por su disposición y sugerencias que ayudaron a mejorar mi trabajo, así como las correcciones en el escrito y artículo.

A la **Dra. Norma Flores Estévez** por su apoyo y recomendaciones en la purificación de partículas virales.

Al **Dr. Héctor González Hernández** por el apoyo en la identificación de los pseudocóccidos utilizados en la transmisión del virus.

Al **MC. Camilo Hernández Juárez** por facilitarme un espacio dentro del invernadero de virus de la Universidad Autónoma Chapingo, y a **Mario Salazar Segura** por el apoyo en las pruebas de transmisión mecánica.

Al **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez** por apoyarme a resolver algunas dudas y por el préstamo de reactivos de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio el **MC. Moisés Camacho Tapia** por su asesoría y sugerencias en la extracción de DNA y PCR, del mismo modo al **Dr. Yunior M. Morán Gómez** en su ayuda en el análisis de secuencias.

Al **Dr. Elliot Kitajima** por su asesoría en algunas dudas en las imágenes obtenidas de microscopía electrónica.

DEDICATORIA

A **Dios**, por darme salud y fuerza necesaria para salir adelante, por iluminar mi mente para lograr alcanzar esta meta.

A mis padres **Bernabé Nabor Rodríguez** y **Carmen Romero Martínez**, por sus cuidados y amor que en cada segundo de mi vida me han brindado; por sus sabios consejos que me orientaron por el camino recto de la vida y por enseñarme que toda disciplina tiene su recompensa. Les agradezco por todos los esfuerzos que han hecho y quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes, porque que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo, los amo.

A mis hermanos **Diego**, **Norma** y **Alejandra**, quienes con su amor y apoyo me han impulsado a salir adelante, dándome palabras de aliento y estar siempre al pendiente de mí. De igual manera a **Carlos**, por ser una gran persona, por estar con nosotros y apoyarnos siempre.

A mis sobrinos **Emiliano**, **David** y **Alonso**, porque llenan de alegría cada día de mi vida.

A mi abuelita **Carmen**, por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante; yo sé que sus oraciones fueron escuchadas.

A **Manuel**, que con paciencia y amor me has permitido formar parte de tu vida. Gracias por hacerme feliz, apoyarme en todo momento y darme consuelo cuando la ausencia de los míos se hacía notar.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades del plátano	3
2.2. Situación del plátano en México	4
2.3. Situación del plátano en Veracruz	4
2.4. Enfermedades virales en el cultivo de plátano	5
2.5. Virus del mosaico suave del plátano (<i>Banana mild mosaic virus</i> , BanMMV)	5
2.6. Virus del mosaico de las brácteas del plátano (<i>Banana bract mosaic potyvirus</i> , BBrMV)	6
2.7. Virus del cogollo racimoso del plátano (<i>Banana bunchy top nanovirus</i> , BBTv)	6
2.8. Virus baciliforme de la caña de azúcar (<i>Sugarcane bacilliform virus</i> , ScBV)	7
2.9. Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> , CMV)	7
2.10. Virus X del plátano (<i>Banana virus X</i> , BVX)	8
2.11. Virus del mosaico del ábaca (<i>Abaca mosaic virus</i> , AbaMV)	8
2.12. Virus de la raya necrótica del plátano escarlata (<i>Scarlet banana necrotic streak virus</i> , SBanNSV)	9
2.13. Virus muerte regresiva del plátano (<i>Banana die-back virus</i> , BDBV)	9
2.14. Virus del rayado del banano (<i>Banana streak badnavirus</i> , BSV)	9
2.15. Transmisión de virus.....	10

III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Ubicación de la parcela en estudio	12
3.2. Colecta de muestras	12
3.3. Incidencia del virus en la parcela	12
3.4. Transmisión mecánica	13
3.5. Transmisión por pseudocóccidos	14
3.6. Extracción de DNA de plantas e insectos	15
3.7. Detección del virus por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
3.8. Purificación y observación de las partículas virales	17
IV. RESULTADOS	18
4.1. Descripción de síntomas en plantas infectadas en campo	18
4.2. Transmisión mecánica y por pseudocóccidos	19
4.3. Purificación y observación de las partículas virales	20
4.4. Extracción de DNA.....	21
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
V. DISCUSIÓN	25
VI. CONCLUSIÓN	27
VII. LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño de muestreo en zig-zag con puntos cuadrantes de 10 x 10m.....	13
Figura 2. Sintomatología viral en plantas de plátano de Monte blanco en campo e invernadero.....	18
Figura 3. Síntomas observados en plantas inoculadas a través de <i>Pseudococcus longispinus</i>	19
Figura 4. Purificación de partículas virales y microscopia electrónica de transmisión de cortes de la ultraestructura celular	20
Figura 5. Gel de agarosa al 0.8% con DNA obtenido de muestras de plantas de plátano. .	21
Figura 6. Gel de agarosa al 0.8% con DNA obtenido de pseudocóccidos	21
Figura 7. Productos de PCR obtenidos de plantas de plátano analizadas para la detección de virus con los iniciadores degenerados para <i>Badnavirus</i> y específicos para BSV	22
Figura 8. Productos de PCR obtenidos de pseudocóccidos analizados para la detección de virus con los iniciadores degenerados para <i>Badnavirus</i> y específicos para BSV	24
Figura 9. Árbol filogenético que representa la relación entre <i>Banana streak badnavirus</i> (KM259633) identificado en la parcela de Monte blanco, con diferentes especies de BSV, <i>Sugarcane bacilliform virus</i> , <i>Commelina yellow mottle virus</i> y <i>Cucumber mosaic virus</i> utilizadas como raíz	24

I. INTRODUCCIÓN

El plátano o banano (*Musa spp.*) se produce en 130 países; es uno de los cultivos más importantes en la agricultura, ocupando el 4º lugar en importancia, después del arroz, trigo y el maíz. Es considerado como una fruta básica en la alimentación mexicana, debido a su bajo precio, rico sabor, múltiples combinaciones de cocina, la sensación de saciedad que produce y su valor nutritivo en potasio, hierro y vitamina k. Su exportación genera altos ingresos y una buena fuente de empleos (FAO, 2004).

En general se conocen dos tipos de especies de plátano *Musa cavendish* (plátano comestible crudo) y *Musa paradisiaca* (plátano para cocción). En México, el término de plátano se aplica tanto a plátanos de cocción (plátano macho) como a plátanos de consumo crudo (banano) es decir cuando están maduros, por ello para homogeneizar criterios entre “plátanos y bananos” únicamente se utiliza el término de plátanos (Noa *et al.*, 2008).

El cultivo de plátano es afectado por numerosas enfermedades inducidas por hongos, virus, bacterias y nematodos (Noa *et al.*, 2008). Entre las enfermedades que causan severos daños en las plantaciones de plátano se encuentran la Sigatoka negra inducida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, el mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum*, el moko bacteriano por *Ralstonia solanacearum* raza 2 E.S, el nematodo perforador del plátano, *Radopholus similis* y el virus del arrosamiento del cogollo del plátano (*Banana bunchy top nanovirus*, BBTV) (Jones, 2000).

Alrededor del mundo se han reportado 10 enfermedades virales que afectan el género *Musa*: virus del rayado del plátano (*Banana streak badnavirus*, BSV), virus del mosaico suave del plátano (*Banana mild mosaic virus*, BanMMV), virus del mosaico de las brácteas del plátano (*Banana bract mosaic virus*, BBrMV), virus del cogollo racimoso del plátano (*Banana bunchy top nanovirus*, BBTV), virus baciliforme de la caña de azúcar (*Sugarcane bacilliform virus*, ScBV), virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV), Virus X del plátano (Banana virus X, BVX), virus mosaico del abacá (*Abaca mosaic virus*, AbaMV), Virus de la raya necrótica del banano escarlata (*Scarlet banana necrotic streak virus*, SBanNSV), y virus muerte regresiva del plátano

(*Banana die-back virus*, BDBV) (Lockhart y Autrey, 1991; Lockhart, 1993; Thomas *et al.*, 2000; Martínez, 2002; Teycheney *et al.*, 2005; Javer, 2007; Reichel *et al.*, 2008).

En la localidad de Monte blanco, Fortín de las flores, Veracruz, se observaron plantas con síntomas parecidos a los inducidos por los virus *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) y *Banana streak badnavirus* (BSV), caracterizados por un rayado clorótico que progresivamente se torna necrótico. El objetivo de la presente investigación fue identificar al virus asociado al rayado del plátano mediante pruebas biológicas y moleculares.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del plátano

Los plátanos descienden de dos ancestros silvestres: *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B). El cruce entre estas dos variedades *M. acuminata* (AA) y *M. balbisiana* (BB) ha dado origen a una serie de grupos entre los cuales se pueden encontrar AA, AB, AAA, AAB, ABB, AABB, AAAB y ABBB. Como alimento es considerado uno de los cultivos más importantes en el mundo. Son consumidos extensivamente en los trópicos, donde se cultivan y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por la disponibilidad durante todo el año (Vázquez *et al.*, 2005).

