



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

RELACIÓN DE FITOPLASMAS, BACTERICERA COCKERELLI Y GEMINIVIRUS CON EL SÍNDROME DEL DECLINAMIENTO DEL JITOMATE

FRANCISCO GARCIA TAPIA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis titulada **RELACIÓN DE FITOPLASMAS, BACTERICERA COCKERELLI Y GEMINIVIRUS CON EL SÍNDROME DEL DECLINAMIENTO DEL JITOMATE**, realizada por el alumno: **FRANCISCO GARCIA TAPIA** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



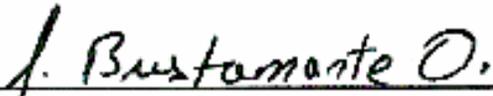
DRA. REGINA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR



DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESOR



DR. JUAN DE DIOS BUSTAMANTE ORANEGUI

Montecillo, Texcoco, México a 30 de agosto de 2007

RELACIÓN DE FITOPLASMAS, BACTERICERA COCKERELLI Y GEMINIVIRUS CON EL SÍNDROME DEL DECLINAMIENTO DEL JITOMATE

Francisco García Tapia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007.

En los últimos años en las zonas productoras de jitomate en el país, se ha observado un síndrome en el cultivo, relacionado con la presencia del insecto *Bactericera cockerelli* y fitoplasmas; pero además los geminivirus podrían estar también involucrados en el desarrollo de dicho síndrome. Las plantas de jitomate con síntomas fueron colectadas en Ixtlahuaca, Chapingo y Montecillo, Estado de México, Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, y Sayula, Jalisco; las muestras de tejido de plantas de jitomate de Ixtlahuaca y Sayula mostraron fluorescencia en tejido del floema al tñirlas con DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), lo que sugirió la presencia de fitoplasmas en plantas de jitomate con síntomas de amarillamiento de hojas y acortamiento de entrenudos. Por PCR, se detectó la presencia de fitoplasmas en muestras procedentes de Ixtlahuaca y Montecillo. La comparación de los patrones generados con enzimas de restricción, por los productos amplificados por PCR indicaron que el fitoplasma que se encontró asociado con las plantas enfermas corresponde al grupo aster yellows. Asimismo, la secuencia de los productos obtenidos y su comparación con las depositadas en el GeneBank presentaron similitud por arriba del 90% con el fitoplasma del amarillamiento del áster.

Las plantas de jitomate injertadas con tejido vegetal de jitomate colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Mor., y mantenidas en invernadero resultaron positivas para geminivirus mediante la técnica de la PCR. La comparación de las secuencias de los productos obtenidos con las secuencias depositadas en el GeneBank presentaron homología por arriba del 90% con los geminivirus Tomato chino La Paz virus y el Tomato severe leaf curl virus, los síntomas presentados por las plantas en las que se detectaron estos virus fueron mosaicos, amarillamiento y necrosis del follaje.

Palabras clave: Aster yellows, Tñición con DAPI, Reacción en cadena de la polimerasa, Tomato chino La Paz, Tomato severe leaf curl virus.

**PHYTOPLASMAS, BACTERICERA COCKERELLI AND GEMINIVIRUS RELATION
WITH TOMATO DECLINE SYNDROME**

Francisco Garcia Tapia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007.

In the last years in the tomato Mexican producing zones, it has presented the syndrome in the crop, this syndrome has been related whit the insect *Bactericera cockerelli* and Phytoplasmas, but in addition the geminivirus could be involved in these symptoms development too. In base of the previous thing, in this study phytoplasmas and geminiviruses detection was carried out in diseased tomato plants, as like phytoplasmas detection in *B. cockerelli*. The tomato plants with symptoms were collected in Ixtlahuaca, Chapingo and Montecillo, Estado de México, Tlayacapan and Zacatepec, Morelos, and Sayula, Jalisco; the tomato vegetal tissues proceeding of Ixtlahuaca and Sayula showed fluorecence in phloem tissue when was DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) died, it suggested that tomato plants were phytoplasmas infected, the symptoms consisted in yellow leaf and shorted internodes. By PCR, we detected the phytoplasmas presence in tomato samples collected in Ixtlahuaca and Montecillo. The founded restriction patterns from PCR amplificated products indicated that the phytoplasma associated whit diseased plants corresponds to aster yellows group. Likewise, the sequence from this PCR products and its comparison with the deposited in the GeneBank sequences, $\geq 90\%$ similarity with aster yellows phytoplasma was founded.

The tomato grafted plants with tomato vegetal tissue collected in Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, and developed in greenhouse were positive to geminiviruses with PCR technique. The sequence comparison from this products and its comparison in GeneBank sequences reveal the geminiviruses presence as Tomato chino La Paz virus and Tomato severe leaf curl virus; the symptoms displayed by the plants in which they detected these virus were mosaics, yellow and foliage necrosis.

Additional Keywords: Aster yellows, DAPI died, Polymerase Chain reaction, Tomato chino La Paz, Tomato severe leaf curl virus.

AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos que hacen posible la existencia de instituciones de apoyo al Postgrado, particularmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Al Colegio de Postgraduados que entre paredes y jardines me acogieron durante dos años de mi vida.

A los miembros del Consejo Particular, Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, Dra. Emma Zavaleta Mejía y Dr. Juan de Dios Bustamante Oranegüi, por la paciencia, comprensión y el apoyo brindado en los tiempos difíciles.

A todos los Maestros que participaron en tan loable labor, la formación de un mexicano más comprometido con los valores y principios éticos que deben de regir la vida de todo ser humano.

A la familia, que me apoyó en esta nueva faceta de mi vida.

A mis compañeros por su amistad, apoyo y sabios consejos.

A los colegas y amigos de la Subdirección de Evaluación y Registros de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria Acuícola y Pesquera.

¡Estrecho la mano de cada uno de ustedes y ofresco mi más sincero agradecimiento!

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. El jitomate.....	2
2.2. Fitoplasmas.....	6
2.2.1. Fitoplasmas: características e importancia.....	7
2.2.2. Formas de detección.....	13
2.2.3. Alteraciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en plantas infectadas.....	15
2.2.4. Avances en el conocimiento a nivel molecular del genoma de los fitoplasmas.....	20
2.3. Insectos vectores de fitoplasmas.....	23
2.3.1. Factores involucrados en la transmisión de fitoplasmas por el insecto vector.....	28
2.3.2. Adquisición y transmisión de fitoplasmas.....	29
2.3.3. Adquisición y transmisión de fitoplasmas.....	29
2.4. <i>Bactericera cockerelli</i>	35
2.5. Geminivirus.....	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. Detección de fitoplasmas mediante injetos, microscopia electrónica y de fluorescencia (DAPI), y PCR.....	40
3.2. Detección de en B, cockerelli.....	43
3.3. Detección y diagnóstico de virus fitopatógenos.....	43
IV. RESULTADOS.....	47
4.1. Fitoplasmas.....	47
4.2. B. cockerelli.....	53
4.3. Virus.....	54
V. DISCUSIÓN.....	55
VI. CONCLUSIONES.....	60
VII. LITERATURA CITADA.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales países productores de jitomate a nivel mundial.....	3
Cuadro 2. Superficie cultivada de jitomate a nivel mundial.....	3
Cuadro 3. Estados productores de jitomate en México 2004-2006.....	4
Cuadro 4. Insectos vectores de fitoplasmas de la familia Cicadellidae.....	30
Cuadro 5. Muestras de plantas de jitomate colectadas en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, las cuales mostraban síntomas atribuibles a virus.....	44
Cuadro 6. Detección de fitoplasmas mediante PCR en muestras de plantas de jitomate con síntomas putativos a estos procariontes.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Síntomas en plantas de jitomate observados en diferentes localidades y condiciones de crecimiento.....	48
Figura 2. Síntomas observados en las plantas mantenidas en invernadero e injertadas con tejido de plantas de jitomate	49
Figura. 3. Microscopia de fluorescencia mostrando el tejido del floema de muestras vegetales de jitomate.....	50
Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para la detección del gen 16S rARN de fitoplasmas,.....	52
Figura 5. Análisis de los fragmentos polimorficos largos de restricción (RFLP) obtenidos de la digestión enzimática	53
Figura 6. <i>Bactericera cockerelli</i> . A). Ninfa. B). Cabeza de ninfa con su aparato bucal completo y desarrollado (→). C). Adulto. D). Cabeza de adulto con su aparato bucal completo y desarrollado (→).....	53
Figura 7. Plantas de jitomate injertadas con tejido vegetal colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos,.....	55

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es cultivado en más de un centenar de países en el mundo; destacando China, Estados Unidos de Norteamérica y Turquía como los tres principales productores de esta hortaliza (FAOSTAT, 2006), México ocupa el décimo lugar (FAOSTAT, 2006); los principales estados productores en el país son Sinaloa, Michoacán, Baja California, San Luis Potosí, Baja California Sur, Zacatecas, Morelos (SIAP, 2006), entre otros; donde el jitomate se cultiva tanto a cielo abierto como en invernadero; lamentablemente los problemas del cultivo son demasiados; destacando el provocado por plagas y enfermedades que han causado la disminución de la superficie cultivada y en algunos casos la desaparición del cultivo, particularmente en el ciclo agrícola otoño-invierno, en algunas zonas productoras del país, tal es el caso del estado de Morelos (SIAP, 2006). Lo anterior sigue asociándose como un producto de la interacción de los geminivirus y mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) con todos los demás factores epidemiológicos, aunque se ha demostrado la alta correlación de los daños manifiestos, con elementos del clima extralimitados en cuanto al funcionamiento normal del jitomate; generándose pérdidas hasta del 100% cuando dichos elementos no se ajustan microambientalmente, lo cual con el uso de invernaderos y Bioespacios esta ocurriendo a nivel país (Bustamante, 1995; Bustamante *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 2006). Aunado a esto se tiene el hecho de que hace aproximadamente 3 ó 4 años surgió como una plaga potencial el insecto *Bactericera cockerelli*, que se sumó a la problemática fitosanitaria de la mayoría de los cultivos de solanáceas como tomate (*Physalis ixocarpa*), papa (*Solanum tuberosum* L.), berenjena (*S. melongena* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y jitomate (*L. esculentum* Mill) (Garzón *et al.*, 2005). El insecto se encuentra presente en todas las zonas productoras de jitomate del país y su efecto en el cultivo aún no esta del todo claro; en Estados Unidos se ha reportado que este ocasiona un daño directo producto de la inyección de una toxina, se considera que las ninfas tienen mayor capacidad patogénica debido en gran medida a su poco movimiento (Trumble, 2005); en México, en plantas de jitomate se presenta una enfermedad similar, y se ha postulado que el insecto es vector de otro patógeno de plantas descubierto en 1967 y actualmente conocido como fitoplasma (Garzón *et al.*, (Garzón *et al.*,

2005). Existiendo aún la controversia de si la sintomatología que repercute en el declinamiento del jitomate, es consecuencia de la toxina inyectada por el psílido, o si el responsable de los síntomas es el fitoplasma mientras que el psílido solamente actúa como su vector y si es el caso ¿presenta transmisión transovárica?, o ¿la sintomatología es producto de la interacción de la toxina y de la patogenicidad del fitoplasma?. A la fecha no existen evidencias experimentales contundentes que sustenten lo anterior; de ahí que la presente investigación tuvo por objetivos:

General:

- ⊕ Determinar la relación de los fitoplasmas, *B. cockerelli* y geminivirus con el síndrome del declinamiento del jitomate.

Específicos:

- ⊗ Identificar a los fitoplasmas asociados con los síntomas de declinamiento en jitomate.
- ⊗ Detectar e identificar fitoplasmas en el insecto *B. cockerelli*.
- ⊗ Determinar el papel del insecto *B. cockerelli* en el síntoma de declinamiento del jitomate.
- ⊗ Detectar e identificar geminivirus en plantas de jitomate con síntomas de declinamiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El jitomate

Lycopersicon esculentum Mill. es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia a nivel mundial; cultivado en más de un centenar de países y consumido en prácticamente toda la faz de la tierra ya sea en fresco o industrializado. En 2005, México ocupó el décimo lugar en producción de jitomate (Cuadro 1), y a nivel nacional los principales estados productores de esta hortaliza son Sinaloa, Michoacán, Baja California, San Luis Potosí, Baja California Sur, Zacatecas, Morelos, Nayarit, Sonora, Tamaulipas, Jalisco, entre otros (Cuadro 3, SIAP, 2006). Por otro lado, en el Cuadro 2, se aprecia una tendencia en el incremento de la superficie cultivada en los distintos países productores de esta importante hortaliza, mientras que para el caso de México la tendencia es a la baja (FAOSTAT, 2006).

Cuadro 1. Principales países productores de jitomate a nivel mundial.

País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Promedio sexenio	
	Miles de toneladas						Miles de Ton.	% del total
China	22,325	24,116	27,153	28,843	30,144	31,644	27,371	23,7
Estados Unidos	11,559	10,002	12,383	10,522	12,766	12,766	11,666	10,2
Turquía	8,890	8,425	9,450	9,820	9,440	9,700	9,288	8,0
India	7,430	7,240	7,460	7,600	7,600	7,600	7,490	6,7
Italia	7,538	6,529	5,750	6,652	7,683	7,815	6,995	6,1
Egipto	6,786	6,329	6,778	7,140	7,641	7,600	7,046	6,0
España	3,766	3,972	3,980	3,948	4,442	4,474	4,097	3,6
Irán	3,191	3,009	4,109	4,200	4,200	4,200	3,818	3,3
Brasil	2,983	3,103	3,653	3,709	3,489	3,304	3,374	3,0
México	2,086	2,183	1,990	2,148	2,148	2,148	2,117	1,9
Argentina	693	648	668	670	675	675	672	0,6
Resto del mundo	31252	31,016	31,003	32,892	33,778	33,090	32,172	27,1
Total	108,499	106,572	114,377	117,348	124,120	125,016	115,989	100

Fuente: Base de datos estadísticos de la FAO.- FAOSTAT, 2006.

Cuadro 2. Superficie cultivada de jitomate a nivel mundial.

País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Promedio sexenio	
	Hectáreas cosechadas						Miles de Ton.	% del total
China	869,355	934,438	1,005,199	1,055,126	1,255,046	1,305,053	1,070,703	25.21
Estados Unidos	167,050	161,510	178,550	168,200	172,810	172,810	170,155	4.00
Turquía	225,000	225,000	255,000	260,000	255,000	260,000	246,667	5.80
India	460,000	460,000	460,000	540,000	540,000	540,000	500,000	11.72
Italia	137,155	123,825	122,045	130,507	144,963	141,258	133,292	3.138
Egipto	195,444	180,721	191,171	192,976	195,164	195,000	191,746	4.514
España	62,285	63,030	59,266	62,973	69,900	70,400	64,642	1.522
Irán	118,665	110,229	129,000	130,000	130,000	130,000	124,649	2.934
Brasil	56,002	57,488	62,520	63,479	59,315	58,385	59,532	1.401
México	74,629	74,451	67,372	67,084	67,084	67,084	69,617	1.639
Argentina	18,500	17,500	17,000	17,500	17,333	17,333	17,528	0.412
Resto del mundo	1,608,628	1,574,752	1,570,404	1,611,648	1,632,561	1,593,396	1,598,565	37.639
Total	3,992,713	3,982,944	4,117,527	4,299,493	4,539,176	4,550,719	4,247,096	100

Fuente: Base de datos estadísticos de la FAO.- FAOSTAT, 2006.

Cuadro 3. Estados productores de jitomate en México 2004-2006.

PRODUCCIÓN AGRÍCOLA					
Ciclo: Año Agrícola OI+PV 2005					
Modalidad: Riego + Temporal					
2004		2005		2006	
Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)
SINALOA	26,405.00	SINALOA	26,489.50	SINALOA	22,137.00
MICHOACAN	6,441.51	BAJA CALIFORNIA	5,708.00	MICHOACAN	4,955.72
SAN LUIS POTOSI	6,303.50	BAJA CALIFORNIA SUR	3,403.30	BAJA CALIFORNIA	4,927.00
BAJA CALIFORNIA	6,212.05	SAN LUIS POTOSI	6,634.35	SAN LUIS POTOSI	4,121.25
BAJA CALIFORNIA SUR	3,616.75	JALISCO	2,673.75	BAJA CALIFORNIA SUR	3,399.70
JALISCO	3,007.00	TAMAULIPAS	2,838.25	ZACATECAS	3,222.50
MORELOS	2,829.80	MICHOACAN	5,047.50	MORELOS	3,133.62
SONORA	2,426.00	ZACATECAS	1,929.00	NAYARIT	2,561.50
NAYARIT	2,316.00	SONORA	1,996.00	SONORA	2,359.00
TAMAULIPAS	2,269.50	MEXICO	937	TAMAULIPAS	2,353.50
ZACATECAS	2,028.00	MORELOS	2,848.10	JALISCO	2,100.00
VERACRUZ	1,386.50	VERACRUZ	1,390.25	VERACRUZ	1,776.25
PUEBLA	1,306.00	OAXACA	857	PUEBLA	1,274.90
GUERRERO	1,167.10	PUEBLA	1,223.00	GUERRERO	1,255.55
GUANAJUATO	951.5	COLIMA	706	MEXICO	902.5
MEXICO	834	NAYARIT	2,761.50	OAXACA	901.25
CHIHUAHUA	816.68	NUEVO LEON	710	COAHUILA	804.25
OAXACA	797	CAMPECHE	607	CHIAPAS	802.5
COAHUILA	734.5	CHIHUAHUA	797.78	COLIMA	590.63
CHIAPAS	714	COAHUILA	1,007.00	HIDALGO	510.35
AGUASCALIENTES	601	GUERRERO	974.5	CHIHUAHUA	437.25
HIDALGO	514.5	CHIAPAS	690.25	CAMPECHE	414.7
CAMPECHE	491.5	AGUASCALIENTES	404	GUANAJUATO	371.5
COLIMA	389	HIDALGO	472.87	AGUASCALIENTES	355
YUCATAN	311.64	GUANAJUATO	554	YUCATAN	279.99
NUEVO LEON	257	QUERETARO	185	QUERETARO	226
QUERETARO	233	YUCATAN	283.1	DURANGO	138
DURANGO	169.5	DURANGO	142.5	TABASCO	85.25
QUINTANA ROO	42.73	QUINTANA ROO	29.61	NUEVO LEON	68
TABASCO	32.5	TABASCO	50	QUINTANA ROO	41.73
DISTRITO FEDERAL	0.5	TLAXCALA	2.25	TLAXCALA	2
TLAXCALA	0	DISTRITO FEDERAL	2.2	DISTRITO FEDERAL	1
	75,605.26		74,354.56		66,509.39

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (S.I.A.P.), con información de las delegaciones, Distritos y Cader's de la Sagarpa, 2006.

Como todo cultivo hortícola, los insumos utilizados para su producción, sobre todo para el control de plagas y enfermedades han provocado la disminución y en algunos casos la desaparición del cultivo, en algunas zonas productoras del país; mientras que la mayoría de los países productores de esta hortaliza se encuentran en aumento de superficie sembrada, nuestro país a partir de 2002, muestra una tendencia a la estabilidad. Los Factores económicos que limitan la exportación, el efecto de la extralimitación en los elementos del clima, el incremento sustancial del rendimiento en ambientes protegidos (Bustamante *et al.*, 2004), así como el complejo de virus, principalmente del grupo de geminivirus y la presencia de los insectos mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y el psílido *B. cockerelli* en adición a otros problemas fitosanitarios han sido factores clave para explicar la situación actual (Kikushima, 2005). Desde hace relativamente pocos años (3 ó 4) se ha presentado un síndrome en el cultivo de jitomate con síntomas muy diversos, lo más típico son las coloraciones violáceas de los brotes jóvenes, necrosis y aborto de flores, aborto de frutos, amarillamiento foliar, foliolos enroscados hacia el envés y los márgenes mostrando una coloración púrpura, deformación del follaje; en algunas plantas los nuevos brotes son raquíuticos y amarillentos, el tejido vascular del tallo y pedúnculo del fruto presentan necrosis (Garzón *et al.*, 2005; Kikushima, 2005; Marín *et al.*, 1995). Esta enfermedad ha cobrado gran importancia entre los productores y en el área científica; en el campo los productores y técnicos atribuyen el problema al insecto *B. cockerelli* y/o al fitoplasma transmitido por dicho insecto. Algunos reportes informan que en plantas hospedantes del psílido (papa, jitomate), se presenta una condición fisiológica anormal conocida como amarillamientos del psílido producto de la inyección de una toxina; las plantas afectadas muestran un amarillamiento general de las hojas, follaje con tonalidades púrpura, retraso en el crecimiento y puede o no haber pérdida del vigor y rendimiento (Daniels, 1954; Liu *et al.*, 2006b; Schall, 1938; Trumble, 2005), en caso particular de papa, se ha observado una emisión de brotes de los tubérculos y formación de éstos últimos en la parte aérea (Pavlista, 2002; Richards, 1928). Una sintomatología similar se presenta en plantas de jitomate, existiendo aún la controversia de si la sintomatología es consecuencia de la toxina inyectada por el psílido, o si el responsable de los síntomas es el fitoplasma mientras

que el psílido solamente actúa como vector y si es el caso ¿presenta transmisión transovárica?, o ¿la sintomatología es producto de la interacción de la toxina y de la patogenicidad del fitoplasma?. Las respuestas a estas interrogantes proveerán de la información básica necesaria para diseñar estrategias adecuadas de manejo de la enfermedad.