El cultivo de plátano es originario del área comprendida entre el archipiélago de Filipinas y la península de Malaca, Mar de China Meridional y Mar de Java, siendo conocido en el Mediterráneo desde el año 650. La especie llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevado a América en el año 1516. El cultivo comercial se inicia en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Marín *et al.*, 2002; Daniells *et al.*, 2001).

Es una planta herbácea, perenne, con rizoma corto y tallo aparente, que resulta de la unión de las vainas foliares, cónico y de 3.5m a 7.5m de altura que termina en una corona de hojas (Orozco-Santos *et al.*, 2004).

El fruto que produce es oblongo y en su crecimiento se dobla geotrópicamente, los comestibles son de partenocarpia vegetativa, es decir que desarrollan una masa de pulpa comestible sin polinización. Los óvulos se atrofian pronto, pero se pueden reconocer en la pulpa comestible. La partenocarpia y la esterilidad son mecanismos diferentes, debido a la presencia de genes específicos de esterilidad femenina, triploidía y cambios estructurales cromosómicos (Araya, 2008).

2.2. Situación del plátano en México

El plátano es uno de los cultivos más importantes en la agricultura, en frutas tropicales ocupa el primer lugar y es considerado una fruta básica en la alimentación mexicana. Además, se utiliza en intercalación de café (*Coffea arábica* L) con plátano (*Musa acuminata* Colla) ya que en estos sistemas no sólo se comercializa el café, sino además, la hoja tierna de plátano llamada “velillo” que se utiliza como envoltura de tamales y que tiene un mercado nacional e internacional. A partir de 1990, se registró un fuerte incremento en el precio del velillo (entre 450 y 600%) que motivó la expansión e intensificación del cultivo de plátano dentro de los cafetales, lo que hace suponer la existencia de un proceso de generación y transferencia de tecnología dentro y entre comunidades (Licona *et al.*, 2005). En 2012 se reportó una superficie sembrada de 2,070.00 hectáreas para producción de velillo, obteniendo 23,488.50 toneladas, con un valor de producción de \$25,304.66 (SIAP, 2012).

En México se cultivan alrededor de 75,009.99 hectáreas de plátanos y bananos, con una producción total de 2,127, 772.29 toneladas de fruta (SIAP, 2013), de las cuales el 93% se destina al consumo nacional y el 7% restante a la exportación (SIC-Agro, 2013).

La zona platanera se ubica en las regiones costeras del Océano Pacífico y Golfo de México. Los estados productores son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Nayarit. Chiapas es el principal productor con una superficie sembrada de 23,223.07 Ha y una producción de 723,626.70 Ton (SIAP, 2013).

2.3. Situación del plátano en Veracruz

El estado de Veracruz ocupa el tercer lugar a nivel nacional en producción de plátano con una superficie sembrada de 15,109.22 Ha y una producción total de 277, 515.58 Ton. Los principales municipios productores son: San Rafael, Atzalán, Papantla, Tlapacoyan, Nautla y Otatitlán (SIAP, 2013). Veracruz, es la única entidad en el país que produce todas las

variedades comestibles de plátano existentes en el mercado, (largo, morado, roatán, dominico, bolsa, manzano, entre otras).

2.4. Enfermedades virales en el cultivo de plátano

Los virus son uno de los patógenos responsables de grandes pérdidas en el cultivo del plátano, por el efecto degenerativo que ocasionan, disminuyendo el rendimiento y calidad de los frutos. La severidad que ocasionan está estrechamente relacionada con el estado fisiológico de la planta en el momento de la infección, la susceptibilidad de la misma y las condiciones ambientales prevalentes, que pueden favorecer la expresión o enmascaramiento de los síntomas (Martínez, 2002).

Alrededor del mundo se han reportado diez enfermedades virales que afectan el género *Musa*; virus del mosaico suave del plátano (*Banana mild mosaic virus*, BanMMV), virus del mosaico de las brácteas del plátano (*Banana bract mosaic virus*, BBrMV), virus del cogollo racimoso del plátano (*Banana bunchy top nanovirus*, BBTV), virus baciliforme de la caña de azúcar (*Sugarcane bacilliform virus*, ScBV), virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV), virus X del plátano (Banana virus X, BVX), virus del mosaico del abaca (*Abaca mosaic virus*, AbaMV), virus de la raya necrótica del banano escarlata (*Scarlet banana necrotic streak virus*, SBanNSV), virus muerte regresiva del plátano (*Banana die-back virus*, BDBV) y virus del rayado del plátano (*Banana streak badnavirus*, BSV), (Lockhart y Autrey, 1991; Lockhart, 1993; Thomas *et al.*, 2000; Martínez, 2002; Teycheney *et al.*, 2005; Javer, 2007; Reichel *et al.*, 2008).

2.5. Virus del mosaico suave del plátano (Banana mild mosaic virus, BanMMV)

Es un virus recientemente conocido, con partículas filamentosas y flexosas cerca de 580 x 14 nm, su genoma es RNA de cadena sencilla (Thomas *et al.*, 2000; Viralzone, 2012). Produce pocos síntomas, o ninguno. En el cultivar Ducasse, las hojas jóvenes presentan un suave mosaico clorótico, pero las demás hojas son asintomáticas. Cuando el BanMMV infecta en asociación con el CMV se han observado grandes rayas cloróticas o finas

plateadas. La propagación vegetativa es el único medio por el cual se ha confirmado su transmisión (Thomas *et al.*, 2000).

2.6. Virus del mosaico de las brácteas del plátano (Banana bract mosaic potyvirus, BBrMV)

Pertenece al grupo de los potyvirus, posee RNA de cadena sencilla, con partículas virales en forma de varilla flexible de 720-850 nm de longitud y 12-15nm de diámetro (Viralzone, 2012).

Los síntomas que induce son: decoloración y rayas cloróticas muy claras que se desarrollan en las brácteas del botón masculino. En etapas iniciales se presentan rayas irregulares de color verdoso a café, esparcidas a lo largo de los pecíolos. A medida que la enfermedad progresa, se presenta una decoloración similar, que se hace muy definida en las brácteas de la inflorescencia masculina, el racimo y aún en los frutos. Un síntoma clave son las rayas ahusadas que se encuentran en el pseudotallo después de retirar las hojas secas que lo cubren. El virus es transmitido en forma no persistente por diferentes especies de pulgones, incluidos *Rhopalosiphum maidis*, *Aphis gossypii* y *Pentalonia nigronervosa* (Martínez, 2002).

2.7. Virus del cogollo racimoso del plátano (Banana bunchy top nanovirus, BBTV)

El BBTV es un miembro del grupo de los nanovirus, sus partículas son isométricas con un diámetro de 18-20 nm, las cuales contienen DNA de cadena sencilla.

Es considerado como la enfermedad viral más seria del plátano. Es transmitido de manera semipersistente por el áfido del plátano, *Pentalonia nigronervosa*, único medio reconocido de transmisión. Los síntomas aparecen en la segunda hoja que emerge después de la infección y consisten en rayas de color verde oscuro o puntos en las venas menores en la parte baja de la lamina foliar, generando líneas en forma de gancho al llegar a la vena central. Las hojas sucesivas se hacen más pequeñas tanto en longitud como ancho de la lamina foliar, presentando bordes cloróticos y enrollados hacia arriba. Las hojas se vuelven

quebradizas y más erguidas de lo normal, dando a la planta un aspecto de amacollamiento o roseta. El BBTV está ausente en el territorio nacional (Martínez, 2002; SENASICA, 2013).

2.8. Virus baciliforme de la caña de azúcar (*Sugarcane bacilliform virus*, ScBV)

Es un *Badnavirus* que consiste en genoma DNA de doble cadena contenido en partículas baciliformes con una longitud media de 131 nm \pm 7nm y una anchura media de 31nm \pm 2nm. El SCBV se observó por primera vez en Cuba en 1985 en caña de azúcar comercial B34104; posteriormente se encontró en Australia, Hawaii, Madagascar, África, Taiwan y EU.

Esta serológicamente relacionado con el BSV, Lockhart y Autrey (1991) mencionan que se les puede considerar como el mismo virus, debido a que no pueden ser aislados distintos, pero pueden representar una continua variabilidad genética. Hay cierta controversia en cuanto a la sintomatología, debido a que no hay síntomas específicos que se puedan atribuir a la infección, sin embargo, genotipos infectados en India mostraron manchas cloróticas que comienzan en las puntas de las hojas y se mueven hacia abajo, retrasando el crecimiento de la planta. Es transmitido por propagación vegetativa; por la cochinilla rosada, *Saccharicoccus sacchari* (Cockerelle), y por *Dysmicoccus boninsis* de manera semipersistente (Jason, 2003).

2.9. Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV)

El CMV, en plátano se describió por primera vez en Australia. Es miembro de los *Cucumovirus*, tiene una cadena sencilla de ARN en partículas isométricas de 29 nm de diámetro. Se transmite mecánicamente y en forma no persistente por varias especies de pulgones, los dos más comunes son el pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), y el pulgón del maíz (*Rhopalosiphum maidis*). También se han identificado como vectores a *Myzus persicae*, *Macrosiphum pisi* y *Rhopalosiphum prunifoliae*. El papel del pulgón del banano (*Pentalonia nigronervosa*), está en controversia. Los síntomas de la enfermedad se caracterizan por una clorosis internerval muy definida, mosaico foliar, deformación de hojas y en casos severos necrosis de la hoja cigarro y pudrición del pseudotallo. Las plantas

infectadas se quedan pequeñas y tienen una baja producción (Martínez, 2002; Dheepa and Paranjothi, 2010).

2.10. Virus X del plátano (Banana virus X, BVX)

Es un nuevo virus recientemente identificado en plátano, miembro de la familia Flexiviridae con genoma RNA. Se detectó cuando Teycheney *et al.* (2005) realizaban estudios de variabilidad molecular de aislados del BanMMV infectando plátano, identificaron una secuencia de nucleótidos corta que pertenecía a una especie viral distinta a los aislados que estaban estudiando. Se comprobó que es transmitido de forma mecánica; sin embargo, hasta el momento no hay una sintomatología descrita, las plantas analizadas para detección del virus fueron asintomáticas.

2.11. Virus del mosaico del abaca (*Abaca mosaic virus*, AbaMV)

Este virus se relaciona con los miembros del género *Potyvirus*; infecta *M. textilis* (Musaceae), *C. indica* (Cannaceae) y *Maranta arundinacea* (Marantaceae), en su rango de hospedantes incluye especies de Poáceas y plátano. Los síntomas característicos en plátano, son llamativas rayas verdes y amarillas en las hojas y moteado en peciolo. Es transmitido por áfidos como *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum nymphaeae* and *Rhopalosiphum (Aphis) maidis*, pero no es transmitido por *Pentalonia nigronervosa*. El AbaMV no se transmite a través de la semilla de abacá, sin embargo, se transmite mecánicamente y a través de propágulos vegetativos como secciones del cormo y cultivo de tejidos.

Inicialmente el AbaMV era considerado como una cepa de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), debido a la similitud morfológica de las partículas virales y a la estrecha relación serológica que presentan. Estudios recientes indican que AbaMV debe considerarse una cepa distinta de SCMV, de acuerdo a datos de la secuencia, reacción del hospedante y relaciones serológicas (Carlier *et al.*, 2000; Bajet y Magnaye, 2002; Gambley *et al.*, 2004).

2.12. Virus de la raya necrótica del plátano escarlata (Scarlet banana necrotic streak virus, SBanNSV)

Se identificó por primera vez en *Musa coccínea* (banano escarlata) en Colombia, por Reichel *et al.* (2008) quienes propusieron el nombre del virus. Pertenece al género *Potexvirus*, el síntoma característico es un rayado necrótico en las hojas. Es un virus aparentemente nuevo, consecuentemente se desconoce su modo de transmisión, rango de hospedantes, distribución geográfica y caracterización biológica. Hasta el momento solo se ha encontrado infectando plantas de *Musa coccínea*, por lo tanto el impacto económico de este virus en especies de *Musa* cultivadas se desconoce.

2.13. Virus muerte regresiva del plátano (*Banana die-back virus*, BDBV)

El BDBV tiene partículas isométricas de 28 a 30nm. Los síntomas inducidos por este virus son: necrosis, arrosetamiento foliar y muerte regresiva de la hoja cigarro, los hijuelos que se desarrollan posterior a la infección son cada vez más atrofiados hasta la muerte de toda la mata. El mecanismo de transmisión se desconoce, sin embargo, se han hecho estudios en donde demuestran la transmisión mecánica a plantas de *Nicotiana occidentalis* y *Vigna unguiculata* en la cual se manifestó retraso en el crecimiento y desarrollo de lesiones cloróticas en forma de puntos. La infección en *Nicotiana occidentalis* es asintomática y no se transmite mecánicamente a plátano.

Existe una relación serológica entre el BDBV y el virus de la mancha anular del tabaco (*Tobacco ringspot nepovirus*, TRSV), el virus de la mancha anular del tomate (*Tomato ringspot nepovirus*, ToRSV), y el virus de la necrosis del cacao (Cocoa necrosis nepovirus, CNV) (Hughes *et al.*, 1998; Frison *et al.*, 1998).

2.14. Virus del rayado del banano (*Banana streak badnavirus*, BSV)

Fue reportado por primera vez en 1974 en Costa de Marfil, África, donde ocasionó pérdidas hasta de 90% en banano Cavendish, cultivar Poyo (AAA). Posteriormente se observó en el sur de Marruecos, en plantas de la variedad Cavendish Enano (Lockhart y Olszewski, 1993). Esta enfermedad ha sido reportada en casi todas las regiones en donde se cultiva

plátano, incluyendo Australia, Asia, África y varios países de Centro y Sur América, como Honduras, Ecuador, Venezuela, Colombia y Brasil (Jones, 1994).

El BSV pertenece al género Badnavirus, familia *Caulimoviridae*, presenta partículas baciliformes de aproximadamente 30 x 130-150 nm, las cuales contienen un genoma circular de ADN de doble cadena de 7.4 kb, que se replica a partir de un ARN intermediario, mediante la enzima transcriptasa inversa, codificada por el genoma viral. Una característica importante del BSV es que secuencias de DNA se integran en el genoma de *Musa*, que pueden activarse bajo condiciones de estrés para producir la infección episomal (Harper *et al.*, 1999; Gayral *et al.*, 2008).

Las plantas afectadas por BSV presentan inicialmente un rayado clorótico continuo o interrumpido en las hojas, perpendicular a la nervadura central, que posteriormente se torna necrótico. Otros síntomas incluyen la atrofia de la planta, rajaduras en el pseudotallo, alteración de la filotaxis, es decir, las hojas pierden el patrón en espiral y se ordenan en un solo plano y en casos severos necrosis de la hoja cigarro, necrosis interna y colapso del pseudotallo (Lockhart, 1995). La infección puede causar reducción en el peso y calidad de los frutos, presentándose necrosis interna y externa, cambio en su sabor, y las cascarras son más delgadas y propensas a rajaduras. Las variaciones de temperatura afectan la expresión de los síntomas, los cuales pueden presentarse de manera intermitente y permanecen ausentes por largos periodos de tiempo (Reichel *et al.*, 1996; Javer, 2007).

Se transmite por propagación vegetativa y de manera semipersistente por pseudocóccidos o escamas; hasta donde se conoce no ha sido transmitido a través de inoculación mecánica (Garrido *et al.*, 2005).

2.15. Transmisión de virus

Los virus son entes infecciosos que no tienen la capacidad de diseminarse por factores como el viento o agua, además, no pueden penetrar a la planta por sus propios medios y para inducir enfermedad requieren ser depositados directamente dentro de una célula.

Las formas en que los virus son transmitidos de plantas enfermas a sanas son: propagación vegetativa, por semilla, por polen infectado, mecánicamente y por vectores.

La transmisión mecánica es el proceso por el cual las partículas virales son introducidas a la célula de la planta, a través de heridas provocadas por las condiciones ambientales, labores culturales, insectos y animales. Sin embargo, el establecimiento de un proceso infeccioso dependerá del grado de susceptibilidad de la planta, funcionamiento del genoma viral dentro de la célula, condiciones ambientales, etc.

La transmisión a través de vectores, constituye la forma más importante de diseminación de los virus en campo. Los insectos son el grupo más importante, las especies reportadas se encuentran principalmente en los órdenes Homóptera (áfidos, moscas blancas, chicharritas, escamas, psílidos), Thysanóptera (trips), Coleóptera (escarabajos), Orthóptera (chapulines), Dermáptera (tijeretas), Lepidóptera (palomillas y mariposas), Díptera (mosquitos) y Hemíptera (tingidos) (Hull, 2002).

De los homópteros, los pseudocócidos conocidos como cochinillas o piojo harinoso, juegan un papel importante en la transmisión del virus del rayado del plátano, se ha comprobado que diferentes especies tienen la capacidad de adquirirlo y transmitirlo (Reichel *et al.*, 1996; Javer, 2007; Natsuaki and Furuya, 2007; Muturi *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la parcela en estudio

El estudio se realizó en una parcela de plátano con presencia de síntomas virales en plantas, ubicada en Monte blanco perteneciente al municipio Fortín de las flores, Veracruz. Se localiza en la zona centro montañosa del Estado, en las coordenadas 18° 54' 08.41" latitud norte y -97° 01' 15.80" longitud oeste a una altitud de 1,080 metros sobre el nivel del mar; con clima semicálido húmedo, temperatura media anual de 19°C y una precipitación anual de 1,932 mm.

3.2. Colecta de muestras

Se colectaron plantas sintomáticas que se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 25 a 28°C para utilizarlas como fuente de inóculo para la transmisión mecánica y por vector. Además en campo se colectaron muestras de hojas con la sintomatología observada, para realizar los estudios moleculares y purificación de partículas virales.

3.3. Incidencia del virus en la parcela

Para determinar la intensidad de la enfermedad en la parcela en estudio, se hizo un análisis de incidencia en puntos cuadrantes de 10 x 10 m en base al diseño de muestreo en zig-zag en el 10% de la parcela. La distancia entre cada cuadrante fue de 14 m (Figura 1). Se trazaron siete cuadrantes cada uno con 43 plantas en promedio, en total se evaluaron 303 plantas.