2.2. Fitoplasmas

A nivel mundial se han reportado dos fitoplasmas infectando jitomate; la yema grande del tomate (Tomato Big Bud), perteneciente al grupo 16SrI (Aster Yellows), que ocasiona como su nombre lo dice, yemas más grandes de lo normal e hinchadas que no pueden retener los frutos; engrosamiento de tallos apicales, acortamiento de entrenudos (achaparramiento), hojas pequeñas y enrolladas hacia el envés, de color verde-amarillento o púrpura; y eventualmente pueden desarrollarse raíces sobre el tallo (Anfoka, 2003; Favalli, 2001; U. de C., 1998). El otro fitoplasma, Stolbur (16SrXII-A), perteneciente al grupo Stolbur; ocasiona reducción en el tamaño de las hojas, amarillamiento y escoba de bruja. Los frutos son deformes y más pequeños que los de plantas sanas, de color rojo encendido y una consistencia más firme de la pulpa (Blancard, 1990; Favali *et al.*, 2001; Fedotina *et al.*, 1979; Jones y Jones, 1991).

En nuestro país, en los últimos años se ha presentado una enfermedad de etiología desconocida; los síntomas que presentan las plantas son muy diversos, se ha observado necrosis, aborto de flores y frutos, deformación del follaje, amarillamiento foliar, los folíolos se enroscan hacia el envés y los márgenes muestran una coloración púrpura; en algunas plantas los nuevos brotes son raquíuticos y amarillentos, y el tejido vascular del tallo y pedúnculo del fruto presentan necrosis (Bayer CropScience, 2005; Garzón *et al.*, 1986; Garzón *et al.*, 2005, observación personal).

Garzón *et al.*, (2005) menciona dos nuevos problemas en jitomate; a uno de los cuales da el nombre de “permanente del tomate”, y a su vez relaciona con el insecto *B. cockerelli*; esté último como vector. Los síntomas de la enfermedad son: clorosis de brotes apicales, los folíolos tienden a ser lanceolados y con epinastia, necrosis y aborto de flores, hojas maduras quebradizas y enrolladas hacia arriba y disminución del crecimiento. El otro problema, el “declinamiento del tomate”; cuyo agente causal

se desconoce, pero los síntomas coinciden con los descritos para el permanente. El cual también ha sido reportado en el Valle Imperial en Estados Unidos. Kikushima, (2005) menciona que el permanente del tomate es la enfermedad que más daños causa al cultivo del jitomate; con más de 20 mil hectáreas estimadas, con daños anuales del 45%.

Por otro lado, se menciona que el punto crítico de infección se presenta entre la quinta y sexta floración disminuyendo la producción (Garzón, 2006 comunicación personal). Recientemente, se ha reportado que *B. cockerelli*, tiene la capacidad de actuar como vector; se menciona un periodo de adquisición de al menos 15 min y 15 min más para transmitirlo con una eficiencia de 20%; mientras que 40% de eficiencia de transmisión puede ser alcanzado entre dos y 24 horas de alimentación (Garzón *et al.*, 2005).

2.2.1. Fitoplasmas: características e importancia

Los fitoplasmas son organismos procariontes endocelulares, incluidos dentro de la Clase Mollicutes, nombre derivado del latín *mollis* (blando, suave), y *cutis* (piel), haciendo referencia a la carencia de pared celular, son parásitos obligados y están limitados al floema. Hasta la fecha uno de los factores limitantes para su estudio es la incapacidad de cultivarse *in vitro*, son resistentes a antibióticos que actúan a nivel de pared celular, pero sensibles a tetraciclinas, las cuales actúan inhibiendo la biosíntesis proteica a nivel de los ribosomas 70 y 80 S, ya que interfieren en la transcripción del mensaje genético al impedir el reconocimiento del ARN mensajero al interior de la subunidad 30 S del ribosoma; de esta forma impide la unión del aminoacil, incluyendo el de iniciación (formil), con el sitio receptor en dicha unidad, provocando así el bloqueo de la iniciación de la cadena polipeptídica; por otro lado, tiene la capacidad de formar quelatos con los cationes metálicos bivalentes, bloqueando enzimas que intervienen en la síntesis proteica (Barbara *et al.*, 2001; Kuboyama *et al.*, 1998; Parry, 1990; Waller, 2002).

En 1926, Kunkel citado por Lee *et al.*, 1998a describió por primera vez síntomas de virescencia y malformaciones florales en plantas de áster americano; sin embargo, tales síntomas se atribuyeron a infección por virus. Fue hasta 1967 que Doi y

colaboradores en Japón, observaron mediante microscopía electrónica la presencia de fitoplasmas en tejido de plantas de áster con síntomas de amarillamiento (Lee *et al.*, 1998a). Esta nueva clase de agentes infectivos en plantas, fueron originalmente llamados organismos tipo micoplasma (MLOs) [mycoplasma-like organisms], debido a su semejanza con los micoplasmas que causan enfermedades en seres humanos y animales. Una diferencia esta dada por la región espaciadora entre la fracción 16S y 23S; donde existe un espaciador con un solo ARNt de isoleucina contrariamente a los micoplasmas que están desprovistos de éste o bien a las bacterias y espiroplasmas donde se observa una diversidad del ARNt en dos o tres espaciadores diferentes. En 1994, la caracterización de los fitopatógenos asociados con los amarillamientos había progresado a un punto tal, que llegó a estar claro que eran únicos y deberían tener nombre propio; fue entonces cuando el Comité Internacional de Taxonomía de los Mollicutes decidió, en julio del 94, sustituir al nombre "MLOs" por "Fitoplasmas", ya que a pesar de que se multiplican en sus hospedantes son esencialmente fitopatógenos (Barros *et al.*, 2002; Cousin, y Boudon, 2001; Lee *et al.*, 1998b; Waller, 2002).

La fisiología de los fitoplasmas es una de las características que hacen únicos a estos organismos, carecen de muchos genes que codifican para la síntesis de enzimas involucradas en: la producción de aminoácidos, biosíntesis de ácidos grasos, ciclo del ácido tricarboxílico, la fosforilación oxidativa, el sistema fosfotransferasa y metabolismo de UDP-galactosa a glucosa 1-fosfato. Sugiriendo que los fitoplasmas poseen una única entrada de azúcar (sucrosa) y un sistema metabólico para suplir la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones vitales. También carecen del ciclo de la pentosa fosfato, el cual es clave para sintetizar NADPH y obtener fuerza reductora, así como para la síntesis de nucleótidos, excepto aquellos que se sintetizan por la ruta de salvamento, única ruta de biosíntesis de nucleótidos, purinas y pirimidinas que se unen a 5-fosforibosil-1-pyrofosfato (PRPP), ribosa activada, para formar los respectivos nucleótidos fuente para la síntesis de ADN, ARN y enzimas co-factores (Berg *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2004; Weintraub y Beanland, 2005). Ellos probablemente no sintetizan nucleótidos, sino más bien los obtienen de su ambiente; así como los demás metabolitos que no pueden sintetizar. El fitoplasma del

amarillamiento de la cebolla, cuenta con el gen *tmk*, responsable de la síntesis de la proteína con función enzimática conocida como timidilato cinasa (TMK); la cual cataliza la transferencia de un grupo fosforil terminal desde ADP hacia dTMP, crucial en la ruta de salvamento y de nueva síntesis de deoxirribonucleótidos pirimidina, recordar que los mollicutes solo llevan a cabo la síntesis de nucleótidos mediante la ruta de salvamento. Se determinaron dos genes *tmk* (el *tmk-a* y el *tmk-b*), ubicados en posiciones diferentes del genoma OY y que codifican proteínas de 208 y 207 aminoácidos, respectivamente; solo el péptido de *tmk-b* mostró actividad catalítica; sin embargo, se piensa que el producto de *tmk-a* también es activo y la falta de detección de actividad quizás fue error del método utilizado (sistema de expresión en *E. coli* del gen fusionado con una polihistidina marcada). Se propone que funcionan en rutas independientes y que los genes de una u otra, son prendidos en respuesta a cambios en su hábitat (células del tubo criboso del floema o células de insectos). Inclusive es propuesto que *tmk-a* podría funcionar como otro tipo de cinasa; ya que por ejemplo, en *Mycoplasma* spp. la deoxiadenosina cinasa puede fosforilar no solo a deoxiadenosina, sino también a deoxiguanosina y deoxicitidina (Miyata *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2004).

Los fitoplasmas también poseen genes que codifican para la síntesis de folato, los cuales pueden permitirles adaptarse a los muy diferentes ambientes de plantas e insectos que ellos habitan (Oshima *et al.*, 2004).

Todo organismo vivo debe contar con un sistema de síntesis de ATP (ATP sintasa tipo F_0F_1 o A_0A_1); pero en el genoma del fitoplasma OY-M, no se identificó a ninguna de las ocho subunidades de ATP sintasa. Este fitoplasma es el primer organismo vivo encontrado que carece de todas las subunidades para la síntesis de ATP. *Chlamydia trachomatis* tiene una translocasa ATP/ADP e importa el ATP desde su hospedante, pero el genoma de los fitoplasmas no codifica genes similares, sugiriendo que este importa el ATP del hospedante mediante un mecanismo desconocido. Alternativamente la síntesis de ATP en los fitoplasmas podría ser fuertemente dependiente de la ruta de la glicólisis, aunque se encontró en el genoma de OY que el ATP podría ser suministrado por una proteasa dependiente de Zinc (Oshima *et al.*, 2004).

El cromosoma del fitoplasma posee un gen que codifica la sucrosa fosforilasa, la cual rompe la sucrosa en glucosa y fructosa, pero la evidencia de que este marco de lectura abierto (Open Reading Frame ORF) está incompleto y la ausencia de actividad de la sucrosa fosforilasa sugiere que este gen no es funcional; un fitoplasma ancestral podría haber tenido una copia funcional de este gen. Las concentraciones de sucrosa son bajas en células de insectos, pero más altas en la savia del floema de las plantas; lo anterior podría explicar porque los fitoplasmas no requieren este gen (Oshima *et al.*, 2004).

Aunque los genes que regulan el metabolismo son escasos en el genoma de estos patógenos, se han identificado alrededor de 27 genes que codifican sistemas transportadores de malato, ion-metal y aminoácidos; en adición a los genes que codifican para sistemas transportadores, hay múltiples copias de los genes *uvrD*, *hflB*, *tmk*, *dam* y *ssb*; (18% de 754 genes). Los genes *potB*, *potC* y *potD*, que codifican para la síntesis de proteínas transportadoras de poliaminas, las cuales son subunidades de un sistema transportador ABC (PotABCD), responsable de la importación de poliaminas, espermidina y putrescina. En este operón, la proteína PotA está normalmente asociada con la membrana interna, la cual contiene un sitio de anclaje de ATP para suplir la energía al sistema. PotB y PotC son proteínas formadoras de canales compuestas de seis segmentos transmembranales. Mientras que la proteína PotD es la responsable de la unión periplásmica de la espermidina/putrescina (los fitoplasmas carecen de un espacio periplásmico por lo que el anclaje debe existir como una proteína de la superficie membranal expuesta en el exterior de la célula). Las poliaminas son necesarias para el crecimiento celular y están entre los principales polímeros presentes en la célula (Mounsey *et al.*, 2006). La mayoría de los genes encontrados, tienen múltiples copias sugiriendo que los fitoplasmas importan de manera demandante muchos metabolitos desde la célula hospedante. El consumo de esos metabolitos por parte de los fitoplasmas altera el balance metabólico de la célula hospedante causando los síntomas de la enfermedad (Oshima *et al.*, 2004).

El análisis del genoma del fitoplasma OY sugiere una evolución reductiva como consecuencia de su vida de parásito intracelular en un ambiente rico en nutrientes, ya

que carecen de varios genes considerados esenciales para la replicación autónoma de la célula; entre ellos la carencia del ciclo de la pentosa fosfato, y mas inexplicablemente, las subunidades de ATP-sintasa, los cuales son esenciales para la vida. En su lugar, este posee genes transportadores involucrados en la extracción de sustancias desde el citoplasma circundante de la célula hospedante (Oshima *et al.*, 2004).

Tradicionalmente el nombre de los fitoplasmas se asignaba en función de la planta hospedante y los síntomas ocasionados en la misma; sin embargo, en la actualidad gracias al desarrollo de nuevas técnicas y herramientas de biología molecular ha sido posible separar a los fitoplasmas en grupos y subgrupos (Lee *et al.*, 1998b; Welliver, 1999). El gen 16S ADNr constituido por 1,500 bases, se encuentra dentro del operón ribosómico de los procariotas, junto con otros dos genes de ADN ribosómico; el 23S 2,900 bases y el 5S de 120 bases (Condon *et al.*, 1992 citados por Garcia, 2004). Así, con base en la amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr de estos organismos vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han clasificado 246 fitoplasmas en 20 grupos distintos: 1) stolbur; 2) amarillamiento del áster (aster yellows, AY); 3) proliferación de la manzana (apple proliferation, AP); 4) amarillamiento letal del cocotero (coconut lethal yellowing, CLY); 5) escoba de bruja del chícharo (pigeonpea witches'-broom); 6) enfermedad X (X-disease); 7) enanismo amarillo del arroz (rice yellow dwarf); 8) amarillamiento del olmo (elm yellows); 9) amarillamiento del fresno (ash yellows); 10) filodia de la crotalaria (sunnhemp phyllody); 11) escoba de bruja del estropajo o luffa (loofah witches'-broom); 12) proliferación del trébol y escoba de bruja del cacahuate (clover proliferation and peanut witches'-broom); 13) amarillamiento australiano de la vid (Australian grapevine yellows, AUSGY), 14) stolbur italiano de la enredadera (Italian bindweed stolbur, IBS); 15) escoba de bruja del espino cerval (buckthorn witches'-broom, BWB); 16) escoba de bruja de la retama (*Spartium junceum* Spartium witches'-broom, SpaWB), 17) escoba de bruja italiana de la alfalfa (Italian alfalfa witches'-broom, IAWB), 18) filodia del cardo (Cirsium phyllody, CirP), 19) hoja blanca del pasto bermuda (Bermuda grass white leaf, BGWL) 20) y declinamiento letal de la palma en Tanzania, (Tanzanian lethal decline, TLD)

[Kirkpatrick *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1998].

Las enfermedades causadas por estos patógenos ocurren en muchos cultivos y en todo el mundo, aunque algunos fitoplasmas tienen un rango de hospedantes y distribución restringidos. Se reportan más de 600 distintas enfermedades atribuidas a fitoplasmas, afectando a centenares de especies de varios géneros de plantas. Muchas de las enfermedades económicamente importantes están en árboles perennes; incluyendo el amarillamiento letal del cocotero, la enfermedad x del duraznero, la proliferación del manzano y el declinamiento del peral. En plantas anuales son frecuentes: el amarillamiento del áster, la proliferación y filodia del trébol, el amarillamiento de la cebolla, y la yema grande del tomate; fitoplasmas causantes del amarillamiento del olmo y fresno, son responsables de declinamientos en áreas forestales, predios madereros y paisajes urbanos (Barros *et al.*, 2002; Nishigawa *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 1997; Seemüller *et al.*, 1998).

Los fitoplasmas no pueden ser transmitidos mecánicamente, frotando la savia de una planta infectada sobre una planta sana o usando herramientas contaminadas. Pero la transmisión puede ser vía injerto; las plantas que crecen juntas pueden infectarse a través de injertos naturales formados entre las raíces (Welliver, 1999). También plantas parásitas como cúscuta (*Cuscuta* spp. y *Cassytha* spp.) pueden actuar como agentes de diseminación de los fitoplasmas (McCoy *et al.*, 1989; Marcone *et al.*, 1999). Sin embargo, la principal forma de diseminación se da a través de insectos vectores, los cuales adquieren al fitoplasma cuando se alimentan del floema de plantas enfermas (Waller, 2002; Weintraub y Beanland, 2005; Welliver, 1999). En general se ha observado un alto grado de especificidad entre los fitoplasmas y su insecto vector (Tedeschi y Alma, 2004). Los vectores más comunes, o por lo menos los conocidos, son miembros del orden Homóptera, de las familias Cicadellidae, Cixiidae, Psyllidae, Cercopidae, Delphacidae, Derbidae, Menoplidae y Flatidae; los cuales, en la mayoría de los casos se transmiten de forma transestadial y sólo en algunas cuantas especies se ha demostrado una transmisión transovárica (Beanland *et al.*, 2000; Hanboonsong *et al.*, 2002; Kawakita *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998a; Marcone *et al.*, 2001; Parry, 1990).

Los síntomas asociados con la presencia de fitoplasmas incluyen amarillamiento o enrojecimiento general de hojas, reducción de la lámina foliar, acortamiento de entrenudos, pérdida de dominancia apical, escobas de bruja, virescencia, filodia, necrosis de tejido vascular, flores, follaje y raíces; esterilidad y aborto de frutos, declinamiento general de la planta, reducción del rendimiento y algunas veces la muerte (Waller, 2002; Welliver, 1999).

2.2.2. Formas de detección

Prueba Histoquímica

Tinción con DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Dicha prueba se basa en el principio de tinción de ácidos nucleicos (ADN), preferentemente ricos en Adenina y Timina tiñendo a éstos de color azul fluorescente, visto con la ayuda del microscopio de fluorescencia a 380 nm (Cousin y Boudon, 2001).

Microscopía electrónica

Gracias al microscopio electrónico, fue posible en 1967 la observación de estos organismos. Desde entonces y sobre todo en años recientes ha sido una de las herramientas utilizadas para su detección; sin embargo presenta desventajas como la poca cantidad de tejido procesado para el análisis, así como lo laborioso para la preparación de las muestras, aunado a que la observación física de los fitoplasmas no permite su diferenciación ni clasificación. Teniendo que recurrir a otras herramientas para tales efectos (Ahrens y Seemuller, 1992; Lee *et al.*, 1998a).

Serología

La presencia de una membrana trilaminar constituida principalmente por proteínas, ha permitido el desarrollo de antisueros monoclonales en la prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), estos han sido una de las herramientas para la detección de estos fitopatógenos; tales como el del amarillamiento del áster, amarillamiento de la vid, sin embargo presenta la desventaja de ser demasiado específico impidiendo así la detección de otros fitoplasmas, además es afectado por los bajos títulos, lo que conlleva a diagnosticar falsos negativos (Chen *et al.*, 1993; Hiruki, 1988; Kirkpatrick *et al.*, 1987).

Análisis molecular

En años recientes, la importancia de los fitoplasmas empieza a reconocerse gracias al desarrollo de técnicas moleculares para su detección, pero aún se desconoce mucho acerca de su biología, fisiología y de las interacciones que establece con sus hospedantes (insectos vectores o plantas).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir del desarrollo de la técnica de la PCR (Polymerase Chain Reaction), en la década de los 80's, el área de la fitopatología ha sido beneficiada con dicha herramienta (Schuler y Orozco, 2006). PCR se define como un método bioquímico enzimático, *in vitro*, el cual es análogo a los procesos celulares; consiste en la amplificación exponencial de un fragmento de ADN generando millones de copias de dicho fragmento, cuando se le proporcionan las condiciones adecuadas como el templado (ADN), la enzima taq polimerasa (polimerasa de ADN) con la capacidad de "leer y pegar", leer el nucleótido en la cadena molde y pegar su complementario en la cadena que se está sintetizando, la cual es ayudada por el $MgCl_2$ actuando como quelante y catalizador en la reacción; así como el buffer o amortiguador de la polimerasa (buffer 1X). Los primers o iniciadores, colocados con el objeto de que flanqueen en el ADN blanco el segmento que se desea amplificar; dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatados), los cuales ayudan en la extensión de la cadena generada *de novo* y finalmente la mezcla se coloca en un tubo de reacción y recorriendo al termociclador que tiene la función de subir y bajar cíclicamente las temperaturas durante el tiempo que se programe. Al término de la reacción el fragmento generado (millones de copias) se hace visible por electroforesis y revelado (Erich *et al.*, 1991; Henson y French, 1993; Mullis, 1990; Sambrook *et al.*, 1989).

La electroforesis, consiste en cargar cierta cantidad del producto de PCR en los pozos de un polímero (agarosa o acrilamida); junto con un marcador de peso molecular que servirá como punto de referencia para buscar el tamaño de la banda generada y por comparación decidir si es la banda que se está buscando. La migración del ADN en la malla formada por el polímero se da gracias a la carga negativa del ADN, cuando a éste se le aplica corriente eléctrica en un buffer con un pH básico. (Erich *et al.*, 1991; Mullis, 1990; Sambrook *et al.*, 1989).

Revelado, una vez que el colorante (zona de avance) llega al final del gel, este se transfiere a un recipiente con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por aproximadamente 10 minutos; transcurrido este tiempo se procede a visualizar el gel mediante un transiluminador de luz UV adaptado a un fotodocumentador donde al final se tiene la opción de guardar las imágenes.

Para el caso de fitoplasmas se recurre al uso de primers universales (P1, P3, P4, P6, P7, 520F, 920R) diseñados a partir del gen ribosomal 16S y 23S (Ahrens y Seemüller, 1992; Nambda *et al.*, 1993). Los cuales amplifican una región entre el gen 16S a 23S del ADNr en la PCR directa y los iniciadores R16F2n/R16R2 y R16mF2/R16mR1 para una reamplificación del espacio Intergénico mediante PCR anidada, Nested-PCR (Gundersen y Lee, 1996; Waterworth y Mock, 1999).

2.2.3. Alteraciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en plantas infectadas

Existen muy pocos estudios realizados para tratar de determinar qué procesos fisiológicos de la planta pueden estar siendo afectados por infecciones fitoplasmiales. Debido a los síntomas que estos ocasionan es posible inferir que podría estar pasando dentro de una planta infectada, sin embargo obtener las evidencias que lo demuestren no ha sido fácil; no obstante esfuerzos aislados sobre el tema han generado algunos resultados.

Alteraciones morfológicas en plantas hospedantes

La infección por fitoplasmas puede provocar algunas deformaciones en algunas estructuras de la planta. Curiosamente los elementos cribosos que contienen fitoplasmas con frecuencia presentan una estructura normal, mientras que los elementos cribosos próximos que no tienen fitoplasmas pueden estar degenerados (Siddique *et al.*, 1998). En plantas de *Chrysanthemum coronarium* se ha observado necrosis del floema de raíces y tallos, así como una excesiva formación de floema (hiperplasia) en el tallo principal (Uehara *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2004). Mientras que plantas de palma infectadas con amarillamiento letal muestran una reducción del crecimiento junto con necrosis de floema y raíces (Islas *et al.*, 1999; Maust *et al.*, 2003). En plantas de jitomate infectadas por fitoplasmas se ha observado la presencia

de lóbulos en la envoltura nuclear, lo que da al núcleo una apariencia deforme aunque el contenido de la matriz nuclear permanece intacto (Sánchez *et al.*, 1999), sin embargo se ha reportado pérdida del contenido nuclear en células de la hoja de caña de azúcar infectadas con fitoplasmas (Peralta y Ancheta, 1992 citados por Sánchez *et al.*, 1999). Las mitocondrias mostraron una gran dilatación a nivel de las crestas, donde se encuentran tres tipos de proteínas involucradas en el proceso de respiración de la planta, así como en la producción de energía (ATP) necesaria para que el resto del organismo pueda llevar a cabo otras funciones. Dicho hinchamiento de las crestas quizás, se cree se deba a la ausencia de algún componente como los iones fosfato y calcio, los cuales son importantes para mantener el equilibrio entre la incorporación y eliminación de líquidos intracelulares, por lo que la entrada rápida, por ejemplo de sacarosa causa una dilatación del espacio situado entre las crestas (Sánchez *et al.*, 1999). La incorporación rápida de agua a la mitocondria esta asociada con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, por lo que en consecuencia se inhibe la producción de ATP y en general el metabolismo de la planta De Robertis y De Robertis, (1986 citados por Sánchez *et al.*, 1999). El aparato de Golgi presenta alteración de las cisternas, que puede deberse a la ausencia de sustancias específicas que se ubican entre ellas; esta deformación puede repercutir en el flujo biosintético de sustancias, además de afectar la secreción de polisacáridos y proteínas que van dirigidas a la fabricación de la pared celular. Por otro lado, quizás debido a la falta de los procesos de ensamblaje y posible falta de los precursores, tampoco se formarían las enzimas presentes en los lisosomas y peroxisomas, claves en el proceso de fotorespiración y conversión en azúcares de los ácidos grasos almacenados en los lípidos a través del ciclo del glioxilato (Sánchez *et al.*, 1999). Los cloroplastos también pueden desaparecer o sufrir degeneración debido a la presencia de grana inmaduros, con poco desarrollo de la envoltura interna lo que afecta la fotosíntesis; dando en consecuencia una reducción de la productividad de la planta, o desarrollo. Por ultimo las vacuolas presentan proteínas con un patrón cristalino (Sánchez *et al.*, 1999).

Cambios en pigmentos

Los cambios en el nivel total de clorofila y carotenoides han sido cuantificados en plantas de manzano y vid infectadas con el fitoplasma de la proliferación del manzano y stolbur, respectivamente (Bertamini *et al.*, 2002a, Bertamini *et al.*, 2002b). Las concentraciones de estos dos pigmentos, en hojas de plantas de manzano infectadas han sido significativamente reducidas en 52 y 42%, respectivamente (Bertamini *et al.*, 2002a). Mientras que hojas de plantas de vid, infectadas con el Stolbur muestran un decremento de 32% para clorofila y 62% para carotenoides (Bertamini *et al.*, 2002b). Asimismo, los contenidos de clorofila a y b disminuyeron en hojas infectadas por AP y Stolbur, probablemente incrementando la actividad de la clorofilasa o bien induciendo una inhibición del ácido 5-amino levulinico (ALA), un precursor de la clorofila (Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b). Al igual, tanto en hojas de manzano como de vid, la relación de la clorofila a respecto a la clorofila b (Clor a/b) disminuyó; mientras que la relación carotenoides/clorofila incrementó (Bertamini y Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b; Bertamini *et al.*, 2002c; Bertamini *et al.*, 2003/4).

Se ha encontrado que la eficiencia fotoquímica medida como la relación F_v/F_m (Índice de fluorescencia variable máxima), fue de 0.827 en el control sano, mientras que para hojas infectadas fue de 0.592; usualmente este decremento refleja niveles alterados del transporte de electrones a través del fotosistema I o II (PSII). En el fotosistema I el transporte de electrones desde DCPIPH₂ (indofenol 2,6 diclorofenol) a MV (viologeno metil) se redujo en un 11% en hojas infectadas; mientras que en el fotosistema II la actividad del transporte de electrones en hojas infectadas desde H₂O a DCQB (2,6-dicloro-p-denzoquinona) y H₂O a SiMo (silicomobdilato) fue reducido en 15.44 y 68% respectivamente, en comparación con el testigo sano. Se comprobó que dicha reducción se presenta cuando el agua es el donador de electrones; en contraste una significativa restitución del PSII mediada por la reducción de DCPIP (indofenol 2,6-diclorofenol) fue observada cuando NH₂OH y DPC (carbazida difenil) fueron usados como donadores de electrones en hojas infectadas. Asimismo, se indujo un incremento en la fluorescencia variable F_v , así como de la relación F_v/F_m (de 0.291 hasta 0.613). La F_v fue tres veces más alta en hojas sanas comparado con hojas

infectadas. Existen tres proteínas extrínsecas de 33, 23 y 17 kDa asociadas con la superficie del lumen de la membrana del tilacoide, las cuales son requeridas para el funcionamiento óptimo del oxígeno en la maquinaria fotosintética. La proteína 33 kDa fue drásticamente reducida (90%) en hojas de plantas infectadas con el fitoplasma de la proliferación del manzano. La solubilización de estas proteínas, esta asociada con una parcial o total inactivación de la evolución del O₂; en particular la remoción experimental, de la proteína 33 kDa de la membrana del PSII con CaCl₂ y NaCl, resultan en una fuerte inhibición de la evolución del O₂ y la pérdida es subsecuentemente restaurada por la reconstitución de la proteína membranal agotada. Se ha propuesto la existencia de una cuarta proteína de 10 kDa localizada en el interior del tilacoide (altamente enriquecida en la región de los grana del cloroplasto), con un posible papel en la evolución del oxígeno (Bertamini y Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b; Bertamini *et al.*, 2003/4).

Cambios en proteínas de la membrana del tilacoide

Las proteínas membranales del tilacoide son las responsables de la captación de la energía solar gracias a varios pigmentos entre ellos, clorofilas. Los cambios en la actividad del transporte de electrones fotosintéticos pueden ser el efecto de los cambios o bien de la reorganización de los componentes del tilacoide. Al analizar y comparar los polipéptidos de la periferia del tilacoide de hojas sanas y hojas enfermas por la infección de fitoplasmas, se observó en las últimas un decremento en la cantidad de polipéptidos, 47, 33, 28-25, 23 y 17 kDa, (Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b).

Cambios en la actividad de las enzimas ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO, RuBPC), y nitrato y nitrito reductasa

En hojas de manzano infectadas por AP, se reporta una disminución en la actividad de las enzimas RuBisCO y nitrato reductasa del 56 y 60%, respectivamente. Tal reducción es principalmente debida a la inhibición de la síntesis de proteínas inducida por la infección del fitoplasma. La disminución de la actividad enzimática de la RuBisCO correlacionada con la fijación de CO₂, es un efecto indirecto de la inhibición o destrucción de los pigmentos fotosintéticos. La pérdida de alguna de las 16

proteínas que conforman a la RuBisCO (ocho subunidades grandes (large subunits, LSU), codificadas por el genoma del cloroplasto y ocho subunidades pequeñas (small subunits, SSU), codificadas por el genoma nuclear e importadas desde el citoplasma al cloroplasto), es una de las razones para la marcada pérdida de la actividad de la RuBisCO en hojas infectadas (Bertamini *et al.*, 2002a). La enzima nitrato reductasa es la responsable de pasar el nitrógeno orgánico de nitrato a nitrito; mientras que la nitrito reductasa pasa de nitrito a amonio, éste último es la forma de nitrógeno asimilable para las plantas (Marschner, 2002). En plantas infectadas con fitoplasmas se ha observado que la actividad de la enzima nitrato reductasa fue disminuida en comparación con la nitrito reductasa, dicha reducción podría reflejar un balance entre la síntesis y activación por un lado y degradación o inactivación por el otro (Bertamini y Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b; Bertamini *et al.*, 2002c; Bertamini *et al.*, 2003/4).

Cambios en los niveles de azúcares

De forma general, las hojas maduras exportan los fotosintatos producidos hacia hojas y raíces jóvenes en crecimiento, por lo que cuando los contenidos de glucosa, fructosa, sucrosa y almidón se encuentran significativamente incrementados en plantas infectadas; se sugiere, se debe a que la translocación es severamente dañada, aunque el grado de daño depende del tipo de fitoplasma del que se trate (Bertamini y Nedunchezian, 2001; Bertamini *et al.*, 2002a; Bertamini *et al.*, 2002b; Bertamini *et al.*, 2002c; Lepka *et al.*, 1999; Maust *et al.*, 2003). La concentración de carbohidratos en raíces disminuye, mientras que en hojas incrementa, esto hace que el flujo de los azúcares a través del floema se vea afectado y como consecuencia se produce un estrés en este tejido (Maust, 2003).

Otro de los procesos afectados por la infección de fitoplasmas es la respiración, en donde por ejemplo la conductancia y apertura estomatal en plantas de palma de coco, infectadas con el amarillamiento letal del cocotero, es reducida drásticamente, debido a un incremento en los niveles de ácido abscísico (ABA) en las raíces y savia del xilema; tal incremento de ABA puede deberse a una descompartmentalización o catabolismo en el mesófilo de la hoja (Martínez *et al.*, 2000; Lepka *et al.*, 1999). El transporte vía floema y xilema, la turgencia y potencial osmótico de las hojas, el

contenido de agua y de las concentraciones de azúcares totales reducidos y no reducidos disminuyen (Maust *et al.*, 2003). El índice de respiración sufre un incremento, la relación carbono/nitrógeno se ve disminuida, y las actividades de las enzimas pectina-liaza y celulasas incrementan en palmas enfermas comparadas con palmas sanas (Islas *et al.*, 1999).

Los niveles de respiración en la raíz principal y raíces secundarias, de plantas infectadas con amarillamiento letal se ven claramente reducidos; en plantas severamente dañadas la reducción es hasta del 100% (Islas *et al.*, 1999). Para el caso de proteínas solubles, su concentración disminuye en raíces a la par del progreso de la enfermedad. Eskafi *et al.*, (1986 citados por Islas, 1999) reporta una reducción en la capacidad de las raíces para asimilar P^{32} , sugiriendo que podría estar relacionado con la pérdida de la fuerza conductora para la transpiración debido al cierre estomático.

Si las plantas infectadas muestran una proliferación de brotes o bien escoba de bruja, es indudable la presencia de un desbalance en la concentración de los reguladores de crecimiento como el ácido indolacético (IAA), responsable de la anulación de la dormancia de yemas apicales, así como del crecimiento de las ramas laterales. La inhibición del transporte del regulador resulta en la pérdida de dominancia apical. A su vez la disminución de IAA implica un incremento en la formación de inhibidores del transporte natural de las auxinas, probablemente flavonoides (Hegele y Bangerth, 1997).

2.2.4. Avances en el conocimiento a nivel molecular del genoma de los fitoplasmas

Es poca la información existente en torno a la genética de estos organismos sin embargo, existen algunos grupos de investigadores realizando investigación básica sobre fitoplasmas. Kuboyama y colaboradores (1998), de la Universidad de Tokio, trabajando con una cepa patogénica del fitoplasma que induce virescencia, amarillamiento, filodia, achaparramiento y escoba de bruja, enfermedad conocida como amarillamientos de la cebolla (Onion Yellow OY-W) y otra cepa mutante no virulenta (OY-M) que sólo induce un ligero acortamiento de entrenudos; en el análisis

de la secuencia de OY-W encontraron un inserto de 3,564 nucleótidos (W-H-9), correspondiente a un fragmento derivado del ADN de un plásmido denominado pOYW1, el cual se replica por un mecanismo de círculo rodante (RCR, Rolling Circle Replication). Contiene cinco marcos de lectura abiertos (ORFs), de los cuales el ORF5 tiene cuatro motivos muy similares a los cinco descritos para proteínas Rep de plásmidos de la familia pLS1 denominados RI-RV; en fitoplasmas el primer motivo está ausente. Al analizar los patrones de restricción obtenidos con la enzima WH9ΔsaII del ADN de ambos fitoplasmas se encontraron diferencias en el número de bandas; dos para OY-M mientras que OY-W mostró cuatro bandas. El análisis de los transcritos obtenidos reveló también diferencias en los dos fitoplasmas. Estas diferencias aparentemente, influyen en la patogenicidad entre las dos cepas de fitoplasmas del amarillamiento de la cebolla. El mecanismo RCR incrementa el error durante la replicación así como la frecuencia de recombinación de los plásmidos y de los ADNs extracromosomales, lo cual, en consecuencia incrementa la diversidad (Kuboyama *et al.*, 1998; Kakizawa *et al.*, 2001; Kakizawa *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2004).

Por otro lado se han realizado estudios acerca de proteínas de la membrana inmunodominante codificadas por el gen *imp*, localizadas en la superficie de la célula, los cuales hacen posible las reacciones inmunológicas mediante sus epitopes o determinantes antigénicos. Dichas proteínas interactúan directamente con el citoplasma de las células de plantas o insectos hospedantes. Así, existen genes en el genoma fitoplasmal responsables de codificar proteínas SecA, SecY y SecE, esenciales para el funcionamiento del sistema de translocación de proteínas Sec. Las proteínas SecA, son detectadas específicamente en tejidos del floema infectados con fitoplasmas (Barbara, 2001; Hong *et al.*, 2001; Kakizawa *et al.*, 2001; Kakizawa *et al.*, 2004). Las proteínas de la membrana inmunodominante se han clasificado en tres tipos: (i) SPWB, AP, ESFY, PD y PYLR; (ii) WX; y (iii) AY y CP, las siglas corresponden a los nombres de los fitoplasmas, en todos ellos se han aislado genes que codifican para proteínas de la membrana inmunodominante (Barbara *et al.*, 2002 citados por Kakizawa *et al.*, 2004).

Todas las proteínas tienen una región central hidrofílica, la cual puede estar en el exterior de la célula fitoplasmal, y uno o dos dominios transmembranales que interactúan con el hospedante con fines de establecer algún tipo de relación (Kakizawa *et al.*, 2001; Kakizawa *et al.*, 2004). El fitoplasma de la proliferación del manzano y el de la filodia del trébol muestran proteínas membranales clásicas de bacterias, con un N-terminal en la secuencia líder fragmentada durante la exportación para dejar un dominio extracelular hidrofílico libre, anclado por un dominio transmembranal cerca del C-terminal en el interior de la célula. Los fitoplasmas western X, aster yellows, pear decline y european stone fruit yellows tienen regiones transmembranales sólo en N-terminal, el resto de la proteína corresponde al dominio hidrofílico libre, presumiblemente retenido en el exterior de la célula; este dominio hidrofílico, así como sus variaciones en tamaño y secuencia primaria, podrían ser las partes más importantes de la proteína en términos de interacción externa. Es decir, este dominio podría en parte estar determinando la especificidad o la amplitud del rango de hospedantes de un fitoplasma dado; por ejemplo el fitoplasma proliferación del manzano es restringido a árboles frutales de las Rosáceas, en contraste el del amarillamiento del áster tiene un rango de hospedantes muy amplio (Barbara *et al.*, 2001; Blomquist *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2003).

Tomando como modelo los sistemas de translocación de proteínas de otros organismos como *Bacillus subtilis*, en donde arabinasas (producto del gen *abn9A*) y glucanasas (producto de los genes *bgIS* y *bgIC*) relacionadas con la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal y calosa, respectivamente, así como ciertas proteasas extracelulares (producto de los genes *aprE*, *epr*, *mpr*, *nprB*, *nprE* y *vpr*), y una xylanasa extracelular (producto del gen *xynA*) son exportados a través de la ruta Sec; se ha especulado que en los fitoplasmas, proteínas como las adhesinas, proteasas y enzimas hidrolíticas podrían ser transportadas desde su citoplasma hasta su superficie o al citoplasma del hospedante vía la ruta Sec, y esas proteínas transportadas podrían influir la patogenicidad (Kakizawa *et al.*, 2001). Así, clones del fitoplasma del amarillamiento del áster, aislado del cicadelido *Orosius albicinctus*, se identificó un ORF homólogo a la fusolina (también conocida como proteína de cuerpo fusiforme o GP37, la cual ha sido encontrada en baculovirus y en insectos infectados

por poxvirus incrementando la infección); sugiriendo que la proteína tipo fusolina es requerida para el establecimiento de la infección fitoplasmal (Melamed *et al.*, 2003). Mientras que en el fitoplasma del amarillamiento de la cebolla se identificaron glucanasas y proteínas tipo hemolisina como posibles factores de virulencia y no se encontraron otros genes ya conocidos, sugiriendo que su virulencia está gobernada por otros mecanismos aún no elucidados (Oshima *et al.*, 2004). Por otro lado, Mitsuhashi *et al.*, (2002 citados por Weintraub y Beanland, 2005), encontraron a *Wolbachia* coexistiendo con el fitoplasma enanismo de la mora en todos los tejidos del insecto *Hishimonoides sellatiformis*, sugiriendo que este otro procariote podría estar mediando la infección del fitoplasma en sus hospedantes.

2.3. Insectos vectores de fitoplasmas

Las interacciones entre insectos vectores de fitoplasmas son en algunos casos muy específicas, como lo sugiere la secuencia compleja de eventos requeridos y el alto grado de reconocimiento entre ambos organismos (Weintraub y Beanland, 2005); mientras que en algunos otros, una sola especie de insecto tiene la capacidad de transmitir más de un fitoplasma ej. *Hishimonus sellatus* el cual transmite seis fitoplasmas diferentes (Weintraub y Beanland, 2005), así como fitoplasmas que son transmitidos por más de una especie de insecto y un vector individual puede estar infectado con dos o múltiples linajes de fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2005).

En una investigación realizada a partir de una cepa tipo silvestre del fitoplasma causante de los amarillamientos de la cebolla (OY-W), se obtuvo una segunda cepa o línea (OY-M) inductora de síntomas leves como resultado de transmisiones a plantas de *Chrysanthemum coronarium* (utilizando el insecto vector *Macrostoteles striifrons* por un periodo de 11 años). Una tercera línea (OY-NIM) se obtuvo a partir de la causante de síntomas leves (OY-M) después de transmitirla durante 2 años solo por injerto y sin la participación de insectos. El fitoplasma OY-NIM aparentemente fue incapaz de atravesar el intestino o sobrevivir en la hemolinfa del insecto vector. El plásmido de OY-W y el de OY-M tienen cinco ORFs, mientras que el plásmido de OY-NIM solo tiene tres ORFs (carece del 3 y 4). En el ORF4 de pOYW y pOYM se encuentra el gen *ssb*, que codifica la síntesis de las proteínas SSB, implicadas en la transferencia

de ADN, protegiendo las cadenas sencillas de ADN de nucleasas del hospedante; así como la replicación, recombinación y reparación del ADN. Asimismo, ha sido reportado que la movilización de los plásmidos se da debido a un plásmido conjugativo largo (pGO1), el cual es codificado por el mismo gen (Kuboyama *et al.*, 1998; Nishigawa *et al.*, 2002). Se cree que el ORF3, está involucrado en la codificación de dos proteínas transmembranales y quizás juega un papel en la interacción entre la membrana de la célula fitoplasmal y el citoplasma o superficies de la célula hospedante (Nishigawa *et al.*, 2002).

Las relaciones entre los fitoplasmas y sus insectos vectores pueden ser benéficas, deletéreas o neutrales en términos de su impacto en la aptitud del insecto hospedante; los primeros reportes sugirieron que la infección por fitoplasmas fue perjudicial para los insectos hospedantes Severin (1946, citado por Weintraub y Beanland, 2005); mientras que reportes más recientes sugieren que los fitoplasmas pueden conferir algún incremento en la aptitud de sus insectos hospedantes (Beanland, 2000). Weintraub y Beanland, (2005) determinaron que la exposición a un linaje de AY incrementa la longevidad y fecundidad de hembras de *M. quadrilineatus*; sin embargo, exposición a otro linaje de AY incrementa la longevidad de los insectos probados, pero no el número de descendientes producidos. Los efectos por la infección de los fitoplasmas en los insectos hospedantes tienen implicaciones en la incidencia y dispersión de la enfermedad (Weintraub y Beanland, 2005). La infección por fitoplasmas puede tener diferentes efectos en diferentes especies de vectores, por ejemplo Madden *et al.*, (1995 citados por Weintraub y Beanland, 2005) reportaron que el fitoplasma del enanismo arbustivo del maíz tuvo un menor efecto deletéreo en su vector primario *B. elimatus* que en su vector secundario *D. maidis*. Además, en el insecto *Scaphoideus titanus* que transmite el fitoplasma causante del síntoma conocido como flavescencia dorada de la vid (FD), se reportó una disminución en la fecundidad de las hembras de dicho insecto expuestas a plantas de haba (*Vicia faba*) e infectadas con el fitoplasma de FD. La disminución de la fecundidad fue sugerida al encontrar, mediante disección de hembras adultas de 42 días de edad y conteo en el microscopio, que el número de huevecillos de insectos adultos expuestos a plantas infectadas con FD y de adultos expuestos a plantas sanas, disminuyó en un 50%,

aproximadamente. Así como en el número de ninfas emergidas por hembra infectada fue de solo 1/3 en comparación con hembras no infectadas por FD (Bressan *et al.*, 2005). Factores ambientales tales como la temperatura, puede también mediar los efectos por la infección de fitoplasmas en su insecto hospedante; así Garcia *et al.*, (1991 citados por Weintraub y Beanland, 2005), reportaron que la infección de la enfermedad X puede ser deletérea hacia el vector *Paraphlepsius irroratus* a bajas temperaturas pero no a rangos de 25 a 30°C.