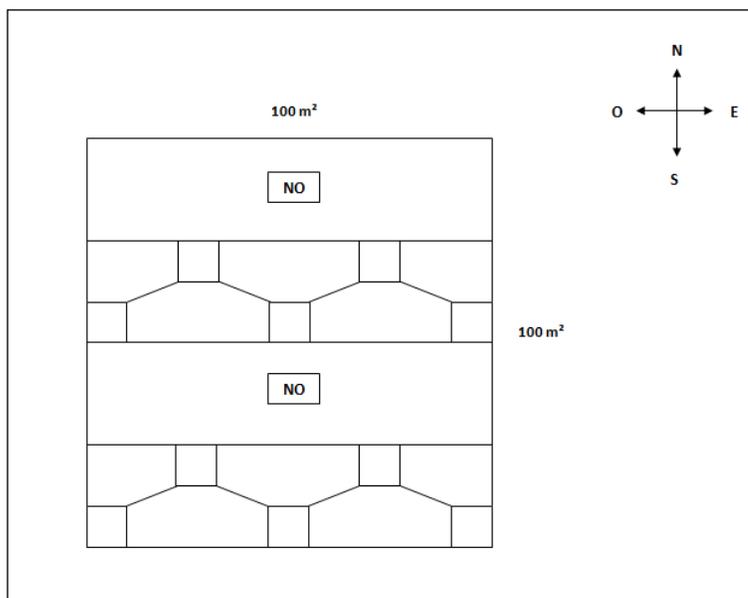


Figura 1. Diseño de muestreo en zig-zag con puntos cuadrantes de 10 x 10m.

Para determinar el porcentaje de incidencia se utilizó la siguiente fórmula, utilizada en el trabajo de Hernández *et al.* (2004).

$$I(\%) = \left(\frac{n_i}{N_j} \right) * 100$$

Donde: **I (%)** = Incidencia de la enfermedad en porcentaje

n_i = Número de plantas enfermas por parcela experimental en el momento *i*

N_j = Número total de plantas evaluadas por parcela experimental

3.4. Transmisión mecánica

Se realizó la transmisión mecánica en plantas de: *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium álbum*, *Nicotiana tabacum var. Xanthi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana virginia* y *Nicandra physalodes*. Se inocularon cinco plantas de cada especie y se utilizaron dos buffers diferentes, el ensayo se repitió 3 veces. Las plantas inoculadas presentaban al menos tres hojas verdaderas.

La transmisión mecánica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lockhart y Autrey (1988) y Garrido *et al.* (2005). Se utilizaron extractos crudos, obtenidos de la molienda de tejido foliar joven que exhibía síntomas virales, se cortó y maceró en un mortero frío con 50 ml de buffer A (1% K₂HPO₄, Fosfato de potasio dibásico + 0.1% Na₂S₂O₃, sulfito de sodio anhidro pH 7.0), en la proporción 1:5 (p/v) y buffer B (fosfato + DIECA 0.01M) en la misma proporción. Enseguida se esparció carborundum 600 mallas, sobre el haz de 2 a 3 hojas jóvenes de la planta indicadora. Con un hisopo estéril, previamente humedecido con el extracto, se frotó suavemente sobre el haz de la hoja, se enjuagó con agua estéril para eliminar el exceso del abrasivo. Las plantas testigo se trataron únicamente con buffer. Para evitar contaminaciones por otros patógenos, las plantas se colocaron en un cubículo aislado dentro del invernadero, a una temperatura de 25 a 28°C. Se mantuvieron bajo observación durante 35 días.

3.5. Transmisión por pseudocóccidos

En observaciones realizadas a las plantas de Monte blanco se notó la presencia de cochinillas harinosas, por lo tanto para determinar si el insecto transmite el virus se hizo un ensayo de transmisión. Se colectaron ninfas y hembras adultas de la zona de estudio y de plantas de plátano de Xochimilco, DF; se establecieron sobre papas germinadas, mantenidas dentro de recipientes de plástico en un cuarto de crecimiento a 27°C.

Para las pruebas de transmisión se utilizaron plantas de plátano obtenidas por cultivo de tejidos, tanto éstas como los insectos fueron analizados previamente por PCR para corroborar que estuvieran libres de virus. Ninfas de primer y segundo instar y adultas se colocaron durante 24 h en plantas infectadas que presentaban síntomas virales con la finalidad de que adquirieran al virus. Enseguida se transfirieron a plantas sanas confinadas en jaulas. Los testigos consistieron en plantas sanas infestadas con ninfas de primer y segundo instar y adultas tomadas de la colonia desarrollada en papas germinadas. A los insectos se les dejó alimentar sobre las plantas de plátano durante 48 h (González *et al.*, 2002), transcurrido este tiempo se retiraron los insectos y las plantas se mantuvieron en invernadero para observar el desarrollo de síntomas.

3.6. Extracción de DNA de plantas e insectos

Se extrajo el DNA total de tejido obtenido de plantas libres de virus, infectadas naturalmente y de aquellas expuestas al insecto, a partir de 250 mg de tejido fresco usando la técnica descrita por Doyle y Doyle (1990). El tejido se pulverizo en nitrógeno líquido y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 750µl de buffer de extracción (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 20mM EDTA, pH 8.0, 1.4 M NaCl). El extracto se incubó durante 40 min a 65°C, mezclando cada 15 min durante la incubación. Posteriormente se adicionaron 500µl de cloroformo-alcohol isoamilico 24:1, se mezclo y centrifugo a 14,000 rpm durante 10 min, se tomó el sobrenadante colocándolo en un tubo eppendorf nuevo y se adicionaron 400µl de isopropanol frio, se incubó a -20°C por 20 min para centrifugarse nuevamente a 14,000 rpm por 5 min. Inmediatamente se descarto el sobrenadante y se agregaron 400µl de agua libre de DNAsas, la pastilla se disolvió para después agregar 800µl de etanol absoluto frio y 50µl de NH₄OAc 5M, se incubó por 10 min a -20°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% a través de una centrifugación por 1 minuto, la pastilla se dejo secar por 15 min, finalmente se agregaron 40µl de agua libre de DNAsas.

Para la extracción de DNA de insectos se utilizó el método de proteinasa K partiendo de 40 insectos. La cantidad y calidad del DNA extraído de planta e insecto, se determinaron mediante espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 a una absorbancia de 260 - 280 nm y electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

3.7. Detección del virus por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras de plantas con síntoma foliar de rayado, plantas libres de virus e insectos transmisores, fueron analizadas para *Badnavirus* y BSV. Para la detección del virus se utilizaron los iniciadores degenerados Badna 1A (5'-CTNTAYGARTGGYTN-GTNATGCCNTTYGG-3') y Badna 4 (5'-TCCAYTTRCANAYNSCNCCCCANCC-3') diseñados de la región de la transcriptasa inversa / RNasa H del ORF III de los *Badnavirus* (Geering *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 25 μ l, conteniendo agua libre de DNAsas, buffer de reacción 1X, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 1U de Taq DNA polimerasa, 1 μ M de cada iniciador y 100 ng de DNA. La mezcla de reacción fue amplificada usando un termociclador Techne® modelo TC-512, con 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20s para la desnaturalización, 45°C por 45s para el alineamiento, 72°C por 1 min para la extensión y un ciclo a 72°C por 10 min de extensión final.

Se usaron además los iniciadores específicos BSV5466 (5'-AGAGTGGGTTTC-ATCAAGTAGC-3') y BSV6196 (5'-GAATTTCCCGCTCGCATAAG-3') diseñados a partir del dominio conservado de la transcriptasa inversa y la RNasa H, los cuales amplifican un fragmento de 700 bp (Cherian *et al.*, 2004). La mezcla para PCR con un volumen final de 25 μ l, consistió en agua libre de DNAsas, buffer de reacción 1X, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 0.05U/ μ l de Taq DNA polimerasa, 1 μ M de cada iniciador y 100 ng de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en 1 ciclo de 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30s, 52°C por 30s y 72°C por 30s, y un ciclo de 72°C por 10 min de extensión final.

Los productos de planta e insecto se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% + BrEt, y finalmente se analizaron en un fotodocumentador Gel-Doc 2000 (BIO-RAD®). Los productos de PCR se purificaron con el kit ZymocleanTM gel DNA recovery y se enviaron a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología - UNAM., en un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl). Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la herramienta Blast del NCBI.

3.8. Purificación y observación de las partículas virales

La purificación de partículas virales se realizó a partir de 200g de tejido foliar infectado siguiendo el método descrito por Lockhart (1986) con algunas modificaciones. El tejido se fraccionó y se sumergió en 400ml de buffer (0.05 M tris – citrato, pH 7.4, 0.5 % (p/v) de Na_2SO_3 , 1% (p/v) polyvinylpyrrolidona (PVP, mol wt 40,000), y 1% (v/v) de Triton X-100) durante 24 h a 4°C. El extracto se filtró y clarificó mezclando durante 20 s con cloroformo al 25% (v/v) y se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante de la fase acuosa fue colectado y el virus fue concentrado por ultracentrifugación a 45,000 rpm durante 1 h. Posteriormente, la pastilla obtenida se resuspendió en 400 μl de buffer fosfato 0.01 M, pH 7.2, seguido de una centrifugación a 41,000 rpm durante 4 h 30 min, en un gradiente preformado de 0-30% de CsCl en 10% (p/v) de sacarosa. La banda de dispersión de luz que contenía el virus, fue removida con una jeringa y se dializó en buffer fosfato 0.01 M, pH 7.2 para eliminar la sal de cesio. Finalmente el precipitado obtenido se mezcló con ácido fosfotúngstico al 2% y se colocó en rejillas de cobre cubiertas de formvar carbón. Simultáneamente se hicieron cortes de la ultraestructura celular de tejido vegetal con síntomas de rayado; los cortes se montaron en rejillas cubiertas de colodión al 0.5% y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II, de la unidad de imagenología del Instituto de Fisiología Celular – UNAM.

IV. RESULTADOS

4.1. Descripción de síntomas en plantas infectadas en campo

En las plantas infectadas en campo los síntomas se manifiestan en el haz de las hojas tanto en plantas jóvenes como en adultas, y se caracterizan por un rayado clorótico y necrótico (Figura 2A) que se presenta asimétricamente en la planta, es decir, no todas las hojas presentan síntomas. La distribución de plantas enfermas en la parcela es de manera irregular, esta característica se observó al determinar la incidencia que fue del 13%.

Las plantas que se mantuvieron en invernadero, al principio expresaron pequeñas líneas cloróticas continuas o interrumpidas orientadas en la misma dirección que las venas secundarias, fueron ligeramente visibles en el haz y en ocasiones fueron más evidentes en el envés cuando se observaban a contra luz. Al cabo de 2 y 3 meses, las líneas cloróticas coalescen formando un rayado clorótico que progresivamente se torna necrótico (Figura 2B). Los síntomas que se desarrollaron corresponden a aquellos reportados para *Banana streak badnavirus* (BSV).

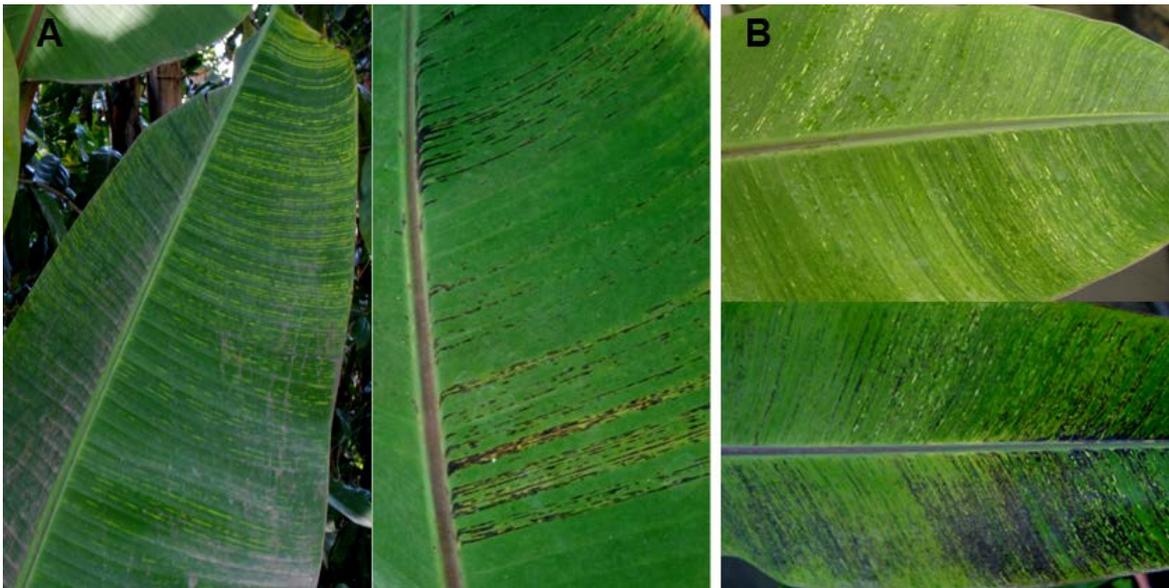


Figura 2. Sintomatología viral en plantas de plátano de Monte blanco en campo e invernadero. A) Rayado clorótico y necrótico en plantas en campo; B) Rayado clorótico y necrótico en plantas en invernadero.

4.2. Transmisión mecánica y por pseudocóccidos

En ninguna de las plantas indicadoras se observó el desarrollo de síntomas relacionados a virus, lo que indicó que el virus en estudio no se transmite mecánicamente y dado que el CMV se transmite mecánicamente queda descartado que este virus sea el que está involucrado. En cuanto a la transmisión por pseudocóccidos, el Dr. Héctor González Hernández del programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, realizó la identificación de los piojos harinosos de Monte blanco como *Planococcus citri* (Risso) (Figura 3D) y los de Xochimilco como *Pseudococcus longispinus* (Targioni) (Figura 3A). Los *Planococcus citri* no se adaptaron a las condiciones y no se estableció la colonia, por tal motivo la transmisión se llevó a cabo con *Pseudococcus longispinus*.

En las plantas de plátano expuestas a *P. longispinus* previamente alimentados en plantas enfermas, se observó el desarrollo de síntomas a las 10 semanas. Inicialmente se manifestaron ligeras líneas cloróticas en el haz de las hojas (Figura 3B), posteriormente se observó desorden de vainas foliares al formarse dos hojas en un solo plano perdiendo el patrón en espiral (Figura 3C). En las plantas testigo no se observaron síntomas relacionados a virosis (Figura 3E).

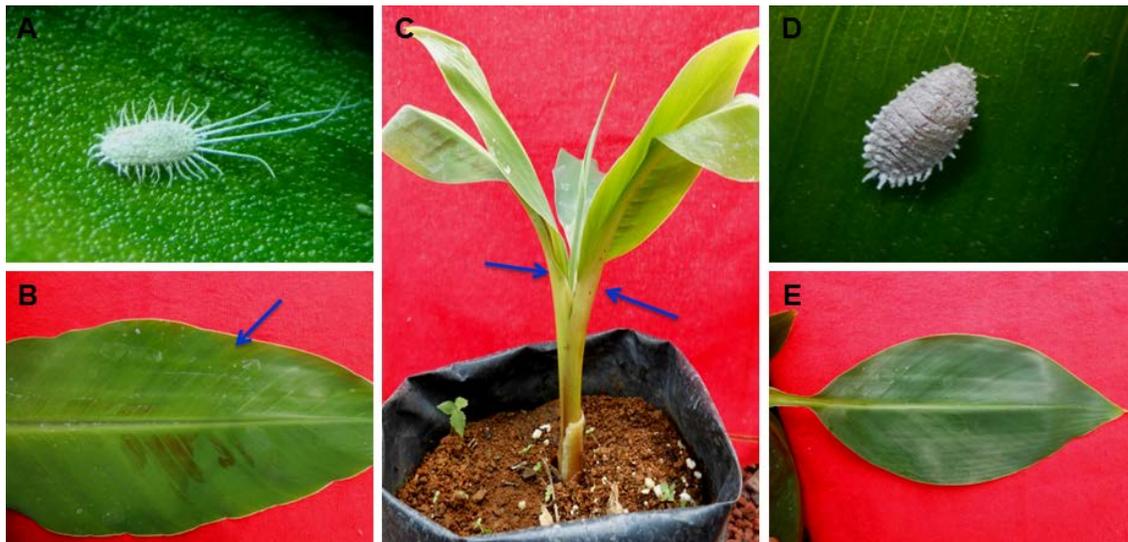


Figura 3. Síntomas observados en plantas inoculadas a través de *Pseudococcus longispinus*. A) *Pseudococcus longispinus* (Targioni); B) líneas cloróticas en el haz de la hoja, señaladas con flecha; C) desorden de vainas foliares, señaladas con flechas; D) *Planococcus citri* (Risso); E) hoja de planta testigo.

4.3. Purificación y observación de las partículas virales

En las rejillas observadas en microscopio electrónico de transmisión no se lograron ver partículas virales, a pesar de que en el gradiente se obtuvo una ligera banda de dispersión de luz localizada al nivel de 10% de concentración de CsCl, indicativo de la presencia de virus (Figura 4A).

En cuanto al análisis de los cortes ultrafinos solo se evidenció una desorganización de tilacoides en los cloroplastos (Figura 4B) y muerte celular (Figura 4C) que posiblemente estén relacionados a la alteración por el rayado clorótico y necrótico que induce la infección viral.