Aquellos fitoplasmas que reducen la aptitud de sus insectos hospedantes podrían haber tenido una corta relación evolutiva con esas especies de insectos, como selección podría reducir los efectos deletéreos en insectos hospedantes (Weintraub y Beanland, 2005). Solo aquellos fitoplasmas que no matan sus hospedantes podrían sobrevivir para ser inoculados en una planta hospedante y subsecuentemente ser adquirido por otro vector (Weintraub y Beanland, 2005).

Reportes recientes han propuesto que los fitoplasmas, inicialmente estuvieron solamente asociados con insectos; ya que los primeros tienden a causar daños en sus plantas hospedantes, mientras que en los insectos hospedantes generalmente no causan síntomas y por el contrario en algunos casos, extiende el periodo de vida del insecto e incrementa el número de huevecillos (Beanland *et al.*, 2000). Los fitoplasmas pueden infectar muchos órganos y tejidos diferentes de los insectos, incluyendo glándulas salivales, intestino, hemolinfa, ovarios, y testículos, entre otros; pero en plantas, sólo infectan tejidos del floema, los fitoplasmas son transmitidos a la siguiente generación transovaricamente, aunque hasta la fecha son pocos los casos reportados, mientras que en plantas no se conoce la transmisión por semilla (Nishigawa *et al.*, 2002; Kawakita *et al.*, 2000; Weintraub y Beanland, 2005).

La transmisión de los fitoplasmas por insectos vectores es de forma persistente propagativa (Tedeschi y Alma, 2004). Una vez que el insecto vector se alimenta de una planta enferma adquiere el fitoplasma por el canal alimenticio; a su vez, el fitoplasma puede pasar intracelularmente a través de las células epiteliales del intestino medio y se replica dentro de una vesícula, o bien pasar entre dos capas de células (intestino medio y membrana basal) para entrar al hemocele (Lefol *et al.*, 1994 citados por Weintraub y Beanland, 2005). Los fitoplasmas circulan en la hemolinfa,

donde ellos podrían infectar y reproducirse en otros tejidos tales como túbulos de malpigio, cuerpos grasos, cerebro y órganos reproductivos; p.e., el fitoplasma de la flavescencia dorado adquirido de haba infectada se une fuertemente a los tejidos del tracto alimenticio, hemolinfa y glándulas salivales, pero no a músculos o a órganos genitales de sus insectos hospedantes, *Scaphoideus titanus* y *Euscelidius variegatus* Lefol *et al.*, (1994 citados por Weintraub y Beanland, 2005). Los factores moleculares relacionados al movimiento de fitoplasmas a través de los varios tejidos del insecto son aún desconocidos; sin embargo Oshima *et al.*, (2004) desarrollaron a un fitoplasma mutante del amarillamiento de la cebolla que no es transmitido por insectos cicadelidos y cuyo genoma (870 Kpb) es más pequeño que el fitoplasma OY tipo silvestre (1,000 Kpb) del cual se originó, sugiriendo que los mecanismos de unión a las células de los insectos se perdieron. Suzuki *et al.*, (2006) reportó que la proteína membranal de la superficie celular de los fitoplasmas, llamada proteína antigénica de membrana (Amp), forma un complejo con tres proteínas de insectos (actina y cadenas pesada y ligera de miosina), los complejos, Amp-microfilamentos, fueron detectados en todas las especies de cicadelidos que transmiten fitoplasmas, pero no en los cicadelidos que no transmiten OY, sugiriendo que la formación del complejo esta correlacionado con la capacidad de los cicadelidos para transmitir fitoplasmas; así, el fitoplasma OY fue localizado en los microfilamentos del músculo visceral liso alrededor del tracto intestinal de los insectos.

Los fitoplasmas para ser transmitidos a la planta, deben penetrar células específicas de las glándulas salivales y deben acumularse altos niveles en las células acinar posterior de las glándulas salivales antes de que éstos puedan ser transmitidos. Tan solo en las glándulas salivales hay tres barreras que los patógenos deben sobrepasar antes que puedan ser expulsados con la saliva: la lámina basal, el plasmalema basal y el plasmalema apical. Los insectos cicadelidos pueden estar infectados con un fitoplasma y aún así, ser incapaces de transmitirlo a plantas sanas; quizás debido a la barrera de las glándulas salivales (Wayadande *et al.*, 1997 citados por Weintraub y Beanland, 2005).

La retención de la infección en los insectos vectores después de la muda, es evidencia de que el patógeno se mueve hacia el intestino medio; el cual no es perdido

durante la muda, por esta razón la infección es retenida por todo el tiempo de vida del insecto (Tedeschi y Alma, 2004).

El ciclo de transmisión de los fitoplasmas depende del ciclo de vida (monovoltino, multivoltino) y etología (monófago, polífago) de sus insectos vectores; los vectores polífagos tienen el potencial para inocular un amplio rango de especies de plantas, dependiendo de la resistencia a la infección de cada planta hospedante. Varios estudios han demostrado que los insectos que normalmente no se alimentan de ciertas especies de plantas pueden adquirir y transmitir fitoplasmas a esas plantas en condiciones de laboratorio. Así, en muchos casos, el rango de hospedantes de un vector limita la dispersión de los fitoplasmas por esas especies; más que por la carencia de receptores celulares de la membrana, específicos para fitoplasmas. Por ejemplo, los cicadelidos *Euscelidius variegatus*, *Macrosteles quadripunctulatus*, y *Euscelis incisus* son capaces de adquirir y transmitir el fitoplasma del amarillamiento del crisantemo, *Chrysanthemum yellows* (CY) de plantas de crisantemo infectadas a plantas de sanas de la misma especie; sin embargo, solamente *M. quadripunctulatus* y *E. variegatus* adquieren a CY de vinca infectada con CY y lo transmiten a plantas no infectadas Bosco *et al.*, (1997 citados por Weintaub y Beanland, 2005). Por otro lado, ninguno de los cicadelidos adquiere el fitoplasma de plantas de apio infectado con CY, para este fenómeno se ha propuesto el término muerte-final del hospedante (dead-end host), el cual se refiere a plantas que pueden ser inoculadas y subsecuentemente llegar a estar infectadas, pero en las cuales los fitoplasmas no pueden ser adquiridos por los insectos al alimentarse de dichas plantas (Weintraub y Beanland, 2005).

Los síntomas de fitoplasmas están correlacionados con desbalances hormonales Pecho y Vizarova, (1990 citados por Weintraub y Beanland, 2005) y alteraciones en la translocación de carbohidratos y amino ácidos en las plantas (Lepka *et al.*, 1999); por lo tanto, la infección se manifiesta sistémicamente pero los fitoplasmas podrían no estar presentes en los tejidos sintomáticos (Weintraub y Beanland, 2005). Alternativamente, los desbalances bioquímicos causados por la infección de fitoplasmas podrían impedir la adquisición de fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2005).

2.3.1. Factores involucrados en la transmisión de fitoplasmas por el insecto vector

Uno de los factores involucrados en la capacidad de transmitir fitoplasmas por el insecto vector es el género, hembras o machos, así como la edad de los mismos (instares ninfales o adultos recién emergidos o maduros). Durante años los investigadores han encontrado que géneros de cicadelidos pueden influenciar la adquisición y transmisión de fitoplasmas Chapman, 1949; Chiykowski y Sinha, 1970; Swenson, 1971, (citados por Weintraub y Beanland, 2005). Hembras de *M. quadrilineatus* fueron más eficientes en la transmisión de AY a lechuga que los machos; aunque tal vez, tanto hembras como machos podrían haber transmitido fitoplasmas en igual porcentaje si ambos hubiesen sido analizados en edad adulta (Beanland *et al.*, 2000). Por otro lado, altos títulos de fitoplasmas han sido observados en las glándulas salivales de machos de *E. variegatus* en edad temprana, en comparación a las hembras (Lefol *et al.*, 1994 citados por Weintraub y Beanland, 2005). Asimismo, otro factor que influye en la capacidad de transmisión del vector es la edad del insecto; ninfas recién emergidas de *E. variegatus* no adquieren CY con la misma eficiencia que ninfas de quinto instar (Palermo *et al.*, 2001 citados por Weintraub y Beanland, 2005), y en algunos casos, la transmisión es incrementada cuando los fitoplasmas son adquiridos por ninfas, mas que cuando son adquiridos por adultos Moya y Nault, 1998; Murrall *et al.*, 1996 (citados por Weintraub y Beanland, 2005). Las diferencias en comportamiento entre insectos vectores machos y hembras puede ser una razón para explicar las diferencias observadas entre los géneros y puede afectar la dinámica o distribución de la enfermedad ya que los machos se mueven alrededor de y entre planta y planta en busca de las hembras Hunt *et al.*, (1993 citados por Weintraub y Beanland, 2005).

El linaje del fitoplasma y las condiciones ambientales son también factores que podrían interactuar con la edad del vector en la capacidad de los cicadelidos para transmitir fitoplasmas Murrall *et al.*, (1996 citados por Weintraub y Beanland, 2005).

2.3.2. Adquisición y transmisión de fitoplasmas

Los insectos que se alimentan del floema adquieren pasivamente los fitoplasmas al alimentarse de este tejido en plantas infectadas; el tiempo de alimentación necesario para adquirir un título suficiente de fitoplasmas es el periodo de adquisición, el cual puede ser tan corto como unos pocos minutos pero generalmente es medido en horas. Para el caso de flavescencia dorada, transmitido por *S. titanus*, el período de adquisición es de 13 días con una eficiencia de adquisición del 91.4%, 96/105 (Bressan *et al.*, 2005); mientras que el periodo de incubación o de latencia es el tiempo transcurrido desde la adquisición inicial hasta que el insecto es capaz de transmitir los fitoplasmas; el cual es dependiente de la temperatura y dura de pocos hasta 80 días (Weintraub y Beanland, 2005). El periodo de latencia se ha determinado solo para algunos casos: p. e., para *Aphrodes bicinctus*, es de 1 a 2 meses; mientras que en el caso de *Euscelis plebeja* y *Scaphoideus titanus*, es de solo un mes y para *Hyaletthes obsoletus* solo necesita de 2 a 7 días (Cousin y Boudon, 2002).

2.3.3. Familias reportadas con especies vectoras de fitoplasmas

Los insectos vectores conocidos hasta la fecha, pertenecen al orden hemiptera, caracterizados por el tipo de aparato bucal, el cual es del tipo perforador-chupador, que les permite llegar hasta el floema de las plantas, de donde toman su alimento, y en consecuencia los hace aptos para adquirir los fitoplasmas en caso de que la planta se encuentre infectada con estos organismos. Según el tipo de transmisión que se da entre los insectos vectores y fitoplasmas, se conocen dos tipos de ésta: transestadial en la mayoría de las interacciones fitoplasma con su respectivo insecto vector, y transovarial, solo para algunos casos conocidos.

La familia con más especies conocidas es sin lugar a dudas Cicadellidae (15,000 especies descritas, ~ 25,000 especies); en la cual se encuentran 88 especies conocidas por su capacidad de transmitir fitoplasmas (Cuadro 4). En solo cuatro especies de esta familia se ha determinado el tipo de transmisión transovarial: ***Hishimonoides sellatiformis*** que transmite el enanismo de la mora (Mulberry Dwarf), donde los fitoplasmas fueron observados mediante microscopia electronica en

ovarios y otros tejidos del insecto, así como en huevecillos puestos en los retoños de plantas de mora y ninfas recién emergidas de dichos huevecillos (Kawakita *et al.*, 2000). **Macrosteles fascifrons**: amarillamientos del áster, (Aster Yellows); **Matsumuratettix hiroglyphicus**: hoja blanca de la caña de azúcar, Sugarcane White Leaf, (Hanboonsong *et al.*, 2002) y **Scaphoideus titanus** Ball: que transmite amarillamiento del áster y flavescencia dorada de la vid (Alma *et al.*, 1997; Bressan *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Insectos vectores de fitoplasmas de la familia Cicadellidae.

Especie	Fitoplasma o enfermedad	Hospedante
<i>Acinopterus angulatus</i>	Aster yellows (16SrI-B) Western X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso Varias familias
<i>Alebroides nigroscutellatus</i>	Potato purple top roll (16SrIII-B)	Papa
<i>Allygidius atomarius</i>	Elm yellows	<i>Ulmus</i> spp.
<i>Amrasca devastans</i>	Eggplant little leaf	Solanáceas
<i>Anaceratagallia</i> sp.	European stone fruit yellows	Albaricoque y ciruelo
<i>Anaceratagallia laevis</i>	Aster yellows Flavescencia dorée	Vid Vid, <i>Gazania nivea</i> , Maleza
<i>Aphrodes albifrons</i>	Phyllody	<i>Artemisia vulgaris</i>
<i>Aphrodes bicincta</i>	Aster yellows y European aster yellows Clover phyllody, Clover yellow edge Strawberry green petal	Varias familias Trébol Fresa
<i>Arawa variegata</i>	Strawberry lethal yellows	Fresa
<i>Austroagallia avicula</i>	Witches' broom (OmanAlfWB)	Alfalfa
<i>Austroagallia sinuata</i>	Aster yellows	
<i>Austroagallia torrida</i>	Rugose leaf curl	
<i>Batrachomorphus punctatus</i>	Tomato big bud (16SrVI-A)	Vegetales
<i>Cechenotettix quadrinotatus</i> (= <i>martini</i>)	Stolbur Yellow decline	Híbridos Lavandula
<i>Circulifer haematoceps</i>	Aster yellows Sesamum phyllody Stolbur	Sesame
<i>C. tenellus</i>	Beet leafhopper-transmitted virescence disease Tomato big bud (16SrVI-A) Purple top disease (16SrV-16SrIX)	Vegetales Papa <i>Limonium</i> spp.
<i>Coelidia indica</i>	Sandal spike	Sandal wood
<i>Colladonus clitellarius</i>	Eastern X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso
<i>Colladonus geminatus</i> y <i>C. montanus</i>	Aster yellows Western X-disease	Varias familias Árboles frutales de hueso

Continuación...

Espece	Fitoplasma o enfermedad	Hospedante	
<i>Dalbulus maidis</i> , <i>D. elimatus</i> , <i>D. gelbus</i> , y <i>D. guevari</i>	Maize bushy stunt	Maíz	
<i>Deltocephalus flavicosta</i>	Phyllody	Palma	
<i>Deltocephalus vulgaris</i> .	Sugarcane grassy shoot disease	Caña de azúcar	
<i>Dryodurades</i> sp.	Aster yellows	Vid	
<i>Empoasca decedens</i>	European stone fruit yellows	Albaricoque y ciruelo	
<i>Empoasca papayae</i>	Bunchy top disease of papaya	Papaya	
<i>Euscelidius variegatus</i>	Aster yellows	Varias familias	
	Chrysanthemum yellows (16SrI-B)	Flores	
	Flavescence dorée (16SrV-C)	Vid	
	Italian clover phyllody	Trébol	
	Western X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso	
	European stone fruit yellows	Árboles frutales de hueso	
	Chrysanthemum yellows	Flores	
<i>Euscelis</i> sp.	European stone fruit yellows	Árboles frutales de hueso	
	<i>Euscelis lineolatus</i>	Chrysanthemum yellows	Flores
	Clover phyllody (16SrI-C)	Trébol	
	Green petal disease (16SrI-C)	Fresa	
<i>E. incisus</i> (=plebeja)	Aster yellows, Chrysanthemum yellows (16SrI-B) y Flavescence dorée		
	Rape phyllody	<i>Rubus</i> spp.	
	Stolbur (16SrXII-A)	Solanáceas	
	Clover witches'-broom (16SrVI)	Trébol blanco	
	Strawberry green petal	Fresa	
	Cabbage witches'-broom	Escoba de bruja de la col	
	Aster yellows (16SrI)	Apio	
	16SrV-16SrIX	<i>Limonium</i> spp.	
<i>Fiebertiella florii</i>	Apple proliferation	Manzano y árboles frutales de hueso	
	Aster yellows	Varias familias	
	Western-X y Eastern-X	Árboles frutales de hueso	
<i>Goniagnathus guttulinervis</i>	Stolbur 16SrXII-A	Vid	
<i>Graminella nigrifrons</i>	Maize bushy stunt	Maíz	
<i>Gyponana lamina</i>	AYP		
	Eastern X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso	
<i>Hishimonoides chinensi</i>	Jujube witches'-broom (16SrV-B)	Árbol chino del jujube	
<i>Hishimonoides sellatiformis</i>	Mulberry dwarf (16SrI-B)	Mora	
<i>H. phycitis</i>	Eggplant little leaf	Berenjena	
<i>Hishimonus concavus</i>	Loofah witches' broom	Loofah	
<i>Hishimonus sellatus</i>	Cryptotaenia japonica witches' broom	Cryptotaenia japonica	
	Jujube witches' broom Candidatus Phytoplasma Ziziphi	<i>Ziziphus jujuba</i>	
	Mulberry dwarf/Sr16I-B	Mora	
	Small leaf curl		
	Rhus yellows	<i>Rhus javanica</i>	
	Onion yellows		

Continuación...

Espece	Fitoplasma o enfermedad	Hospedante
<i>Hyalestes obsoletus</i>	Bois Noir (16SrXII-A), Grapevine yellows Vergilbungskrankheit (16SrXII-A) Stolbur (16SrXII-A)	Vid Solanáceas
<i>Loepotettix diluitor</i>	Stolbur	Zárza, trébol
<i>Macropsis fuscula</i> , <i>M. scotti</i>	Stunt	<i>Rubus</i> spp.
<i>Macropsis mendaz</i>	Elm yellows (16Sr V)	<i>Ulmus</i> sp.
<i>M. trimaculata</i>	Peach yellows	<i>Prunus</i> spp.
<i>Macrosteles cristata</i>	Clover phyllody (16SrI-C) Clover dwarf (16SrIII-B)	Varias familias Vegetales
<i>Macrosteles laevis</i>	Clover dwarf (16SrIII-B), Clover phyllody (16SrI-C) y European aster yellows (16SrI-B) Stolbur (16SrXII-A)	Varias familias Jitomate, papa
<i>Macrosteles quadrilineatus</i> (= <i>fascifrons</i>)	American aster yellows (16SrI-A), European aster yellows (16SrI-B), Clover phyllody, Clover proliferation	Vegetales
<i>Macrosteles quadripunctulatus</i>	Chrysanthemum yellows Stolbur y Western X Kok-saghyz yellows	Crisantemo Vid
<i>Macrosteles severini</i>	Aster yellows	Varias familias
<i>Macrosteles sexnotatus</i>	Lissers Aster yellows	Jacinto, gladiolo Flores
<i>Macrosteles striifrons</i>	Anemone witches' broom Eggplant dwarf, Garland chrysanthemum witches' broom, Marguerite yellows y Onion yellows Misuba witches' broom Tomato yellows	Varias familias Solanáceas Crisantemo Japanese honewort Solanáceas
<i>M. viridigriseus</i>	Clover phyllody (16SrI-C) y Clover witches' broom	Trébol
<i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i>	Sugarcane white leaf (16SrXI-B)	Caña de azúcar
<i>Megophthalmus scabripennis</i>	Aster yellows	Vid
<i>Mocydia crocea</i>	Flavescence dorée	Vid
<i>Neocalitrus fenestratus</i>	Aster yellows Phyllody Stolbur	 Compositae Vid
<i>Neocalitrus</i> spp.	Western X	Vid
<i>Nephotettix cincticeps</i> , <i>N. virescens</i>	Rice yellow dwarf (16SrXI-A) Candidatus Phytoplasma Oryzae'	Arroz
<i>Nesophrosyne orientalis</i>	Witches' broom	Fríjol, cacahuete
<i>Norvellina seminuda</i>	Eastern X disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso
<i>Ollarianus balli</i>	Rhynchosia little leaf disease	Chícharo, maleza
<i>Oncopsis alni</i>	Alder yellows	<i>Alnus glutinosa</i>

Continuación...

Espece	Fitoplasma o enfermedad	Hospedante
<i>Orosius orientalis (albicinctus)</i>	Lucerne witches'-broom	Alfalfa
	Flavescence dorée	Vid
	Purple top	Solanáceas
	Sesamum phyllody disease	Varias familias
	Western X	Árboles frutales de hueso
	16SrV-16SrIX	<i>Limonium</i> spp.
<i>Orosius argentatus</i>	Lucerne witches'-broom	Alfalfa
	Legume little leaf	Legumbres
	Tomato big bud y Potato purple top wilt	Solanáceas
	Tobacco virescence,	Tabaco
<i>Osbornellus borealis</i>	Western X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso
<i>Paraphlepsius irroratus</i>	Ash yellows	<i>Fraxinus</i> spp.
	Clover phyllody	
	Eastern X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso
<i>Philaenus spumarius</i>	Ash yellows	<i>Fraxinus</i> spp.
<i>Psammotettix striatus</i>	Grapevine yellows	Vid
<i>Recilia dorsalis</i>	Rice orange leaf	Arroz
<i>Recilia hospes</i>	Strawberry lethal yellows	Fresa
<i>R. mica</i>	Blast disease	Palma
<i>Scaphoideus luteolus</i>	American elm yellows	<i>Ulmus</i> spp.
<i>Scaphoideus</i> spp.	Ash yellows, Prunus X	<i>Fraxinus</i> spp.
<i>Scaphoideus titanus</i>	Aster yellows	Varias familias
	Chrysanthemum yellows	Crisantemo
	Flavescence dorée	Vid
<i>Scaphytopius acutus</i>	Aster yellows, Clover phyllody	
	Eastern X disease	Árboles frutales de hueso
	Peach X, Prunus X	<i>Prunus</i> spp.
	Soybean bud proliferation	Soya
<i>S. delongi, S. nitridus</i>	Western X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso, apio
<i>S. diutius</i>	Western X-disease (16SrIII-A)	Árboles frutales de hueso
<i>S. fuliginosus</i>	Machismo disease	Legumbres
<i>S. irroratus</i>	Western aster yellows	Apio
<i>S. magdalensis</i>	Blueberry stunt (16SrI-E)	<i>Rhus</i> spp.
<i>Scleroracus flavopictus</i>	Gentian witches' broom (16SrIII-B)	<i>Gentiana</i> spp.
	Potato purple top (16SrIII-B)	Solanáceas
	Tsuwabuki witches' broom	<i>Farfugium japonicum</i>

Fuente: Weintraub y Beanland, 2005.

Otros vectores de fitoplasmas ubicados en otras familias son: en la Cixiidae *Haplaxius (Myndus) crudus* Van Duzee que transmite de forma transovarial el fitoplasma del amarillamiento letal (Lethal Yellowing), *Hyalesthes obsoletus* al Bois Noir, Stolbur, Vergilbungskrankheit/16SrXII-A, *Pentastiridius leporinusa* al Stolbur, *P. beieri* al

stolbur de la remolacha azucarera (Stolbur Sugar Beet), *P. leporinus* al Southern stolbur/16SrXII-A, *Cixius wagneri* al Candidatus Phlomobacter Fragariae, *Oliarus atkinsoni* al amarillamiento de la hoja del formio (Phormium Yellow Leaf); en Cercopidae *Philaenus spumarius* que transmite al amarillamientos del olmo (Elm Yellows); en Delphacidae, *Eumetopina flavipes* transmisor de la enfermedad del achaparramiento de la caña de azúcar en Ramu (Ramu Stunt Disease of Sugarcane [SCRS]), *Javesella discolor* al Pseudoclassic stolbur, *Nilaparvata lugens* a un fitoplasma aún sin nombrar, y *Saccharosydne saccharivora* al sugarcane yellow leaf syndrome (Arocha *et al.*, 2005); en Derbidae, *Proutista moesta* vector de la enfermedad de la hoja amarilla de la palma areca (Yellow Leaf Disease of Areca Palms), y de la enfermedad de la raíz del cocotero (Coconut Root Wilt Disease); en Flatidae, *Metcalfa pruinosa* que transmite AY; en Menoplidae, (*Meenoplus* spp. transmisor del amarillamiento letal (Lethal Disease); y en Psyllidae, *Bactericera trigonica* vector de Stolbur, *Cacopsylla melanoneura* Förster que transmite en forma transovarial el fitoplasma de la proliferación del manzano (AP), en el que se ha encontrado una eficiencia de transmisión baja; instares jóvenes presentaron una eficiencia de 16.7%, mientras que para los adultos fue de 12.5% (Tedeschi y Alma, 2004). *C. picta* transmisor de AP, *C. pruna* vector del enrollamiento de la hoja clorótica del albaricoque (Apricot Chlorotic Leaf Roll), *C. pyri*, *C. pyrisuga*, *C. pyricola*, *C. bidens*, *C. notata* y *C. pruni* transmisores del amarillamiento europeo de frutales de hueso ESFY. Tedeschi *et al.*, (2006) reportaron la detección del fitoplasma ESFY en huevecillos (3/18), ninfas (3/16) y adultos (3/25) de *C. pruni* mantenidos en tubos de cristal; lo cual sustenta la existencia de transmisión transovarial de dicho fitoplasma. *Psylla qianli* del declinamiento del peral (Pear Decline). En esta familia de insectos es característico que los fitoplasmas que transmiten son de genomas pequeños (Tedeschi y Alma, 2004). En la familia Pentatomidae *Halyomorpha halys* puede transmitir fitoplasmas que provocan el síntoma de escoba de bruja en árboles del género *Paulownia* (Hiruki ,1999 citado por Weintraub y Beanland, 2005); en la Tingidae *Stephanitis typica* trasmite al fitoplasma que produce pudrición de la raíz (root wilt), en plantas de palma de coco Mathen *et al.*, (1990 citados por Weintraub y Beanland, 2005).

2.4. *Bactericera cockerelli*

Descrito por Sulc en Colorado, EEUU, en 1909, con por lo menos 20 familias de plantas hospedantes; sin embargo las económicamente importantes y preferidas por el insecto son solanáceas dentro de las cuales destaca la papa (*Solanum tuberosum*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*), tomate (*Physalis ixocarpa*), chile (*Capsicum annum*) y berenjena (*Solanum melongena*). Entre las especies de maleza identificadas como hospedantes del insecto se encuentran: *Solanum nigrum*, *Amaranthus* spp., *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis* (Pavlista, 2002; Liu y Trumble, 2004).

En México *B. cockerelli* es considerado como vector de fitoplasmas en el cultivo de papa y jitomate (Garzón *et al.*, 1986; Garzón *et al.*, 2005; Bujanos, 2006 comunicación personal; Bayer CropScience, 2005); sin embargo, en Norteamérica (Estados Unidos y Sur de Canadá), lo consideran responsable del desbalance fisiológico conocido como “psyllid yellows”, debido a que las plantas afectadas por este insecto presentan un amarillamiento y disminución del crecimiento; se sugiere que este desorden es debido a que el insecto inyecta una toxina (Daniels, 1954; Trumble, 2005; Schall, 1938) aunque hasta la fecha no se ha aislado y mucho menos se conoce su naturaleza química.

Richards, en 1928 reportó y describió los síntomas de amarillamiento ocasionados por el insecto en el cultivo de papa. Posteriormente, Knowlton y James en 1931 describieron su biología, la cual consiste de tres estados de desarrollo: huevecillo, cinco instares ninfales y el adulto, completando su ciclo de vida en aproximadamente 30 días.

De manera natural, la mayor mortalidad de *B. cockerelli* se presenta entre los primeros tres estadios ninfales; sin embargo está se incrementa a medida que la temperatura aumenta, a 38°C, causa la deshidratación de los huevecillos y muerte de ninfas; mientras que a 40°C es letal para cualquier etapa de desarrollo del insecto (Marín *et al.*, 1995). Dos horas a 37.8°C (100°F) son letales para huevecillos y ninfas; temperaturas arriba de 32.2°C (90°F), pueden causar esterilidad temporal, reducir o cesar la ovipostura, así como la eclosión y sobrevivencia de las ninfas. De ahí que los psílidos prevalezcan en altitudes por arriba de los 1700 msnm (Trumble, 2005).

List, (1939) reportó que la oviposición es reducida a 32°C, mientras 37.7°C es letal a huevecillos, ninfas y hembras, y la ovipostura es inhibida.

Marín *et al.*, (1995) al probar cuatro diferentes temperaturas (16.0, 19.57, 25.9 y 29.0 °C) para determinar la temperatura base, y las unidades calor requeridas para completar su ciclo de vida, encontraron que la mayor mortalidad de huevecillos ocurrió a 19.57°C, para ninfas de primer estadio a 25.9°C, para segundo y tercer estadio a 16°C, mientras que para los estadios ninfales cuarto y quinto hubo pocos problemas de mortalidad presentándose solamente a 29°C. En los adultos la tasa de mortalidad fue nula a las temperaturas ensayadas.

Se menciona que *B. cockerelli* es uno de los insectos plaga más destructivos para el cultivo de la papa y tomate debido a la inyección de saliva toxica en el proceso de alimentación (Cranshaw, 1999). Los síntomas incluyen una decoloración foliar, amarillamiento, entrenudos cortos, y nudos engrosados, ocasionalmente pueden formarse tubérculos aéreos en los nudos. Las hojas jóvenes pueden tener una pigmentación púrpura (antocianinas) y en algunos casos las nervaduras pueden mostrar esta coloración en hojas maduras, los brotes nuevos desarrollan lentamente y las plantas pueden detener su crecimiento y senescer prematuramente (Cranshaw, 1999; Pavlista, 2002).

Los efectos de la toxina en tubérculos y frutos son particularmente dramáticos; los tubérculos disminuyen su tasa de crecimiento, muestran una cutícula áspera, textura flácida, necrosis interna y pérdida de la dormancia; resultando en una brotación prematura. Los brotes son delgados y muy débiles (Cranshaw, 1999; Pavlista, 2002). El efecto primario en jitomate consiste en disminución de tasa de crecimiento de frutos, detención de la maduración y una textura harinosa, y amarillamiento de la nervadura central y bordes de la hoja (Cranshaw, 1999).

De manera general se menciona que las ninfas son las causantes de los problemas en las plantas, mientras los adultos no ocasionan daño (Eyer, 1937 citado por Kikushima, 2005; Ferguson y Fraser, 2003). Carter, (1950) encontró que no todas las ninfas tienen la capacidad de producir la reacción tóxica y Daniels, (1954) reportó que plántulas de jitomate expuestas a adultos manifestaron una reacción toxica. Blood, (1933) menciona que 30 ninfas por planta pueden causar los síntomas antes

descritos. Por otro lado Ferguson y Fraser, (2003) refieren que solo tres a cuatro ninfas por planta son suficientes para ocasionar los síntomas de la enfermedad. La ocurrencia de la toxina en las ninfas es irregular, pareciera un rasgo heredado, así, la presencia de ninfas no necesariamente se relaciona con el desarrollo de síntomas de “psyllid yellows”.

Los síntomas usualmente se manifiestan al cabo de 2 a 3 semanas, aunque con infestaciones altas éstos pueden aparecer 4 ó 5 días después (Daniels, 1954). En contraste, Carter, (1950) reportó que síntomas de psyllid yellows pueden ser obtenidos en plántulas de jitomate en sólo 2 horas y 6 horas cuando una sola ninfa es la que se alimentaba. Liu *et al.*, (2006b) encontraron diferencias en la respuesta de dos cultivares de jitomate (“QualiT 21” y “Yellow Pear”), expuestos a diferentes densidades de insectos (0, 20, 30, 40 y 50 ninfas por planta) y tres periodos de alimentación (5, 10 días y todo el tiempo de vida); en el primer cultivar, las plantas fueron irreparablemente dañadas por densidades de 20 ninfas alimentándose por solo 5 días, mientras que plantas de “Yellow Pear” se recuperaron cuando 40 ninfas se alimentaron por un periodo de 10 días.

El grado de daño, así como la expresión foliar de síntomas depende de la cantidad de toxina, relacionada con el grado de infestación del insecto, su virulencia, el estado de crecimiento de la planta y factores ambientales. Las altas intensidades luminosas y periodos largos de luz solar incrementan la expresión de los síntomas así como también el desarrollo de la planta en suelos alcalinos, una abundante irrigación, plantas infectadas por hongos o bien con el sistema de raíces y tallos dañados (Schall, 1938).

Se ha sugerido la existencia de variabilidad entre cultivares para explicar las diferencias en susceptibilidad y expresión de síntomas; pero quizás las diferencias están más relacionadas con el tipo de madurez estacional, es decir relacionado con la fenología de la planta y la época del año en la cual se encuentra establecido el cultivo (Pavlista, 2002). Se ha observado que diferentes cultivares de una misma especie (*L. esculentum*), infestados con *B. cockerelli* y tratados con insecticidas a nivel laboratorio, muestran una diferencia en lo que se refiere a la tasa de desarrollo del insecto; así como a los niveles de mortalidad de los primeros instares ninfales;

posiblemente debido a los mecanismos de defensa de los diferentes cultivares (Liu y Trumble, 2005).

Respecto a las pérdidas en producción provocadas por efecto de *B. cockerelli*, Liu *et al.*, (2006a) reportaron pérdidas por arriba del 50% en tomate fresco para el mercado en California, USA y Baja California, México. Asimismo, Liu y Trumble, (2004) reportaron que durante el año 2001, en Baja California, México; más del 85% de plantas de jitomate adultas fueron destruidas; consecuentemente, hubo pérdida en la producción. Albernathy, (1991) menciona pérdidas en rendimiento del 40% en 8 variedades de jitomate. Sin embargo es importante mencionar que dichas pérdidas no se han dimensionado a nivel de superficie.

En México Garzón *et al.*, (1986; 2005) reportaron dos nuevos problemas en jitomate, uno denominado “permanente del tomate” relacionado con el insecto *B. cockerelli* como vector; los síntomas de la enfermedad son: clorosis de brotes apicales, los folíolos tienden a ser lanceolados y con epinastia, necrosis, aborto de flores, hojas maduras quebradizas y enrolladas hacia el haz y disminución del crecimiento. El “declinamiento del tomate” es el otro problema de etiología desconocida, pero cuyos síntomas coinciden con los descritos para el permanente. El declinamiento también ha sido reportado en el Valle Imperial en Estados Unidos. Por otro lado, se menciona que el punto crítico de infección se presenta entre la quinta y sexta floración, repercutiendo en la reducción del rendimiento (Garzón *et al.*, 2005).

Recientemente Garzón *et al.*, (2005) reportó que *B. cockerelli*, tiene la capacidad de actuar como vector; se menciona un periodo de adquisición de al menos 15 min y 15 min más para transmitirlo con una eficiencia de 20%; mientras que 40% de eficiencia de transmisión puede ser alcanzado entre 2 y 24 horas de alimentación.

2.5. Geminivirus

Los geminivirus pertenecen a la familia de virus caracterizados por presentar partículas gemelas isométricas de cadena sencilla de ADN, que infectan un amplio rango de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, causando considerables pérdidas en cultivos alimenticios e industriales. Este patógeno amplifica su genoma en el núcleo de las células hospedantes mediante un mecanismo de

replicación en círculo rodante, utilizando como molde una cadena doble de ADN como intermediario para la replicación y transcripción. Los virus de la familia Geminiviridae comprenden cuatro géneros diferenciados por su rango de hospedantes, insectos vectores y la organización de su genoma:

- *Mastrevirus* (subgrupo I); la especie tipo *Maize streak mastrevirus* (MSV), infecta plantas monocotiledóneas, es transmitido por miembros de la familia Cicadellidae y posee un genoma típicamente monopartita.
- *Curtovirus* (subgrupo II); con la especie tipo *Beet curly top curtovirus* (BCTV), infecta dicotiledóneas, es transmitido por cicadelidos y su genoma es monopartita.
- *Begomovirus* (subgrupo III); la especie tipo es *Bean golden mosaic begomovirus*, infecta dicotiledóneas, es transmitido por mosca blanca y su genoma es monopartita o bipartita.
- *Topocuvirus* (subgrupo IV); cuya especie tipo es *Tomato pseudo curly-top virus* (TPCTV), infecta dicotiledóneas y su genoma es monopartita (Delatte *et al.*, 2005; Fauquet y Stanley, 2005; Morales y Anderson, 2001; Polston y Anderson 1997).

De ellos los geminivirus, transmitidos por mosca blanca (género Begomovirus) son el grupo más numeroso con más de 100 especies de virus identificados hasta la fecha (Mazhar *et al.*, 2005). Los begomovirus bipartitas son los causantes de la mayoría de las enfermedades, aunque un número creciente de enfermedades del viejo mundo se relacionan con begomovirus monopartitas en asociación con un componente satélite esencial (ADN-beta) descubierto recientemente, cuya presencia en algunos virus es esencial para la inducción de síntomas (Cui *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005). El componente genómico ADN-A codifica las funciones necesarias para la replicación viral y encapsidación, mientras los genes del componente ADN-B son requeridos para el movimiento viral en las plantas hospedantes (Lazarowitz, 1992).

En México, se han reportado varios virus ocasionando enfermedades en el jitomate: virus mosaico del tabaco (TMV), virus marchitez manchada del tomate (TSWV), virus enanismo arbustivo del tomate (TBSV), virus huasteco del chile (PHV), virus moteado del tomate (ToMoV), virus mosaico del pepino (CMV), virus mosaico de la alfalfa

(AMV), virus jaspeado del tabaco (TEV), virus Y de la papa (PVY), virus mancha anular del tabaco (TRSV) (De la Torre, 1996; Ochoa, 2005; Rubio, 2001). Mientras que los geminivirus presentes en el país son el begomovirus del enrollamiento de la hoja del tomate variante Sinaloa (Tomato leaf curl Sinaloa begomovirus, ToLCSinV), el virus del chino del tomate variante La Paz (Tomato chino La Paz virus, ToChLPV); Tomato leaf crumple virus, Sida golden mosaic virus, Tomato yellow leaf curl begomovirus (TYLCV), Pepper golden mosaic virus, Serrano golden mosaic virus (SGMV), Tomato golden mosaic virus (TGMV) (Ascencio, 1999; Brown y Nelson, 1988; Brown y Poulos, 1990; Brown *et al.*, 1993; Fauquet y Stanley, 2005; Holguín *et al.*, 2004; Holguín *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Detección de fitoplasmas mediante injertos, microscopía electrónica y de fluorescencia (DAPI), y PCR

Colecta de material vegetal, injertos y pruebas de diagnóstico

La colecta de material vegetal de jitomate se realizó en diferentes zonas productoras de jitomate del país: Zayula, Jalisco; Tlayacapan y Zacatepec, Morelos; Chapingo, Montecillo, Texcoco e Ixtlahuaca en el Estado de México.

Del material vegetal de jitomate colectado en Sayula, Jalisco, se injertaron 20 plantas; 10 de jitomate y 10 de *Catharanthus roseus*. Del colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, se realizaron 11 y 13 injertos en jitomate, respectivamente; mientras que del tejido vegetal colectado en Ixtlahuaca se injertaron 10 plantas de jitomate y ocho plantas de *Catharanthus roseus*.

Se tomaron cinco de las plantas colectadas en Sayula, Jalisco y cinco de las colectadas en Ixtlahuaca, Estado de México, cortes de tallo y pecíolos de estas plantas se fijaron en glutaraldehído 3%, posteriormente fueron teñirlos con el flourocromo DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Las preparaciones se observaron en un microscopio compuesto CARL ZEISS® Mod. Axiolab con lámpara de mercurio y filtro para luz UV. El registro fotográfico de las imágenes se documentó con una cámara digital Cyber Shot mod. DCS P100 de SONY®, adaptada al microscopio compuesto.

Con la finalidad de observar físicamente a los fitoplasmas dentro del tejido hospedante, se realizaron preparaciones para microscopía electrónica de transmisión con tejido de plantas colectadas en Ixtlahuaca, Estado de México y Sayula, Jalisco, que previamente evidenciaron fluorescencia con DAPI.

Para confirmar y determinar la identidad del (los) fitoplasmas se realizaron pruebas de PCR. La extracción de ácidos nucleicos (ADN) se realizó siguiendo los protocolos: Plant DNAzol Reagent (INVITROGEN®), CTAB 3% (Doyle y Doyle, 1990), y el método de extracción de ADN descrito por Ahrens y Seemüller, (1992). Es importante recalcar que debido a su condición de patógenos limitados al floema, el tejido vegetal sometido a extracción de ADN consistió solamente de tallos, nervaduras, pecíolos y pedúnculos.

La cantidad y calidad del ADN extraído se determinaron mediante espectrofotometría (Lambda Bio mod. 10, PERKIN ELMER®) a una absorbancia de 260 nm y por electroforesis en gel, respectivamente.

Se utilizó la técnica de la PCR para detectar la presencia de fitoplasmas en tejido vegetal colectado en las diferentes zonas productoras de esta hortaliza; así como del material injertado y mantenido en invernadero. Se realizaron dos corridas, PCR-directa con los iniciadores P1/P7 y PCR anidado (nested-PCR), con los primers R16F2n/R16R2.

La primera amplificación (PCR-directa) se realizó preparando la siguiente mezcla de reacción: amortiguador de ADN polimerasa amplificasa BIOGENICA® 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatados), primers (20 pmol) P1 (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T -3') y P7 (5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT -3'); los cuales flanquean a nivel del ADN ribosomal (ADNr) entre el gen 16S y 23S, generando un fragmento de aprox. 1,800 pb, 1 U μL^{-1} de ADN polimerasa (amplificasa de BIOGENICA®); 80 ng de ADN total para cada mezcla de reacción y finalmente se ajustó con H₂O destilada estéril a un volumen final de 25 μL . Las muestras se amplificaron en un termociclador automático (GeneAmp PCR System

mod. 2400, PERKIN-ELMER®) con el siguiente ciclaje: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min; 35 ciclos con temperatura de desnaturalización a 94 °C por 1min, alineamiento a 55 °C por 2 min y una extensión a 72 °C por 3 min. Un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. 5 µL del producto de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y corrieron en electroforesis a 90 volts. Una vez finalizada la corrida se procedió a teñirlo con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) por 10 min, para finalmente analizarlo con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador 1Kb (GIBCO BRL®).