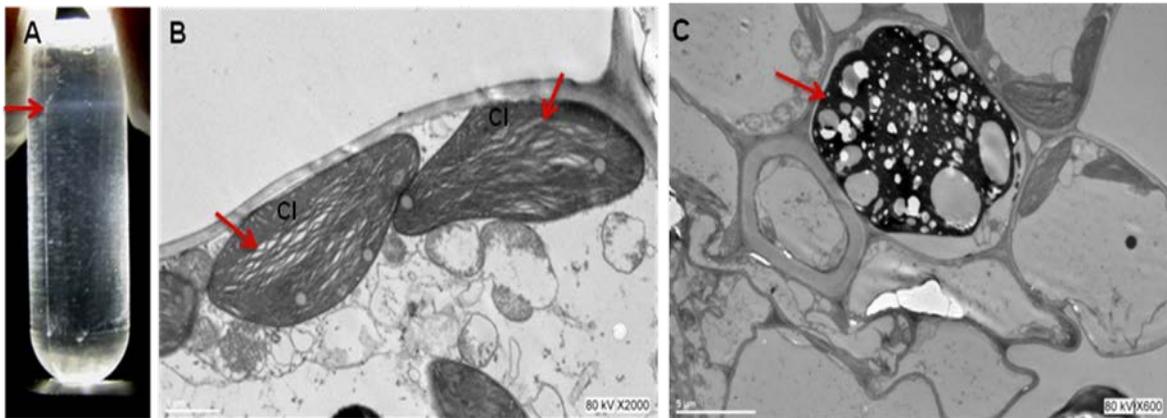


Figura 4. Purificación de partículas virales y microscopía electrónica de transmisión de cortes ultrafinos de tejido infectado. A) línea de dispersión de luz (flecha) en gradiente de 0-30% de CsCl en 10% de sacarosa; B) Cloroplastos (Cl) con desorganización de tilacoides (flechas); C) muerte celular (flecha).

4.4. Extracción de DNA

El DNA obtenido de hojas de plátano y del insecto fue de buena calidad, con una concentración entre 200 y 700 ng/ μ l y 50 y 400 ng/ μ l, respectivamente (Figura 5 y 6). Lo que indica que los protocolos utilizados para la extracción fueron eficientes.

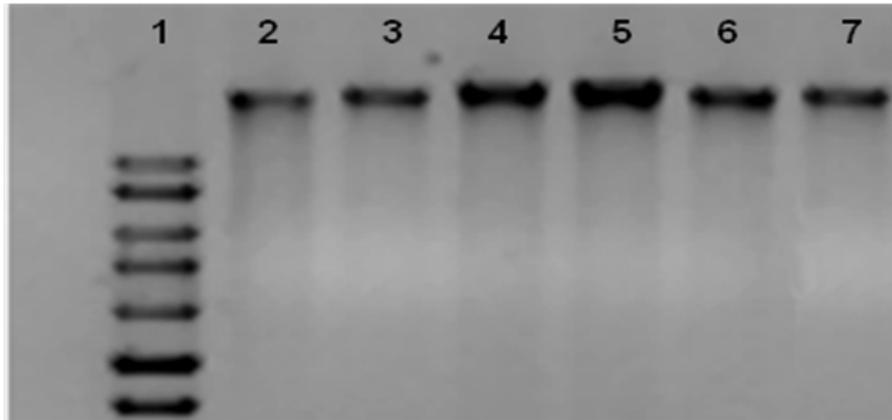


Figura 5. Gel de agarosa al 0.8% con DNA obtenido de muestras de plantas de plátano. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb axygen ®; 2) Planta libre de virus; 3) Planta de plátano colectada en Xochimilco; 4) Planta colectada en Monte blanco con síntoma foliar de rayado clorótico y necrótico; 5) Planta colectada en campo utilizada para inocular; 6) Planta inoculada; 7) Planta testigo.

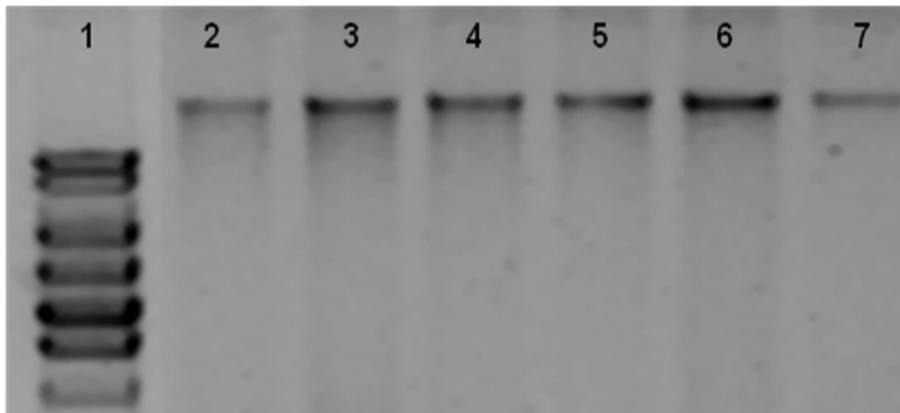


Figura 6. Gel de agarosa al 0.8% con DNA obtenido de pseudocóccidos. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb axygen ®; 2) pseudocóccidos colectados en plantas de plátano de Xochimilco, DF; 3) pseudocóccidos colectado en planta con síntomas de rayado clorótico y necrótico en Monte blanco; 4) pseudocóccidos en planta con síntomas utilizada para inocular; 5) pseudocóccidos en plantas inoculadas; 6) pseudocóccidos en plantas testigo; 7) pseudocóccidos en papas germinadas.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las muestras de plantas que mostraron síntomas foliares de rayado clorótico, necrótico y desorden de vainas foliares, amplificaron un fragmento de 600 bp correspondiente a *Badnavirus*; en contraste, en las plantas testigo no hubo amplificación. Una vez que con los iniciadores degenerados se detectó la presencia de *Badnavirus*, se procedió a utilizar los iniciadores específicos para BSV, confirmándose la presencia del virus al amplificar un fragmento de 700 bp (Figura 7).

Antes de realizar la transmisión del virus, las cochinillas propagadas en papas germinadas y las plantas libres de virus fueron analizadas, resultando negativas para *Badnavirus* y BSV. Después de hacer la transmisión y de observar síntomas se comprobó la transmisión con la detección del virus en las plantas inoculadas.

Los *Planococcus citri* colectados en plantas con síntomas de la parcela de Monte blanco resultaron negativos, a diferencia de *Pseudococcus longispinus* establecidos en la planta utilizada para la transmisión que resultaron positivos para *Badnavirus* amplificando un fragmento de 490 bp (Figura 8). Sin embargo, la secuencia obtenida del producto amplificado manifestó errores y no mostró ningún resultado; en contraste, al analizar las secuencias de nucleótidos forward y reverse de las muestras de plantas, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, se observó un 95% de similitud con diferentes secuencias que codifican para el gen RT-RNAsa H de la poliproteína del ORF III del virus del rayado del plátano (BSV). Los componentes de la poliproteína de 208 kDa son la proteína de movimiento célula-célula, la proteína de la cápside, la aspartil proteinasa y la replicasa con los dominios transcriptasa inversa y RNAsa H.

Se eligieron las secuencias similares y se realizó un alineamiento de ellas con la obtenida, la secuencia de nucleótidos fue traducida a secuencia de aminoácidos la cual fue analizada con la herramienta protein BLAST, el análisis indicó la presencia de un dominio conservado que pertenece a la superfamilia RT-LTR. Un gen RT es indicativo de un elemento móvil, retrovirus y caulimovirus.

La secuencia se depositó en el GenBank con el número de acceso KM259633, y el árbol filogenético elaborado con *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV) especie tipo de los *Badnavirus*, *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) y con diferentes variantes de BSV: *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV), *Banana streak Goldfinger virus* (BSGfV), *Banana streak Cavendish virus* (BSCavV) y *Banana streak virus* (BSV) indicó que la secuencia obtenida guarda una estrecha relación con BSV. Una relación menos similar se observó entre SCBV y ComYMV con todas las especies de BSV; CMV no presenta ninguna relación con los virus analizados. (Figura 9).

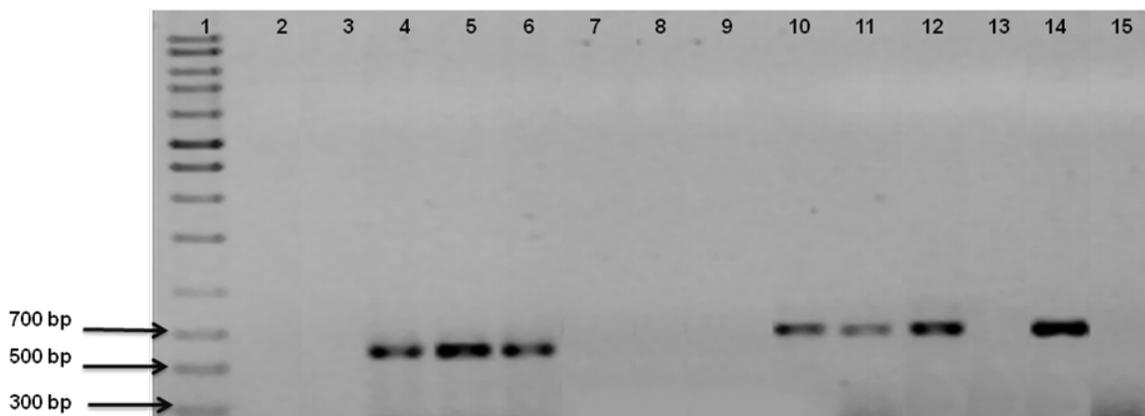


Figura 7. Productos de PCR obtenidos de plantas de plátano analizadas para la detección de virus con los iniciadores degenerados para Badnavirus y específicos para BSV. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb axygen ®; 2-7) PCR con iniciadores degenerados; 2) Planta libre de virus; 3) Planta colectada en Xochimilco; 4) Planta con síntoma foliar de rayado clorótico y necrótico colectada en Monte blanco; 5) Planta colectada en campo utilizada para inocular; 6) Planta inoculada; 7) Planta testigo; 8-15) PCR con iniciadores específicos; 8) Planta libre de virus; 9) Planta colectada en Xochimilco; 10) Planta con síntoma foliar de rayado clorótico y necrótico colectada en Monte blanco; 11) Planta colectada en campo utilizada para inocular; 12) Planta inoculada; 13) Planta testigo; 14) Control positivo para Banana streak virus; 15) Control negativo.