Para la PCR-anidada, se diluyó 1 µL del producto de PCR-directa en 30 µL de agua desionizada estéril para utilizar 1 µL de la dilución como templado para la PCR-anidada, utilizando las mismas condiciones antes descritas; con la diferencia del par de primers R16F2n (5'- GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG -3') y R16R2 (5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G -3'), que amplifican un fragmento de aprox. 1,200 pb, correspondiente al espacio intergénico del gen 16S (Lee *et al.*, 1993).

Para determinar el grupo al cual pertenece el fitoplasma detectado, a partir del fragmento amplificado a partir de PCR anidada (iniciadores R16F2n/R16R2) se obtuvieron por digestión los fragmentos polimorficos largos de restricción (RFLP), con las endonucleasas de restricción AluI, HhaI, HpaII, KpnI y MseI (GIBCO BRL®, Beverly, MA). Los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (PROMEGA®) al 2%, especial para fragmentos pequeños, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹), y observados mediante el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). Se utilizó el marcador de peso molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN®). Una vez obtenidos los patrones de restricción se compararon con los ya reportados por Lee *et al.*, (1998b).

La secuenciación de los productos amplificados mediante los primers P1/Tint y purificados con el kit wizard (PROMEGA®), se llevo acabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos, FES-Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Mediante un secuenciador Genetic Analyzer mod. 3100, APPLIED BIOSYSTEM®.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con las disponibles en el GenBank, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La comparación filogenética y los dendogramas respectivos de las secuencias obtenidas se realizó por el método de Clustal W, utilizando el programa DNA Star, Madison, WI (Regenmortel *et al.*, 1997).

3.2. Detección de fitoplasmas en *B. cockerelli*

Insectos (ninfas y adultos), colectados en cantidades suficientes, en Chapingo e Ixtlahuaca en el Estado de México, y en Tlayacapan, Morelos se sometieron a análisis mediante PCR directa y anidada para la detección de fitoplasmas. Las extracciones de ADN se realizaron con grupos de cinco insectos, ninfas y adultos (separados por machos y hembras).

Extracción de ADN de insectos:

Se llevo acabo mediante el método de CTAB 3% (Doyle y Doyle, 1990) y el método de extracción de ADN descrito por Ahrens y Seemüller, (1992).

Análisis por PCR:

El ADN de *B. cockerelli* tanto de ninfas como adultos fue sometido, por separado, a análisis por PCR, para lo cual se realizó PCR-directa con los primers P1/P7 y PCR anidado (nested-PCR), con los primers R16F2n/R16R2, el programa de ciclaje fue igual al descrito para el caso de PCR de fitoplasmas.

También, se realizaron cortes de ninfas y adultos de *B. cockerelli*, con la finalidad de conocer si los adultos tenían el aparato bucal desarrollado o atrofiado; lo cual daría indicios de la capacidad de alimentación de ambos estados del insecto y en consecuencia la habilidad de causar algún tipo de síntoma en la planta hospedante.

3.3. Detección y diagnóstico de virus fitopatógenos

Debido a que en el estado de Morelos, en la literatura, solo se encuentran reportes de la presencia de geminivirus, pero se desconoce su identidad específica, se realizó la colecta de plantas con síntomas putativos a infecciones virales.

Con tejido de las 24 muestras de jitomate colectadas Tlayacapan (11) y en Zacatepec (13), Morelos, a cielo abierto y en condiciones de Bioespacio con riego por goteo, respectivamente (Cuadro 5), se injertaron 24 plantas de jitomate (una planta injertada por muestra colectada). Las plantas de las que se tomó el tejido para injertar, presentaban síntomas diversos como: hojas deformes, con folíolos escasamente crecidos, acortamiento de entrenudos, acompañado de amarillamiento intervenal severo, coloraciones violáceas, necrosamiento, y aborto de flores y frutos.

Cuadro 5. Muestras de plantas de jitomate colectadas en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, las cuales mostraban síntomas atribuibles a virus.

Muestra	Síntoma
1 ^a	Frutos necrosados, hojas ligeramente amarillentas y violáceas
2 ^a	Necrosis de flores y haces vasculares del tallo
3 ^a	Brotes nuevos con folíolos reducidos y amarillentos
4 ^a	Hojas pequeñas y tallo largo
5 ^a	Hojas amarillentas y violáceas y frutos no coloreados
6 ^a	Necrosis de haces vasculares, hojas enchinadas y ampolladas (elevación local de la epidermis por acumulación de fluido)
1 ^b	Flores necrosadas, acortamiento de entrenudos
2 ^b	Hojas amarillentas y violáceas
3 ^b	Lámina foliar escasamente crecida y amarillamiento ligero
4 ^b	Folíolos violáceos, proliferación de brotes

^a = Material vegetal colectado en Zacatepec, Morelos.

^b = Material vegetal colectado en Tlayacapan, Morelos.

Las muestras de tejido se analizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del programa de Fitopatología del CP y Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala.

Detección por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Se realizó la detección de diferentes tipos de virus con el ensayo serológico con enzimas ligadas en doble sándwich (DAS-ELISA), en las 10 muestras de plantas de jitomate colectadas en parcelas de Morelos. Se utilizaron antisueros policlonales comerciales para la detección de los siguientes virus: marchitez manchada del tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV), mosaico de la alfalfa (*Alfalfa Mosaic Alfalfavirus*, AMV), mosaico del pepino (*Cucumber Mosaic Cucumovirus*, CMV), mosaico del tabaco (*Tobacco Mosaic Tobamovirus*, TMV), y jaspeado del tabaco

(*Tobacco Etch Virus*, TEV). Los antisueros utilizados fueron de la marca comercial Agdia Co. USA; las pruebas se realizaron siguiendo el protocolo indicado por la compañía proveedora de los antisueros. La absorbancia de las reacciones antígeno-anticuerpo fueron registradas en un Microlector con filtro a 492 nm, alrededor de 20-30 min después de la adición del sustrato. La reacción fue considerada positiva si la absorbancia era igual o superior a la lectura del control positivo.

Detección de virus de ARN de doble cadena

Se extrajo el ARN de doble cadena (ARN-dc) a partir de 3.5 g de tejido (hojas) con síntomas de la enfermedad, utilizando el método propuesto por Valverde *et al.*, (1990). El ARN-dc, se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y se corrió a 100 volts por 2.15 h; se incluyeron como marcadores de peso molecular los ARN-dc del virus mosaico del pepino (CMV=2.1, 1.9, 1.3 y 0.6 x 10⁶ Daltons), además de los tratamientos enzimáticos con ARNasa de los extractos de ARN-dc obtenidos de las plantas con síntomas de la enfermedad. El gel, se tiñó con bromuro de etidio al 0.5% durante 5-10 min en agitación. Se lavó el exceso con agua destilada durante 10 min.

Técnicas y pruebas moleculares para la detección e identificación de geminivirus

a) Extracción de ADN:

Se realizó la extracción de ADN con el método de CTAB 3% (Doyle and Doyle, 1990).

b) Amplificación por PCR:

La mezcla de reacción constó de 80 ng de ADN total, 250 µM de dNTPs, 20 pmol de los iniciadores PAL1v1978: 5'- GCA TCT GCA GGC CCA CAT YGT CTT YCC NGT - 3' / PAR1c496: 5'- AAT ACT GCA GGG CTT YCT RTA CAT RGG -3' (Rojas *et al.*, 1993), AV494: 5'- GCC CAT GTA TAG AAA GCC AAG -3' / AC1048: 5'- GGA TTA GAG GCA TGT GTA CAT G -3' (Wyatt y Bown, 1996) y RepMOT: 5'- GAG TCT AGA GGA TAN GTR AGG AAA TAR TTC TTG GC -3' / CPMot: 5'- CGC GAA TTC GAC TGG ACC TTA CAT GGN CCT TCA C -3', (Ascencio *et al.*, 2002); buffer de reacción 1X, 5 mM de MgCl₂, 1 U µL⁻¹ de ADN polimerasa (amplificasa de BIOGENICA®). Los tubos de PCR conteniendo la reacción (25 µL) se colocaron dentro del termociclador automático (GeneAmp PCR System mod. 2400, PERKIN ELMER®) con el siguiente

programa: primer ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C, 1 min, fase de alineamiento por 2 min a 56 °C y una extensión por 3 min a 72 °C; finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C., por 7 min.

Asimismo, se utilizaron los iniciadores AV494 y AC1048 (Wyatt y Bown, 1996), con las mismas concentraciones descritas anteriormente y el siguiente programa de ciclaje: primer ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; 40 ciclos con temperatura de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1.5 min y extensión a 72 °C por 2 min. Finalmente, una extensión final por 5 min a 72 °C.

c) Electroforesis

Para detectar la banda amplificada, los productos de PCR (5 µL) se cargaron en un gel de agarosa al 1%, se corrió una electroforesis con una solución amortiguadora TBE 1X a 90 volts. Posteriormente para visualizar el producto se tiñó el gel con bromuro de etidio (5 µL mL⁻¹) durante 10 min, transcurrido este tiempo se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta mediante el programa (Gel Doc mod. 2000, BIO RAD®). Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador 1Kb (GIBCO BRL®).

d) Secuenciación:

La secuenciación de los productos amplificados y purificados mediante el kit WIZARD®, se llevo acabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos, FES-Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Mediante un secuenciador Genetic Analyzer mod. 3100, APPLIED BIOSYSTEM®.

Las secuencias nucleóticas obtenidas fueron alineadas con las disponibles en el GenBank, utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La comparación filogenética y los dendogramas respectivos de las secuencias obtenidas se realizó por el método de Clustal W, utilizando el programa DNA Star, Madison, WI (Regenmortel *et al.*, 1997).

IV. RESULTADOS

4.1. Fitoplasmas

Transmisión vía injerto

Lycopersicon esculentum

En la Fig. 1, se muestran los síntomas presentes en plantas de jitomate enfermas y colectadas en campo, mismas que se utilizaron para realizar injertos en plantas sanas de jitomate y vinca. Como puede observarse el síntoma común fue el amarillamiento.

De las 44 plantas de jitomate, aparentemente sanas, injertadas con tejido vegetal de plantas de jitomate con síntomas de amarillamiento foliar y ápices violáceos colectadas en Sayula, Jalisco, Tlayacapan y Zacatepec, Morelos (Fig. 1B, D, E, F, G y H), e Ixtlahuaca, Estado de México (Fig. 1A y C), 31 mostraron una gran variedad de síntomas que incluyeron: amarillamiento, mosaicos, moteados, disminución del crecimiento, necrosis de hojas y flores, muerte ascendente y ápices violáceos.

De las 10 plantas injertadas con tejido procedente de Zayula, Jalisco, ocho de ellas mostraron síntomas de enanismo, lámina foliar reducida y amarillamiento intervenal (Fig. 2A).

Nueve de las 11 plantas injertadas con tejido vegetal de jitomate colectado en Tlayacapan, Morelos, presentaron síntomas a los 15 a 20 días después de injertadas; los cuales consistieron en atrofia de entrenudos y lamina foliar, amarillamiento, brotes apicales violáceos, y mosaicos (Fig. 2E y D).

Diez de las 13 plantas injertadas con tejido de plantas de jitomate colectado en Zacatepec, Morelos, mostraron síntomas de raquitismo y malformaciones de entrenudos, amarillamiento y coloración violácea en los ápices (Fig. 2E, F, H e I).



Figura 1. Síntomas en plantas de jitomate observados en diferentes localidades y condiciones de crecimiento y frecuentemente asociados con la presencia de psílidos y fitoplasmas A). Amarillamiento, necrosis de flores y reducción en el tamaño de los folíolos en jitomate cultivado en invernadero. B). Cultivo de jitomate a cielo abierto, con amarillamiento. C). Amarillamiento, acortamiento de entrenudos y disminución del tamaño del pecíolo de las hojas. D). Amarillamiento en jitomate en Bioespacio. E). Frutos con decoloración y necrosis de flores. F). Follaje violáceo, amarillamiento y enrollamiento de lámina foliar. G) y H). Amarillamiento general del follaje.

Cuatro de las 10 plantas injertadas con tejido de jitomate procedente de Ixtlahuaca, Estado de México, presentaron síntomas de reducción de lamina foliar, amarillamiento y malformación de folíolos (Fig. 2G).



Figura 2. Síntomas observados en las plantas mantenidas en invernadero e injertadas con tejido de plantas de jitomate colectadas en campo. A). Planta de jitomate con amarillamiento ligero injertada con tejido de plantas de jitomate colectadas en Sayula, Jalisco. B). Planta de vinca injertada con tejido vegetal de jitomate colectado en Sayula, Jal., de los tres tallos desarrollados por la planta uno muestra síntomas de amarillamiento. C). Planta de vinca mostrando amarillamiento injertada con tejido vegetal de jitomate. D). Planta de jitomate injertada con tejido vegetal de jitomate, la cual muestra crecimiento apical raquífito, disminución del tamaño y forma de hojas y folíolos. E). Plantas injertadas con tejido vegetal de jitomate colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, mostrando síntomas de amarillamiento, diferencias en el tamaño de la planta iniciando la etapa fenológica de floración y condiciones generales de crecimiento (contenedor, trampas pegajosas amarillas y jaula cerrada con tela para disminuir la posible contaminación). F). Planta de jitomate injertada con tejido vegetal de jitomate, mostrando síntomas de amarillamiento, reducción de lámina foliar y tamaño de frutos, y ligera decoloración de frutos. G). Planta de jitomate injertada con tejido vegetal de jitomate colectado en Ixtlahuaca, Edo. de Méx., mostrando amarillamiento, acortamiento de entrenudos y folíolos ligeramente enroscados. H). Planta de jitomate injertada con tejido de plantas de jitomate colectadas en Zacatepec, Mor., mostrando amarillamiento, acortamiento de entrenudos, ligero arrosamiento apical, y amarillamiento y necrosis de flores I). Planta de jitomate injertada con tejido vegetal de plantas de jitomate, mostrando follaje amarillento con márgenes violáceos y flores necrosadas.

Catharanthus roseus

De las 10 plantas de *C. roseus* injertadas con tejido vegetal de jitomate con síntomas, procedente de Sayula, Jalisco, cinco mostraron amarillamientos foliares (Fig. 2B y C), mientras que de las ocho injertadas con tejido vegetal de jitomate procedente de Ixtlahuaca, Estado de Méx., tres plantas evidenciaron sobrecrecimiento de la nervadura central.

Microscopia de fluorescencia

En las 10 muestras de tallos y pecíolos de las plantas de jitomate con síntomas colectadas en Sayula, Jalisco e Ixtlahuaca, Estado de México, se observó fluorescencia dentro de los tubos cribosos del floema, sugiriendo la presencia de ADN ajeno a la planta que podría corresponder a fitoplasmas (Fig. 3B, C, D, E y F). En tejido de plantas de jitomate asintomáticas no se observó tal fluorescencia (Fig. 3A). La técnica de tinción con DAPI fue utilizada como una prueba inicial y complementaria para buscar de manera indirecta indicios de la presencia de fitoplasmas dentro de los tejidos de las plantas que manifestaban síntomas; sin embargo, por no ser una prueba contundente solo se realizó en muestras de tejido provenientes de las dos localidades mencionadas.

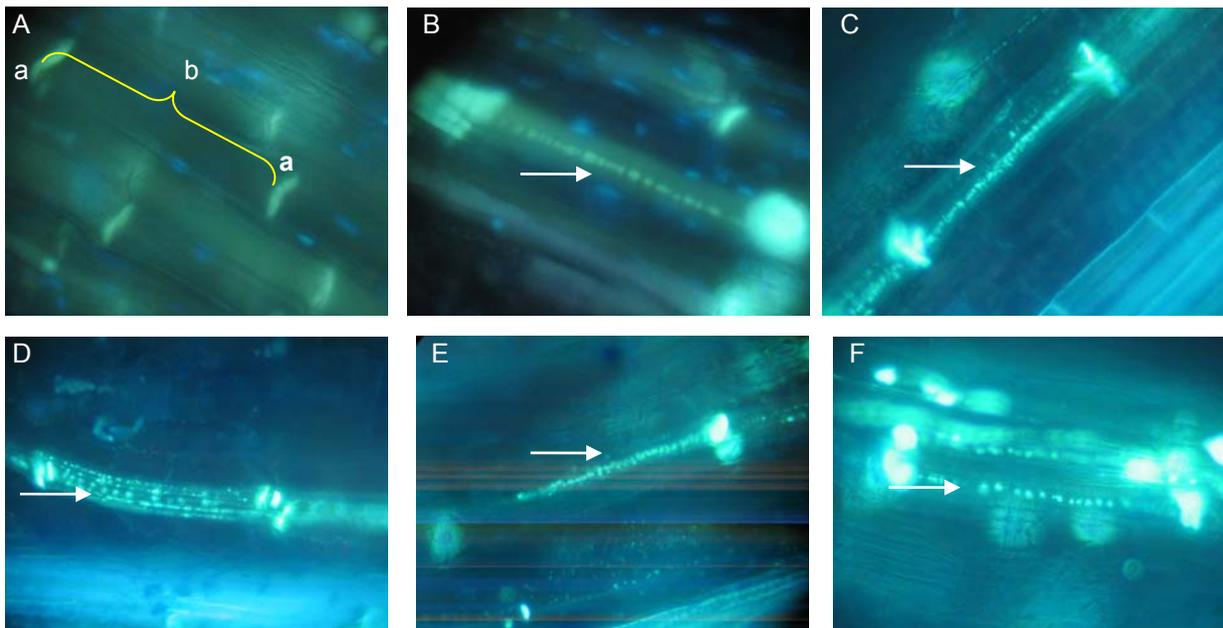


Figura. 3. Microscopia de fluorescencia mostrando el tejido del floema de muestras vegetales de jitomate. A). Corte longitudinal de tallo de planta de jitomate sin síntomas mostrando tejido del floema, (a) placas del tubo criboso, (b) tubo criboso sin fluorescencia. B). Fluorescencia en tubo criboso en cortes de tallo de plantas de jitomate colectadas en Sayula, Jalisco. C, D, E y F. Tubos cribosos con fluorescencia en cortes de tallo de plantas de jitomate colectadas en Ixtlahuaca, Estado de México. (ADN →).

Microscopia electrónica

En el material vegetal con síntomas de la enfermedad de las localidades de Ixtlahuaca, Estado de México y Sayula, Jalisco, no se detectó la presencia de fitoplasmas ni de algún otro patógeno aún cuando dichas muestras habían mostrado fluorescencia mediante DAPI.

Análisis por PCR

De los seis sitios de muestreo (Cuadro 6), solamente de tejido de jitomate proveniente de dos localidades (Montecillo e Ixtlahuaca, Edo. Méx.) se amplificó el fragmento esperado de 1.8 Kb con los primers P1/P7 y de 1.2 con los primers R16F2n/R16R2; para el primer sitio, en el 20% (4 de 20) de las muestras colectadas se amplificó con los primers P1/P7 y R16F2n/R16R2; cabe mencionar que para este sitio de muestreo fue posible amplificar y observar el fragmento en PCR directa, así como en PCR anidada, mientras que para Ixtlahuaca, solamente se visualizo en el 5.5% de las muestras (1 de 18) después de realizar PCR anidada (Cuadro 6, Fig. 4A y B). Para el caso de las muestras colectadas en Chapingo, Edo. Méx, Tlayacapan y Zacatepec, Mor., y Sayula Jalisco, en ninguna de ellas se detectó el fragmento esperado que sugiriera la presencia de fitoplasmas (Cuadro 6 y Fig. 4A).

Cuadro 6. Detección de fitoplasmas mediante PCR en muestras de plantas de jitomate con síntomas putativos a estos procariontes.

Localidad	Número de muestras procesadas del material colectado	Número de muestras procesadas del material injertado	Amplificación de fitoplasmas Por PCR	
			Directa	Anidada
Chapingo, Edo. Méx.	10	---	0 ^a / 10 ^b	0 / 10
Montecillo, Edo. Méx.	20	---	4 / 20	4 / 20
Ixtlahuaca, Edo. Méx.	10	10	0 / 20	1 / 20
Pantitlan, Morelos	11	11	0 / 22	0 / 22
Zacatepec, Morelos	13	13	0 / 26	0 / 26
Zayula, Jalisco	10	10	0 / 20	0 / 20

^aMuestras positivas.

^bTotal de muestras analizadas

No se obtuvo amplificación por PCR con el ADN extraído de muestras de plantas injertadas (jitomate y vinca) con tejido vegetal de jitomate, procedentes de Jalisco (Sayula) y Estado de México (Ixtlahuaca), tampoco de las plantas de jitomate injertadas con tejido de jitomate colectado en Morelos (Tlayacapan y Zacatepec) las cuales fueron mantenidas en invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados (Cuadro 6). En general la amplificación fue muy inconsistente y errática, pues plantas que mostraban síntomas atribuibles a la infección por fitoplasmas resultaron negativas mediante el análisis por PCR directa y PCR anidada.

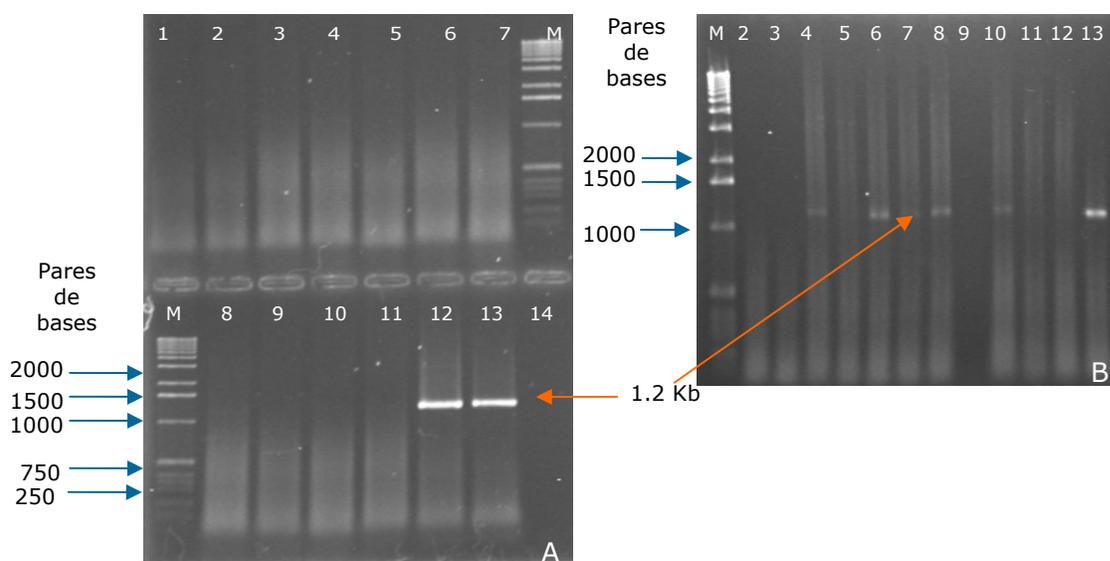


Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada para la detección del gen 16S rARN de fitoplasmas, en ADN extraído de tejido vegetal de jitomate. A). Carriles 1 al 3 muestras de Sayula, Jalisco. Carriles 4 y 5 muestras de Tlayacapan, Morelos. Carriles 6 y 7 muestras de Zacatepec, Mor. Carriles 8 y 9 muestras de Ixtlahuaca, Edo. Méx. Carriles 10, 11 y 12 muestras de Montecillo, Estado de México. Carril 13 control positivo. Carril 14 control negativo Carril M = Marcador de peso molecular 1 Kb. B). Carril M = Marcador de peso molecular. Carriles 2 al 5 muestras de Ixtlahuaca, Edo. Méx. Carriles 6 al 11 muestras de Montecillo, Edo. Méx. Carril 12 control negativo. Carril 13 control positivo.

Análisis de RFLPs de productos obtenidos a partir de PCR

La comparación de los patrones de restricción obtenidos (Fig. 5) con aquellos reportados por Lee *et al.*, 1998b, coincidieron con el grupo del fitoplasma del amarillamiento del áster (aster yellows, 16SrI).

Secuenciación

La alineación de las secuencias nucleóticas obtenidas mostraron homología con el fitoplasma del amarillamiento del áster, con un 91% de similitud (273/297).

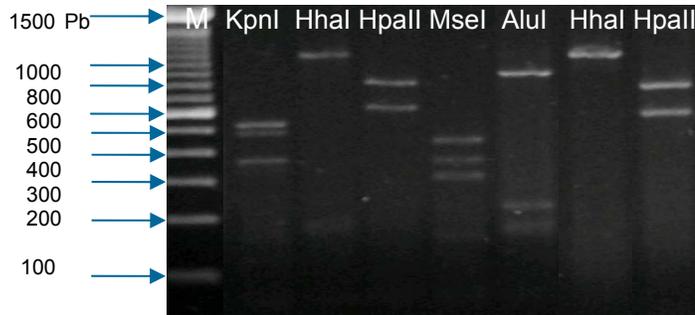


Figura 5. Análisis de los fragmentos polimorficos largos de restricción (RFLP) obtenidos de la digestión enzimática de productos de PCR amplificados con los iniciadores R16F2n/R16R2, de muestras de tejido de plantas de jitomate con síntomas de reducción de crecimiento, acortamiento de entrenudos, y amarillamiento del follaje. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción KpnI, HhaI, HpaII, MseI y AluI, separado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. M=marcador de peso molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN). Pb = pares de bases.

4.2. *B. cockerelli*

Análisis del ADN por PCR

No se obtuvo amplificación del fragmento correspondiente a fitoplasmas con ninguno de los ADNs extraídos de especímenes de *B. cockerelli* colectados en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, Chapingo e Ixtlahuaca, Estado de México Tampoco con el ADN de los insectos aislados y criados en invernadero.

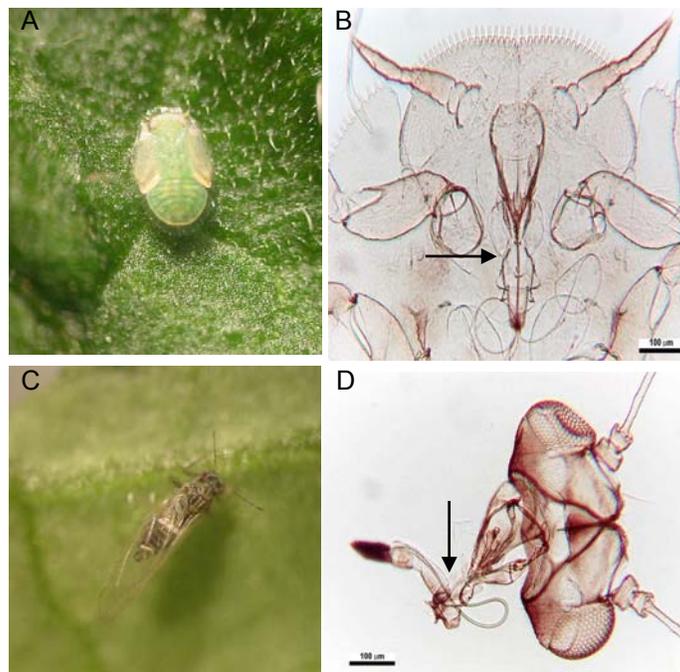


Figura 6. *Bactericera cockerelli*. A). Ninfa. B). Cabeza de ninfa con su aparato bucal completo y desarrollado (—→). C). Adulto. D). Cabeza de adulto con su aparato bucal completo y desarrollado (—→).

Mediante las observaciones microscópicas de ninfas (Fig. 6A) y adultos (Fig. 6C), hembras y machos, se determinó que ambos estados de desarrollo tienen su aparato bucal perfectamente desarrollado (Fig. 6B y D), sugiriendo que también los adultos tienen capacidad para alimentarse.

4.3. Virus

DAS-ELISA

La prueba de DAS-ELISA fue negativa para TMV, CMV, AMV, TEV, TSWV y TBSV en todas las muestras de tejido de jitomate enfermo provenientes de Tlayacapan y Zacatepec, Morelos.

Análisis de ARN de doble cadena

El análisis electroforético de ARN-dc de las muestras procesadas indicó resultados negativos.

Análisis por PCR

De las 24 plantas de jitomate injertadas con tejido de plantas enfermas procedentes de Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, 81% (9 de 11) y 77% (10 de 13) amplificaron el fragmento esperado correspondiente a geminivirus (1200 Pb), con el par de primers PAL1v1978/PAR1c496 (Fig. 7D).

Secuenciación

La secuencia de nucleótidos de los productos de PCR obtenidos, correspondió a dos geminivirus: el geminivirus enrollamiento severo de la hoja (tomato severe leaf curl begomovirus, ToSLCV), y el virus tomato chino variante La Paz (ToChLPV).

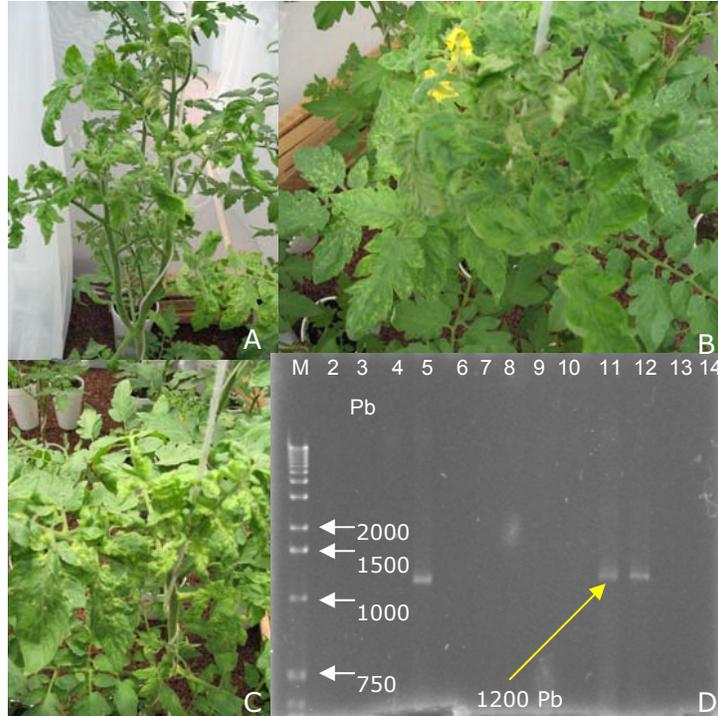


Figura 7. Plantas de jitomate injertadas con tejido vegetal colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, mostrando síntomas similares a los que se reportan asociados con la presencia de los virus ToSLCV y ToChLPV. A). Mosaico, ligero enrollamiento de los folíolos y amarillamiento del pedúnculo de la flor. B). Mosaico y ligera deformación de los folíolos de las hojas apicales. C). Mosaico, deformación severa de los folíolos y disminución del crecimiento de la planta. D). Fragmentos amplificados por PCR correspondiente a geminivirus. Pb = Pares de bases. Carril M = Marcador de peso molecular 1 Kb. Carriles 2 al 4 muestras de Montecillo, Edo. Méx. Carril 5 control positivo de geminivirus. Carril 6 control negativo. Carril 7 al 11 muestras colectadas en Zacatepec, Morelos. Carriles 12 al 14 muestras colectadas en Tlayacapan, Mor.

Los síntomas observados en las plantas de jitomate, injertadas con muestras de tejido de plantas de jitomate colectadas en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, consistieron en mosaicos, deformación de folíolos, aborto de flores y reducción en el tamaño de la planta (Fig. 7A, B y C), dichos síntomas se reporta que están relacionados con la presencia de los virus del enrollamiento severo de la hoja y la variante del virus chino del tomate detectada en la Paz, B. C. La presencia de ambos virus fue evidenciada mediante PCR (Fig. 7D), cuya secuencia fue similar con las secuencias depositadas en el GenBank.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se detectaron mediante PCR secuencias de nucleótidos correspondientes a fitoplasmas. No obstante, la detección mediante PCR fue muy errática. A nivel mundial se reportan los fitoplasmas Tomato Big Bud y Stolbur, pertenecientes a los grupos amarillamiento del áster y stolbur, respectivamente

(Anfoka, 2003; Blancard, 1990; Favalli, 2001; Fedotina *et al.*, 1979; Jones y Jones, 1991; U. de C., 1998). La secuencia del fragmento amplificado mediante los primers P1/Tint (aprox. 1600 pb), muestra homología con el fitoplasma del grupo del amarillamiento del áster, sin embargo, la sintomatología no corresponde del todo con la descrita por los autores arriba citados y en gran medida puede deberse a que los factores ambientales y el genotipo del hospedante, condicionan el desarrollo de los síntomas (Agrios, 2005; Van Loon, 1887). Recientemente, en el Valle de San Quintín en Baja California, México, Holguín *et al.*, (2007) reportaron la presencia de dos fitoplasmas (amarillamiento del áster y virescencia en vinca mexicana), en plantas de jitomate con síntomas de clorosis, achaparramiento severo, hojas enrolladas hacia el haz, bronceado de hojas maduras, decoloración de nervaduras, hojas pequeñas, estructuras florales anormales y ramificación excesiva de brotes laterales. Tales síntomas coinciden parcialmente con los observados en las plantas de jitomate colectadas en campo durante el presente trabajo (amarillamiento foliar, coloración violácea de los brotes apicales y en algunos casos de los márgenes de las hojas). Los resultados obtenidos y la variedad de síntomas presentes en plantas de jitomate en las diferentes localidades, sugieren, la presencia de más de un patógeno induciendo el síndrome observado en los campos cultivados de jitomate en Morelos y Estado de México; idea sustentada por la detección positiva de los geminivirus tomato severe leaf curl virus y tomato chino la Paz virus, en muestras procedentes de Morelos.

Probablemente, las plantas de jitomate muestreadas en Montecillo, Texcoco, en el mes de julio de 2006 estaban infectadas con fitoplasmas, aparentemente él del amarillamiento del áster; ya que la comparación con las secuencias disponibles en el GenBank muestran un porcentaje de identidad por arriba del 90%, sin embargo, dichas comparaciones deben tomarse con cierta reserva ya que el tamaño del fragmento nucleotídico comparado fue relativamente pequeño (309 nucleótidos) en relación con los que se reportan en la base de datos (1500-1800 nucleótidos). Los resultados obtenidos mediante el análisis del patrón electroforético, producto de la digestión enzimática de los productos amplificados por PCR, con los iniciadores R16F2n/R16R2, y su comparación con los patrones reportados por Lee *et al.* (1998b),

indican que las muestras de jitomate colectadas en Montecillo, México estaban infectadas por el fitoplasma correspondiente al grupo del amarillamiento del áster, lo cual coincide con lo reportado en la literatura por Anfoka (2003) y Favalli (2001).

El bajo porcentaje de muestras positivas obtenidas por PCR, y la falta de detección del fitoplasma mediante microscopia electrónica, podría en parte explicarse por una concentración baja en el hospedante, su errática distribución en la planta, la etapa de infección y la época del año en que se lleva a cabo el muestreo. Mediante PCR y microscopia electrónica y de fluorescencia, Siddique *et al.*, (1998) encontraron en plantas de papayo infectadas con el fitoplasma de la muerte regresiva Australiana del papayo (Australian papaya dieback), que no todos los tejidos que habían presentado autofluorescencia fueron positivos con PCR y del mismo modo, no todos los tejidos que contenían ADN de fitoplasmas (interpretado por resultados positivos de PCR) mostraron autofluorescencia. En plantas con síntomas iniciales de la enfermedad (inclinación de la parte apical de la planta), la fluorescencia se observó en frutos, hojas maduras y tallo a nivel basal y apical, pero no en la parte media del tallo, hojas expandidas y flores (tejidos que fueron positivos con PCR), mientras que los resultados de PCR fueron negativos en hojas maduras y pecíolos (los cuales mostraron fluorescencia). A su vez, plantas con necrosis basipetala de hojas jóvenes, tallo y raíces, mostraron autofluorescencia en todos los tejidos, mientras que por PCR solo se detectaron fitoplasmas en raíces y hojas inmaduras de la corona. Por otro lado, en plantas que parecían estar recuperándose de la enfermedad, la autofluorescencia se restringió a la parte apical y basal del tallo, y a la sección de las raíces tomadas del lado inclinado de la planta; mientras que por PCR solo en la parte baja del tallo se obtuvo la amplificación del fragmento esperado. Los fitoplasmas no fueron detectados mediante microscopia electrónica en hojas, tallos y tejido de frutos en varias etapas de expresión de síntomas, aun cuando los resultados de PCR indicaron la presencia de fitoplasmas (Siddique *et al.*, 1998). Por su parte, Wei *et al.*, (2004) encontraron, mediante análisis con PCR anidada, PCR en tiempo real e inmunohistoquímico, que al inocular el fitoplasma del amarillamiento de la cebolla (Onion yellows) en la hoja media de *Crysanthemum coronarium* (planta de ocho

hojas), este se movió hacia el tallo principal distribuyéndose uniformemente hasta alcanzar las raíces y parte apical de la planta hospedante; a los 7 días después de la inoculación, el fitoplasma se movió desde la parte apical hacia el resto de la planta, infectando todas las ramificaciones secundarias del tallo principal, de manera que para el día 21 posterior a la inoculación, el fitoplasma se encontró distribuido en toda la planta incrementando progresivamente su población. También, el fitoplasma de la flavescencia dorada de la vid (*grapevine flavescence dorée*) fue primero detectado en las raíces de plantas de haba (*Vicia faba*) a los 17 días después de la inoculación, encontrando altos títulos de fitoplasmas presentes en algunas regiones demandantes de fotoasimilados de la planta, atribuible a una multiplicación activa, más que a una simple acumulación por flujo de masas; mientras que los órganos fuente de fotoasimilados de la planta mostraron acumulación pasiva (aparentemente en estos órganos se da poca multiplicación) de fitoplasmas (Lherminier *et al.*, 1994).

En cuanto a la época del año en la que se realice el muestreo, Cervantes, (2005) reportó en alstroemeria la inconsistencia en las detecciones de fitoplasmas; así, durante 2002 la detección fue positiva solo en el mes de septiembre y noviembre; en 2003 en el mes de marzo y mayo, y en 2004 fue en marzo, abril, mayo, agosto y septiembre. Todo lo anterior indica la complejidad de las interacciones entre todos los componentes del sistema, el hospedante, el patógeno y el ambiente.

El resultado del análisis por PCR y la reamplificación con PCR-anidada, fue inconsistente, plantas que mostraban síntomas que sugerían la posible presencia de fitoplasmas, daban resultado negativo; lo cual coincide con numerosos investigadores que han reportado tales efectos (Davis *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1998). Sin embargo, cabe mencionar que la detección consistente del control positivo de fitoplasmas en todas las pruebas (PCR y PCR anidada) descartó posibles errores metodológicos. El problema al parecer radica en que cada sistema (fitopatógeno-hospedante) tiene sus propias particularidades y no ha sido posible, hasta la fecha, proponer un modelo sobre la biología y el movimiento de los fitoplasmas dentro de la planta hospedante que ayude a determinar la zona de la planta más apropiada para

muestrear y el momento idóneo para realizar tal muestreo, de manera que se tenga una alta probabilidad de detectar al patógeno si se encuentra interaccionando con una planta hospedante. La situación se vuelve aún más compleja cuando al sistema se le suma otro factor, el elemento vector.

Las muestras de jitomate colectadas en Ixtlahuaca, Estado de México, mostraron un patrón de síntomas un tanto diferente del resto de las zonas de colecta (reducción en el tamaño del follaje de la parte apical, amarillamiento y violáceo y acortamiento de entrenudos), que podría estar asociado con el viroide del tubérculo fusiforme de la papa (potato spindle tuber viroid) (Defra, 2003; Hammond y Owens, 2006; Mumford *et al.*, 2004). Aunque también, al tratarse de una variedad de jitomate de crecimiento indeterminado y cultivado en condiciones de invernadero, las diferencias en sintomatología podrían deberse a estas particularidades y no necesariamente a la presencia de otro tipo de patógeno.

La ausencia de detección del fitoplasma dentro del insecto vector (*B. cockerelli*) mediante PCR, posiblemente se deba a que los fitoplasmas no estuvieron distribuidos en la parte aérea de la planta en concentraciones tales que el insecto vector pudiera adquirirlos al momento de alimentarse y que mas bien aquellos se encontraran en la zona radical, lo cual anula la posibilidad de ser adquiridos por el insecto. De ahí la necesidad de conocer el sistema planta hospedante-fitoplasma para obtener información confiable y más cercana a la realidad.

Los geminivirus detectados por PCR en tejido de plantas injertadas con tejido vegetal de jitomate colectado en Tlayacapan y Zacatepec, Morelos, aparentemente corresponden al tomato severe leaf curl virus, reportado recientemente en Nicaragua, Honduras, y El Salvador (Maxwell, 2002; Rojas *et al.*, 2005), y en México en los Estados de Morelos y San Luis Potosí (Mauricio *et al.*, 2006), y tomato chino la Paz virus, reportado en La Paz, B.C. (Holguín *et al.*, 2005) y Sinaloa (Brown y Nelson, 1988). Las plantas injertadas reprodujeron los síntomas de las plantas enfermas colectadas en campo (bordes cloróticos de las hojas, enroscamiento de la hoja,

reducción en tamaño de la misma, aborto de flores, brotes apicales raquíuticos y violáceos); sin embargo, por tratarse de virus recientemente reportados, no se ha descrito la variación en la expresión de síntomas que podría presentarse en regiones con diferentes condiciones ambientales y en diferentes variedades de jitomate.

Los resultados de las pruebas de ELISA y del análisis de ARN de doble cadena, técnica considerada como una prueba estable e inespecífica (Valverde, 1990), sugieren que las plantas no estuvieron infectadas por este tipo de virus. Sin embargo, habrá que tener en mente que la dinámica de infecciones virales es muy dependiente de las condiciones ambientales, del tipo de hospedante y de la etapa fenológica del mismo, así como del momento de realizar la colecta de dicho material; por otro lado la presencia de diferentes tipos de compuestos presentes en el tejido vegetal pueden inhibir la detección de proteínas virales (Paplomatas, *et al.*, 1994; Van Loon, 1987).

VI. CONCLUSIONES

- ✚ Las plantas de jitomate colectadas en las diferentes localidades, así como las plantas injertadas y mantenidas en invernadero, comparten síntomas atribuidos a infecciones virales y/o fitoplasmas; no obstante, la presencia de estos patógenos fue inconsistente y por lo mismo no fue posible establecer una relación directa con el síndrome del declinamiento del jitomate.
- ✚ La información obtenida no permitió establecer el papel de *B. cockerelli* con los síntomas observados en las plantas de jitomate cultivadas en campo, tampoco con los de plantas crecidas en invernadero.
- ✚ Se detectó e identificó al fitoplasma del amarillamiento del áster y los geminivirus tomato severe leaf curl virus y tomato chino la Paz virus, en plantas de jitomate.
- ✚ La sintomatología observada, demuestra la plasticidad de las plantas para una manifestación difícilmente diferenciable por efecto de este tipo de patógenos.