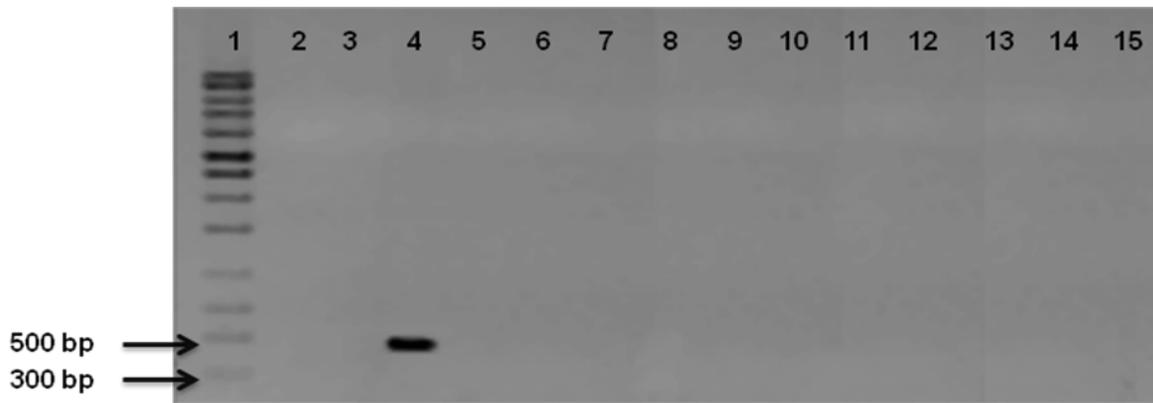


Figura 8. Productos de PCR obtenidos de pseudocóccidos analizados para la detección de virus con los iniciadores degenerados para *Badnavirus* y específicos para BSV. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb axygen; 2-8) PCR con iniciadores degenerados; 2) Pseudocóccido colectado en plantas de plátano de Xochimilco; 3) Pseudocóccido en papas germinadas; 4) Pseudocóccido en planta con síntomas utilizada para inocular; 5) Pseudocóccido en plantas inoculadas; 6) Pseudocóccido en plantas testigo; 7) Pseudocóccido colectado en planta con síntomas de rayado clorótico y necrótico en Monte blanco; 8) Control negativo; 9-15) PCR con iniciadores específicos; 9) Pseudocóccido colectado en plantas de plátano de Xochimilco; 10) Pseudocóccido en papas germinadas; 11) Pseudocóccido en planta con síntomas utilizada para inocular; 12) Pseudocóccido en plantas inoculadas; 13) Pseudocóccido en plantas testigo; 14) Pseudocóccido colectado en planta con síntomas de rayado clorótico y necrótico en Monte blanco; 15) Control negativo.

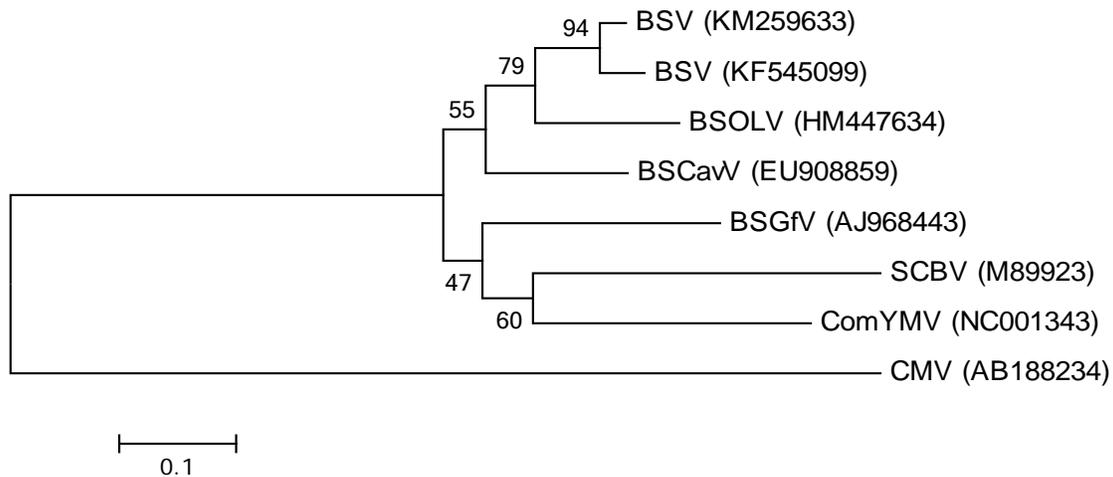


Figura 9. Árbol filogenético que representa la relación entre *Banana streak badnavirus* (KM259633) identificado en la parcela de Monte Blanco, con diferentes variantes de BSV, *Sugarcane bacilliform virus*, *Commelina yellow mottle virus* y *Cucumber mosaic virus* utilizada como raíz.

V. DISCUSIÓN

Los síntomas de rayado en plantas de plátano de Monte blanco, que inician con la unión de líneas cloróticas perpendiculares a la nervadura central de las hojas formando un rayado clorótico que progresivamente se torna necrótico, coinciden con los descritos por Lockhart, (1986); Geering *et al.* (2000) y Garrido *et al.* (2005) para *Banana streak badnavirus*.

Las plantas expuestas a *P. longispinus* expresaron síntomas foliares semejantes a los de las plantas infectadas, esto se corroboró con la presencia del BSV mediante PCR; así como en las plantas infectadas naturalmente utilizadas como fuente de inóculo. Aunque *P. longispinus* no se colectó en la zona de estudio fue capaz de transmitir al virus; sin embargo, no se logró detectar al virus en él, esto se atribuye a la forma de transmisión tipo semipersistente en donde difícilmente se puede coleccionar al insecto en el momento de adquisición o retención del virus. Al respecto, Muturi *et al.* (2013), mencionan que diferentes especies de piojos harinosos actúan como vectores por la capacidad de transmitir al BSV, y que el porcentaje de eficiencia cambia de acuerdo a las condiciones ambientales y especie de piojo harinoso, también demostraron la transmisión del virus con pruebas moleculares pero solo en plantas inoculadas y no en el insecto; similarmente González *et al.* (2002) corroboraron la transmisión únicamente con la expresión de síntomas en las plantas. Con base en estos antecedentes y los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que *P. longispinus* actúa como transmisor; hasta donde se conoce no se ha consignado la presencia del virus en el insecto durante el proceso de transmisión, por lo tanto, para corroborar su papel como vector tendrá que demostrarse la presencia del virus en el insecto.

Al analizar con la herramienta Blast la secuencia de nucleótidos obtenida de planta, se observó un 95% de similitud con una secuencia que contiene la región de RT-RNAsa H de la poliproteína del ORF III de *Banana streak badnavirus* de una muestra de *Musa sp.* cv Uganda green en Kenia (número de accesoión KF545099). El análisis filogenético elaborado con las secuencias reportadas, indicó diferencias con la obtenida; no obstante guarda estrecha relación con la secuencia anteriormente mencionada y una similitud menor

con HM447634 reportada por Ramesh y Sreenivasulu (2010, datos publicados en NCBI) para un gen que codifica la región de la transcriptasa inversa y RNAsa H.

Aunque se detectó al virus por PCR en plantas infectadas y se obtuvo una ligera banda de dispersión de luz localizada al nivel de 10% de concentración de CsCl (indicativo de la presencia de partículas virales), no se observaron por microscopía electrónica de transmisión partículas virales en las rejillas conteniendo al purificado; probablemente la concentración viral en tejido infectado fue baja (Lockhart, 1986). La observación de los cortes ultrafinos evidenció la desorganización de tilacoides en los cloroplastos y muerte celular, que posiblemente estén relacionados con el rayado clorótico y necrótico inducidos por la infección viral.

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación, se confirma que el virus presente en plantas de plátano en Monte blanco es el *Banana streak badnavirus*; siendo este el primer reporte del virus en México. Por este hecho, se requiere continuar con los estudios que permitan determinar la morfología de las partículas virales, la distribución de BSV, el rango de especies hospedantes y las variantes que pudieran estar presentes en el estado de Veracruz.