LITERATURA CITADA

- Albernathy, R. L. 1991. Investigations into the nature of the potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc). M. S. Thesis, Colorado. State University, Fort Collins. 54 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, 5^a ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., and Arzone, A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6 (2): 115-121.
- Andersen, M. T., Longmore J., Liefting, L. W., Wood, G. A., Sutherland, P. W., Beck, D. L., and Forster, R. L. S., 1998. Phormium yellow leaf phytoplasma is associated with strawberry lethal yellows disease in New Zealand. *Plant Disease* 82: 606-609.
- Anfoka, G. H., Khalil, A. B., and Fattash I. 2003. Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. *Journal of Phytopathology* 151 (4): 223-227.
- Arocha, Y., López, M., Fernández, M., Piñol, B., Horta, D., Peralta, E. L., Almeida, R., Carvajal, O., Picornell, S., Wilson, M. R., and Jones, P. 2005. Transmission of a sugarcane yellow leaf phytoplasma by the delphacid planthopper *Saccharosydne saccharivora*, a new vector of sugarcane yellow leaf syndrome. *Plant Pathology* 54: 634-642.
- Ascencio, I. J. T., Díaz, P. R., Méndez, I. J., Monsalve, F. Z. L., Argüello, A. G., and Rivera, B. R. F. 1999. First report of tomato yellow leaf curl virus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83: 1178.
- Ascencio, I. J. T., Argüello, A. G. R., Méndez, L. J., and Rivera, B. R. F. 2002. First report of *Rhynchosia* golden mosaic virus (RhGMV) Infecting Tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Disease* 86: 692.
- Barbara, D. J., Morton, A., Clark, M. F., and Davies, D. L. 2001. Molecular variation in immunodominant membrane proteins from phytoplasmas. *Acta Horticulturae* 550: 405-408.
- Barros, T. S. L., Davis, R. E., Resende, R. O., and Dally, E. L. 2002. Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S

rRNA gene group VII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease* 86: 1142-1148.

Bayer CropScience. 2005. La Paratrioza o pulgón saltador del tomate y la papa. Boletín técnico 24 p.

Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A., and Nault, L. R. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93 (2): 271-276.

Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. 2002. *Biochemistry*. fifth edition. <http://www.whfreeman.com/stryerbiochem5/>.

Bertamini, M., and Nedunchezian, N. 2001. Effects of Phytoplasma [stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* 39 (1): 119-122.

Bertamini, M., Grando, M. S., Muthuchelian, K., and Nedunchezian, N. 2002a. Effect of phytoplasmal infection on photosystem II efficiency and thylakoid membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 349-356.

Bertamini, M., Nedunchezian, N., Tomasi, F., and Grando, M. S. 2002b. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 357-366.

Bertamini, M., Muthuchelian, K., Grando, M. S., and Nedunchezian, N. 2002c. Effects of phytoplasma infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple (*Malus pumila* Mill. cv. Golden delicious). *Photosynthetica* 40 (1): 157-160.

Bertamini, M., Grando, M. S., and Nedunchezian, N. 2003/4. Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll-protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. *Biologia Plantarum* 47 (2): 237-242.

Blancard, D. 1990. *Enfermedades del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 212 p.

Blomquis, L. C., Barbara, J. D., Davies, L. D., Clark, F. M., and Kirkpatrick, C. B. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147: 571-580.

- Blood, H. L., Richards B. L., and Wann, F. B. 1933. Studies of psyllid yellows of tomato. *Phytopathology* 23: 930.
- Bressan, A., Girolami, A. and Boudon, P. E. 2005. Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115 (2): 283-290.
- Brown, J. K., Idris, A. M., and Fletcher, D. C. 1993. Sinaloa Tomato Leaf Curl Virus, a newly described Geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. *Plant Disease* 77: 1262.
- Brown, J. K., and Nelson, M. R. 1988. Transmission host range and virus relationships of chilo tomato virus (CdTV), a white fly transmitted geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72: 866-869.
- Brown, J. K., and Poulos, B. T. 1990. Serrano Golden Mosaic Virus: A newly identified whitefly-transmitted Geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Disease* 74: 720.
- Bustamante, O. J. D. 1995. La modificación ambiental y su efecto fisiológico en jitomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo.de México. 165 p.
- Bustamante, O. J. D., González, H. V. A., Livera, M. M. y Zavaleta, M. E. 1999. Cambios fisiológicos y microclimáticos inducidos en jitomate por una cubierta flotante. *Agrociencia* 33 (1): 31-39.
- Bustamante, O. J. D., Cano, R. P., Alvarez, Z. R., Aviles, M. J. A., y Zamudio, G. B. 2004. Tendencias en la Horticultura Protegida y Participación del INIFAP. Memoria de "I Simposio sobre Horticultura protegida en Sonora".
- Bustamante, O. J. D., Rodríguez, H.R., Márquez, M. I., Aviles, B. W., Villa, C. M., y Valenzuela, V. J. M. 2006. Reducción de riesgos e incremento de la producción de hortalizas en ambientes protegidos. Memorias del RNIAF. http://www.rniaf.org.mx/docs/Convocatoria_RNIAF_2007.pdf
- Carter, R. D. 1950. Toxicity of *Paratrioza cockerelli* to certain solanaceous plants. Ph.D. Dissertation, University of California. 128 p.
- Cervantes, D. L. 2005. Identificación biológica y molecular de fitoplasmas y geminivirus de la alstroemeria (*Alstroemeria* L.). Tesis Dr. en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 88 p.
- Chen, K. H., Guo, J. R., Wu, X. Y., Loi, N., Carraro, L., Guo, Y. H., Chen, Y. D., Osler, R., Pearson, R., and Chen T. A. 1993. Comparation of monoclonal antibodies,

DNA probes, and PCR for detection of grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* 83: 915-922.

Cousin, M. T., and Boudon, P. E. 2001. Phytoplasmes et phytoplasmoses: caractéristiques, symptômes et diagnostic. *Cahiers D'études et de Recherches Francophones / Agricultures* 10 (6): 361-76.

Cousin, M. T., and Boudon, P. E. 2002. Phytoplasmes et phytoplasmoses: vecteurs, méthodes de lutte et thèmes de recherche. *Cahiers D'études et de Recherches Francophones / Agricultures* 11 (2): 115-26.

Cranshaw, W. 1999. Watch for potato/tomato psyllid. *Pest Alert* 16: 1-2.

Cui, X. F., Tao, X., Xie, Y. Clauquet, C. M., and Zhou, X. P. 2004. A DNA β associated with Tomato yellow leaf curl China virus is required for symptom induction. *Journal of Virology* 78: 13966-13974.

Cui, X. F., Li, G. X., Wang, D. W., Hu, D. W., and Zhou, X. P. 2005. A begomovirus DNA beta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of Virology* 79 (16): 10764-10775.

Daniels, L. B. 1954. The nature of the toxicogenic condition resulting from the feeding of the tomato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc). Ph.D. Dissertation, Univ. Minnesota. 119 p.

Davis, R. E., Dally, E. L., Gundersen, D. E., Lee, I.-M., and Habili, N. (1997). "Candidatus *Phytoplasma australiense*," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 262-269.

Defra, Department for Environment, Food and Rural Affairs. 2003. Potato spindle tuber viroid. UK. Ficha técnica. <http://www.defra.gov.uk/planth/pestnote/pstv.htm>

De la Torre, A. R. 1996. Caracterización biológica y molecular de un complejo viral en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en los valles altos de México. Tesis Dr. En Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 93 p.

Delatte, H., Martin, D. P., Naze, F., Goldbach, R., Reynaud, B., Peterschmitt, M., and Lett, J. M. 2005. South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of General Virology* 86 (5): 1533-1542.

Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. 1967. *Micoplasma* or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.

- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Erlich, H. A., Gelfond, D., and Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in the Polimerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643-1650.
- FAO. 2006, Base de datos estadísticos FAOSTAT. Publicación en línea <http://faostat.fao.org/>
- Fauquet, C. M., and Stanley, J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: Are view of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150 (10): 2151-2179.
- Favali, M. A., Sanità di Toppi, L., Vestena, C., Fossati, F., and Musetti, R. 2001. Phytoplasmas associated with tomato stolbur disease. *Acta Horticulturae* 551: 93-99.
- Fedotina, V. L., and Surgucheva, N. A. 1979. Investigation of the mycoplasma of tomato stolbur in vivo and in vitro. *Biologicheskije Nauki* 10: 20-23.
- Ferguson, G., and Fraser, H. 2003. Potato psyllid - A new pest in greenhouse tomatoes and peppers. Ministry of Agriculture and Food. Ontario, Canada.
- García, C. M. 2004. Detección, transmisión y caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad del decaimiento del peral. Tesis de Dr. En Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. 146 p.
- Garzón, T. J. A., Garza, C. A., y Bujanos, M. R. 1986. Determinación del insecto vector de la enfermedad de tipo viral "permanente del tomate" (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región del Bajío. pp. 30. In: Memorias XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Garzón, T. J. A., Garzón, C. J. A., Velarde, F. S., Marín, J. A., y Cárdenas, V. O. G. 2005. Ensayos de transmisión del fitoplasma asociado al "permanente del tomate" por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. en México. pp. 672-675. In: Entomología Mexicana. Vol. 4. Resúmenes. Sociedad Mexicana de Entomología, A. C.
- Gundersen, D. E., and Lee, I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Hammond, R. W. and Owens, R. A. 2006. Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet Feature Story. <http://www.apsnet.org/online/feature/viroids/>

- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., and Damak, S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11 (1): 97-103.
- Hegele, M., and Bangerth. 1997. Changes in IAA and ABA levels and IAA transport of proliferation-diseased apple trees. *Acta Horticulturae* 463: 97-103.
- Henson, J. M. and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81-109.
- Hiruki, C. 1988. Rapid and specific detection methods for plant mycoplasmas. pp. 77-101. In: *Mycoplasmas diseases of crops; basic and applied aspects*. Maramorosch, K., and Raychaudhuri, S. P. (eds). Springer-Verlag. New York.
- Holguín, P. R. J., Vázquez, J. R. C., and Rivera, B. R. F. 2005. A new Begomovirus causes tomato leaf curl disease in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 89: 341.
- Holguín, P. R. J., Vázquez, J. R. C., and Rivera, B. R. F. 2004. Pepper golden mosaic virus affecting tomato crops in the Baja California Peninsula, México. *Plant Disease* 88: 221.
- Holguín, P. R. J., Vázquez, J. R. C., and Martínez, S. J. P. 2007. First report of a 16Srl-B group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting tomato plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 91: 328.
- Hong, Y., Davies, D. L., Wezel, V. R., Morton, A., and Barbara, D. J. 2001. Expression of the immunodominant membrane protein of chlorantie-aster yellows phytoplasma in *Nicotiana benthamiana* from a potato virus x-based vector. *Acta Horticulturae* 550: 409-415.
- Idris, A. M., Rivas, P. G., Torres, J. I., and Brown, J. K. 1999. First report of Sinaloa tomato leaf curl geminivirus in Costa Rica. *Plant Disease* 83: 303.
- Islas, F. I., Santamaria, M. J., Cordova, I., and Oropeza, C. 1999. Biochemical changes in roots of coconut palms (*Cocos nucifera* L.) affected by lethal yellowing. *Journal of Plant Physiology* 155: 48-53.
- Jones, P. J., and Jones B. J. 1991. *Compendium of tomato diseases*. APS Press. USA. 73 p.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 1043-1050.

- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150: 135-142.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsunashi, W., Watanabe, K., and Sato, M. 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90 (8): 909-914.
- Kikushima, T. J. M. 2005. El psílido del tomate *Bactericera cockerelli* (Sulc) (=Paratrioza cockerelli) una nueva plaga de importancia económica en el norte de Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México. 74 p.
- Kirkpatrick, B. C., Stenger, D. C., Morris, T. J., and Purcell, A. H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Science* 228: 197-200.
- Kirkpatrick, B. C., and Smart, C. D. 1995. Phytoplasmas: Can phylogeny provide the means to understand pathogenicity. pp. 187-212. In: *Advances in Botanical Research* Vol. 21, Andrews, J. H. and Tommerup, I. C. Eds. Academic Press Limited.
- Knowlton, G. F., and James, M. J. 1931. Studies on the biology of the *Paratrioza cockerelli* (Sulc.). *Entomological Society of America Annals* 24: 283-291.
- Kunkel, L. O. 1926. Studies on aster yellows. *American Journal of Botany* 23: 646-705.
- Kuboyama, T., Huang, C. C., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., and Namba, S. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic Onion Yellows phytoplasma and its heterogeneity in the symptomatic phytoplasma mutant. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11: 1031-1037.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critic Review of Plant Science* 11: 327-349.
- Lee, I.-M., Gunderson-Rindal, D. E., and Bertaccini, A. 1998a. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366.
- Lee, I. M., Gunderson-Rindal, D. E., Davis, R. E., and Bartoszyk, I. M. 1998b. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.

- Lee, I. M., Hammond, R., and Gunderson-Rindal, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, I. M., Davies, R. E., and Gunderson-Rindal, D. E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-55.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., and Seemüller, E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 59-68.
- Lherminier, J., Courtois, M., and Caudwell, A. 1994. Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence Dorée mycoplasma-like organisms in the host plant *Vicia faba* by ELISA and immunocytochemistry. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 45: 125-138.
- Liu, D., and Trumble, J. T. 2004. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 97: 1078-1085.
- Liu, D., and Trumble J. T. 2005. Interactions of plant resistance and insecticides on the development and survival of *Bactericerca cockerelli* [Sulc] (Homoptera: Psyllidae). *Crop Protection* 24: 111-117.
- Liu, D., Stouthamer, R. and Trumble J. T. 2006a. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericerca cockerelli*) into western North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. The Netherlands Entomological Society 118: 177-183.
- Liu, D., Johnson, L., and Trumble J. T. 2006b. Differential responses to feeding by the tomato/potato psyllid between two tomato cultivars and their implications in establishment of injury levels and potential of damaged plant recovery. *Insect Science* 13: 195-204.
- List, G. M. 1939. The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch, and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Journal of Economic Entomology* 32: 30-36.
- Marcone, C., Hergenbahn, F., Ragozzino, A., and Seemüller, E. 1999. Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, picris echinoides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *Journal of Phytopathology* 147 (3): 187.
- Marcone, C., and Seemüller, E. 2001. A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology* 147: 1213-1221.

- Marín, J. A., Garzón, T. J. A., Becerra, F. A., Mejía, A. C., Bujanos, M. R., y Byerly, M. K. F. 1995. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 38 pp. 25-32.
- Martínez, S., Cordova, I., Maust, C., Oropeza, C., and Santamaria, M. J. 2000. Is abscisic acid responsible for abnormal stomatal closure in coconut palms showing lethal yellowing. *Journal of Plant Physiology* 156: 319-322.
- Marschner, H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. Timber Press, San Diego, Cal. 889 p.
- Mauricio, C. J. A., Argüello, A. G. R., Alpuche, S. A. G., Monreal V. C. T., Díaz, G. O., and De La Torre, A. R. 2006. First Report of Tomato severe leaf curl virus in México. *Plant Disease* 90: 1116.
- Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, M. J., and Oropeza, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93: 976-981.
- Maxwell, P. D. 2002. Molecular characterization of tomato-infecting Geminiviruses in Central America and an overview of the tomato crisis in the Dominican Republic. In: Frampton, A. J. and Francis, M. J. *Tomato Breeders' Round Table 2001. Horticultural and Crop Science Series 724*: 29 p.
- Mazhar, H., Shahid, M., Shazia, I., Ayesha, N. F., and Yusuf, Z. 2005. The Nuclear Shuttle Protein of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus Is a Pathogenicity Determinant. *Journal of Virology* 79 (7): 4434-4439.
- McCoy, R., Caudwell, E. A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., de Leeuw, G. T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marvitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M., and Seemüller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms, pp. 545-640. In: Whitcomb, R. F. and Tully, J. C. (ed.), *The mycoplasmas, vol. 5. Spiroplasmas, achleplasmas, and mycoplasmas of plants and arthropods*. Academic Press Inc., San Diego, California.
- Melamed, S., Tanne, E., Ben-Haim, R., Edelbaum, O., Yogeve, D., and Sela, I. 2003. Identification and characterization of phytoplasmal genes, employing a novel method of isolating phytoplasmal genomic DNA. *Journal of Bacteriology* 185 (22): 6513-6521.
- Miyata, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Ugaki, M., and Namba, S. 2003. Two different thymidylate kinase gene homologues, including one that has catalytic activity, are encoded in the onion yellows phytoplasma genome. *Microbiology* 149: 2243-2250.

- Morales, F. J., and Anderson, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146: 415-441.
- Morton, A., Davies, D. L., Blomquist, C. L., and Barbara, D. J. 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology* 4 (2): 109-114.
- Mounsey, K. E., Streten, C., and Gibb, S. K.*†. 2006. Sequence characterization of four putative membrane-associated proteins from sweet potato little leaf strain V4 phytoplasma. *Plant Pathology* 55: 29-35.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 36-45 p.
- Mumford, R. A., Jarvis, B., and Skelton, A. 2004. The first report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in commercial tomatoes in the UK. *Plant Pathology* 53: 242.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., and Tsuchizaki, T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 786-791.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2002. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298: 195-201.
- Ochoa, M. L. D. 2005. Enfermedades de origen viral. pp. 191-205. In: Bautista, M. N., y Alvarado, L. J. Producción de jitomate en invernadero. Colegio de Postgraduados, México.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36: 27-29.
- Paplomatas, E. J. 1994. Molecular characterization of a new sap-transmissible bipartite genome geminivirus infecting tomatoes in Mexico. *Phytopathology* 84: 1215-1224.
- Parry, D. 1990. *Plant pathology in agriculture*. Cambridge University Press. 36-38 pp.
- Pavlista, A. 2002. Potato (tomato) psyllids. *Nebraska Potato Eyes* 14 (2): 1-4.

- Polston, J. E., and Anderson, P. K. 1997. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358-1369.
- Regenmortel, M. H. V., Bishop, D. H., Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., and Calisher, C. H. 1997. Guidelines to the demarcation of virus species [news]. *Archives of Virology* 142: 1505-1518.
- Richards, B. L. 1928. A new and destructive disease of the potato in Utah and its relation to potato psylla. *Phytopathology* 18: 140-141.
- Rojas, A., Kvarnheden, A., and Valkonen, J. P. T. 2000. Geminiviruses infecting tomato crops in Nicaragua. *Plant Disease* 84: 843-846.
- Rojas, A., Kvarnheden, A., Marcenaro, D., and Valkonen, J. P. 2005. Sequence characterization of tomato leaf curl Sinaloa virus and tomato severe leaf curl virus: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology* 150 (7): 1281-1299.
- Rojas, R. M., Gilbertson, R. L., Russell, D. R., and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347.
- Rubio, C. R. 2001. Análisis espacio temporal de enfermedades virales en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la Vega de Meztitlán, Hidalgo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México. 90 p.
- Sambrook, D. J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2a Ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor. N. Y. 386-394 pp.
- Sánchez, I. S., Peralta, L. E., y Ancheta, O. 1999. Caracterización ultraestructural del daño producido por fitoplasmas en *Lycopersicon esculentum*. *Revista de Protección Vegetal* 14 (2): 117-120.
- Schall, L. A. 1938. Some factors affecting the symptoms of the psyllid yellows disease of potatoes. *American Potato Journal* 15: 193-212.
- Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, T. M., and Seemüller, E. 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 675-686.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., and B. C. Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas.

pp. 369-380. In: Razin, R., and Tully, J. G., (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Academic Press, San Diego, USA.

Schuler, I. y Orozco. L. A. 2006. Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: Estudio de Caso Colombia. 53 p. http://www.redbio.org/e_casos/colombia.pdf.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and M. Göschl. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.

Siddique, A. B., Guthrie, J. N., Walsh, K. B., White, D. T., and Scott, P. T. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant disease* 82 (10): 1112-1120.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones, Distritos y Cader's de la Sagarpa. 2006. <http://www.siap.gob.mx/>

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H.†, Ugaki, M.†, and Namba, S.†‡. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4252-4257.

Tedeschi, R., and Alma, R. 2004. Transmission of Apple Proliferation Phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 97 (1): 8-13.

Tedeschi, R., Ferrato, V., Rossi, J., and Alma, A. 2006. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55: 18-24.

Trumble, J. 2005. The tomato psyllid: A new problem on fresh market tomatoes in California and Baja Mexico. Universidad de California, Riverside. Department of Entomology. http://ceventura.ucdavis.edu/Vegetable_Crops/Tomato_Psyllid.htm

Uehara, T., Tanaka, M., Shiomi, T., Namba., Tsuchizaki, T., and Matsuda, I. 1999. Histopathological studies on two symptom types of phytoplasma associated with lettuce yellows. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65: 465-469.

Universidad de California. 1998. *Integrated pest management for tomatoes*. 4a edición. 118 p.

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

- Van Loon, L. C. 1987. Disease induction by plant virus. pp. 205-255. In: Maramorosch, K., Murphy, F. A., and Shatkin, A. J. (eds). *Advances in virus research*. Vol. 33. Academic Press Inc.
- Waller, M. J. 2002. *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3a edición. CABI Publishing. 122-139 pp.
- Waterworth, H. E., and Mock, R. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined fruit tree germ plasm. *Plant Disease* 83: 1047-1050.
- Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H.-Y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., and Namba, S. 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology* 94: 244-250.
- Weintraub, P. G. and Beanland, L. 2005. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.
- Welliver, R. 1999. Diseases caused by phytoplasmas. *Regulatory Horticulture* 25 (1): 17-22.
- Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86 (12): 1288-1293.