VI. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó que el síntoma de rayado presente en plantas de plátano en Monte blanco, Fortín de las flores, Veracruz, es inducido por *Banana streak badnavirus*; siendo este el primer reporte del virus en México.

VII. LITERATURA CITADA

- Araya A J M (2008)** Agrocadena de plátano caracterización de la agrocadena. Ministerio de agricultura y ganadería dirección regional huetar norte. 82p
- Bajet N B, L V Magnaye (2002)** Enfermedades virales de plátano y abacá en Filipinas. Los Baños, Laguna: PARRFI. 82p.
- Carlier J, E Foyré, F Gauhl, F Jones, P Gauhl, R A Romero (2000)** Fungal diseases of the foliage:
In: Disease of Banana, Abacá and Enset. D R Jones (ed). CABI publishing. Wallingford, Oxon, UK. pp: 37-39.
- Cherian A K, V K Baranwal, V G Malathi, R P Pant, Y S Ahlawat (2004)** *Banana streak virus* from India and its detection by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Biotechnology* 3:409-413.
- Dahal G, J d'A Hughes, G Thottappilly, B E L Lockhart (1998)** Effect of temperature on symptom expression and reliability of Banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp.). *Plant Disease* 82:16-21.
- Daniells J, C Jenny, D Karamura, K Tomekpe (2001)** Musalogue: a catalogue of *Musa* germplasm.
In: Diversity in the genus Musa. E Arnaud, S Sharrock (eds). International Network for the Improvement of Banana and Plantain INIBAP, Montpellier, France.
- Dheepa R, S Paranjothi (2010)** Transmission of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 22(2):117-129.
- Doyle J J, J L Doyle (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (2004)** La economía mundial del banano 1985-2002. P Arias, C Dankers, P Lui, P Pilkauskas (eds). 104 p.
- Frison E A, C S Gold, E B Karamura, R A Sikora (1998)** Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. INIBAP. 351p.
- Gambley C F, J E Thomas, L V Magnaye, L Herradura (2004)** *Abacá mosaic virus*: a distinct strain of *Sugarcane mosaic virus*. Plant Pathology 33:475-484.
- Garrido M J, A Ordosgoitti, B E L Lockhart (2005)** Identificación del virus del rayado del banano en Venezuela. Interciencia 30:97-101.
- Gayral P, J C Noa-Carrazana, M Lescot, F Lheureux, B E L Lockhart, T Matsumoto, P Piffanelli, M L Iskra-Caruana. (2008)** A Single Banana Streak Virus Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. J. Virol. 82:6697-6710
- Geering a D W, L a McMichael, R G Dietzgen, J E Thomas (2000)** Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia. Phytopathology 90:921-927.
- Geering A D W, N E Olszewski, G Harper, B E L Lockhart, R Hull, J E Thomas (2005)** Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. Journal of general virology 86:511-520.
- González A G, C Font, E Miranda (2002)** *Pseudocócido minor* (Markell), vector del virus estriado del plátano (BSV). Fitosanidad 6:47-48.
- Harper G, J O Osuji, J S Heslop-Harrison, R Hull (1999)** Integration of *Banana Streak Badnavirus* into the Musa Genome: Molecular and Cytogenetic Evidence. Virology 255:207-213.

- Hernández-Castro E, J A Villanueva-Jiménez, R Mosqueda-Vázquez, J A Mora-Aguilera (2004)** Efecto de la erradicación de plantas enfermas por el PRSV-P en un sistema de manejo integrado del papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:382-388.
- Hughes J d A, P R Speijer, O Olatunde (1998)** *Banana die-back virus* a new virus infecting banana in Nigeria. Plant disease 82:129.
- Hull R (2002)** Matthews' Plant Virology. Academic press 4th edition.
- Jason G R (2003)** Characterisation of an Australian Isolate of *Sugarcane bacilliform virus*. Science Research Centre, faculty of science. Thesis for the degree of Doctor of philosophy. Queensland University of Technology.
- Javer H E (2007)** Reseña de Banana streak virus (BSV): características biológicas, epidemiología e importancia económica. Fitosanidad 11:61-69.
- Jones D R (1994)** Risks involved in the transfer of banana and plantain germplasm. *In: The Improvement and Testing of Musa: a Global Partnership*. INIBAP, Montpellier, France 93p.
- Jones D R (2000)** Diseases of Banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, UK. 560p.
- Licon V A, S C Ortiz, M del C C Gutiérrez, R F Manzo (2005)** Clasificación local de tierras y tecnología del policultivo café-plátano para velillo-sombra en comunidades cafetaleras. Terra latinoamericana 24:1-7
- Lockhart B E L (1986)** Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. Phytopathology 76:995-999.

- Lockhart B E L, L J C Autrey (1988)** Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to *Banana streak virus*. *Plant Disease* 72:230-233.
- Lockhart B E L, L J C Autrey (1991)** Mealy bug transmission of sugarcane bacilliform and sugarcane clostero-like viruses. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists Pathology Workshop* 3:17.
- Lockhart B E L, N E Olszewski (1993)** Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: Implications for virus detection in *Musa* germplasm. *In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests*. Montpellier, France, pp 105-113.
- Lockhart B E L (1995)** Banana streak badnavirus infection in *Musa*: epidemiology, diagnosis and control. *Food and Fertilizer Technologies Centre, Technical Bulletin* 143. Ed: Food and Fertilizer Technologies Center, Taiwán. 11p.
- Marín D H, T B Sutton, K R Barker (2002)** Diseminación del banana en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*. Costa Rica 66:62-75.
- Martínez L G (2002)** Virus emergentes en plátano y banana: un Nuevo limitante para la producción en la zona cafetera colombiana. *Memorias XV reunión. Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA*. Cartagena de Indias, Colombia. pp 260-264.
- Muturi S M, F N Wachira, L S Karanja, M C Wambulwa, E Macharia (2013)** *Paracoccus burnerae* (Homoptera; *Planococcidae*) as a vector of Banana streak virus. *Journal of experimental biology and agricultural sciences* 1:406-414.
- Natsuaki K T, N Furuya (2007)** The genera *Babuvirus* and *Badnavirus* in Asia. *Plant pathology* 23(4):227-232.

Noa-Carrazana J C, N Flores-Estévez (2008) Los plátanos en el ecosistema de montaña y su relación con el virus del rayado del plátano (BSV): *In: Ecología, Manejo y Conservación de los Ecosistemas de Montaña en México*. L R Sánchez-Velásquez, J Galindo-González, F Díaz-Fleischer (eds). Mundi prensa México S. A de C. V. pp:380-393.

Orozco-Santos M, J Orozco-Romero, J Velásquez, J Monreal, G Manzo Sánchez, S Guzmán González (2004) Enfermedades de Bananos y Plátanos (*Musa spp*) en México. *In: Memoria, XVI Reunión Internacional ACORBAT*. Oaxaca, México. pp212.

Ramesh B, P Sreenivasulu (2010) Molecular cloning and sequencing of partial RT-RNaseH gene of BSV naturally infecting *Musa* species in Andhra Pradesh, India. Enviado a la base de datos de GenBank.[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/309753450?report=genbank&log\\$=nuclalig n&blast_rank=1&RID=310PZ2J401R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/309753450?report=genbank&log$=nuclalig n&blast_rank=1&RID=310PZ2J401R)

Reichel H, S Belalcázar, G Múnera, E Arévalo, J Narváez (1996) Primer reporte del virus del rayado del banano (BSV) afectando plantaciones de plátano (*Musa AAB Simmonds*), caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) y Achira (*Canna edulis*) en Colombia. Nota de investigación. Revista Corpoica 1:1.

Reichel H, H Cuervo, FJ Morales (2008) Caracterización parcial de un *Potexvirus* aislado de *Musa coccínea* afectada por rayado necrótico en Colombia. *Agronomía Colombiana* 26(2):285-291.

SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2013) Cogollo racimoso del banano (*Banana bunchy top virus*). Dirección General de Sanidad Vegetal – Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, DF. Ficha técnica No. 31. 15p.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2012) Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. México, D.F. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Mayo 2014).

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2013) Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA. México, D.F. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Junio 2014).

SIC-Agro, Sistema de Información Comercial del Sector Agroalimentario (2013) Comercio exterior agroalimentario. SAGARPA. México, D.F. Disponible en http://sicagro.sagarpa.gob.mx/SICAGRO_CONSULTA/filtros.aspx (Junio 2014).

Teycheney P Y, A Marais, L Svanella-Dumas, M J Dulucq, T Candresse (2005) Molecular characterization of banana virus X (BVX) a novel member of the *Flexiviridae* family. Archives of virology 150:1715-1727.

Thomas J E, B E L Lockhart, M L Iskra-Caruana (2000) *Banana mild mosaic virus*. In: Diseases of banana, Abaca and Ensete, D R Jones (ed). CAB International, Wallingford, UK. pp: 275–279.

Vázquez C R, C A Romero, J A Figueroa, O D Munro (2005) Paquete tecnológico para el cultivo del plátano. Gobierno del estado de Colima. 72p.

Viralzone (2012) *Potyvirus*. Swiss Institute of bioinformatics. Disponible en <http://viralzone.expasy.org/> (Agosto 2014).