



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**“POLISONDA PARA DETECTAR MPVd, PepMV Y
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* EN EL
CULTIVO DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*
L.)”**

ERIKA JANET ZAMORA MACORRA

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: Polisonda para detectar MPVd, PepMV y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Realizada por la alumna: Erika Janet Zamora Macorra

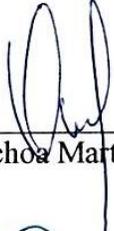
Bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

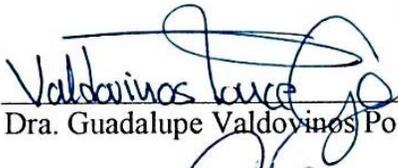
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



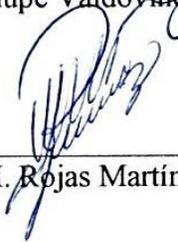
Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez

ASESORA



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESORA



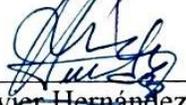
Dra. Reyna I. Rojas Martínez

ASESOR



Dr. Sergio Ramírez Rojas

ASESOR



Dr. Javier Hernández Morales

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto 2016.

POLISONDA PARA DETECTAR MPVd, PepMV Y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN EL CULTIVO DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Erika Janet Zamora Macorra, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicon* L.) es hospedante de diferentes patógenos, entre los cuales el viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd), el virus del mosaico del pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) y la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) pueden ocasionar pérdidas hasta del 100% de la producción. En México sólo existe un reporte de la presencia del MPVd en jitomate cultivado en condiciones de invernadero en el estado de México, en tanto que Cmm y el PepMV se han detectado en Querétaro y Jalisco.

Con la presente investigación se desarrolló una polisonda (poli-3) para detectar de manera simultánea, mediante hibridación molecular no radioactiva, al MPVd, PepMV y Cmm. Se comparó la sensibilidad de las sondas individuales para detectar a cada uno de estos tres patógenos con respecto de la poli-3 y no hubo diferencias entre ellas. La impresión directa de savia del pedicelo de hojas de jitomate infectadas sobre la membrana permitió la detección del virus y del viroide, pero no de la bacteria. Al comparar el límite de sensibilidad de la sonda de Cmm con PCR de punto final, utilizando ADN total de plantas de jitomate infectadas así como de UFC, se encontró que la PCR fue 100 veces más sensible que la hibridación. La sonda de Cmm fue específica a esta especie y no hibridó con el ADN de otras bacterias fitopatógenas. Finalmente, se analizaron muestras de jitomate, colectadas en campo de diferentes localidades productoras, mediante hibridación con la poli-3 y PCR de punto final obteniendo los mismos resultados, por lo que la primera técnica puede ser usada como método de diagnóstico masivo para los tres patógenos.

Palabras clave: Hibridación molecular, virus, viroide, cancro bacteriano, diagnóstico molecular.

POLIPROBE TO DETECT MPVd, PepMV AND *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* IN TOMATO CROP (*Solanum lycopersicum* L.).

Erika Janet Zamora Macorra, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The tomato (*Solanum Lycopersicon* L.) crop is a host of different pathogens, like *Mexican papita viroid* (MPVd), *Cucumber mosaic virus* (PepMV) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). These pathogens can cause losses of almost 100% of production. In Mexico there is only one report of MPVd in tomatoes grown under greenhouse conditions located in state of Mexico, and Cmm and PepMV have been detected in Queretaro and Jalisco.

In this research, a poliprobe (poly-3) was generated to detect at the same time MPVd, PepMV and Cmm using nonradioactive molecular hybridization. We did not detect any difference between the sensitivity of the individual probes respect to the poly-3. The printing of infected tomato leaves on the membrane allowed the detection of the virus or viroid, not bacteria.

Respect to the bacteria, we compared PCR and hybridization sensitivity limits. We found that conventional PCR, using total ADN from infected tomato plants and CFU, is 100 times more sensitive than hybridization. We tested the specificity of Cmm probe and we did not observed any hybridization signal with ADN of other plant pathogenic bacteria.

Finally, to test the effectivity of the poly-3, we collected field samples of tomato plants from different production areas. We analyzed those samples by hybridization and by conventional PCR, and we got the same results either using the poly-3 or PCR. So, we have shown that hybridization using the poly-3 can be used as method of massive diagnostic for the three analyzed pathogens, which includes one bacterium, one virod and one virus.

Keywords: molecular hybridization, virus, viroid, bacterial canker, molecular diagnosis.

DEDICATORIA

- *Este trabajo lo dedico a mis padres Rosa y Rafael. Que desde siempre me han guiado en el camino de la vida, y que ahora estoy aquí por ellos.*
- *A mi hermana Mireya y a toda mi familia (abue, tías, Male). Gracias por sus consejos, palabras y compañía.*
- *A mi sobrino Rafael y ahijada Dariana, que aunque no tengan idea del significado de esto, espero que algún día elijan su propio camino que los lleve al éxito.*
- *A mi compañero de vida Edwin, que siempre me hace reír. Espero que podamos compartir todos los éxitos y fracasos de esta vida.*
- *A mis todos mis amig@s de los laboratorios en los que tuve la dicha de estar: Mari Carmen, Tony, Lorena, Diogo, Jíng-Jíng, Juliana, María, Inma. Gracias a todos por su apoyo, su amistad... En especial a la Dra. Ana María Pastrana, que en los momentos difíciles en los que no conocía a nadie, me acompañó y tendió la mano; generando recuerdos y amistad que me durarán toda la vida.*
- *A mis compañer@s y amig@s del lab. 201 del COLPOS. Norma, Noemí, Tania, Katia, Santo, Paty, Fidel, Lalo. Gracias por su ayuda, apoyo, consejos y amistad. Fue un gusto trabajar a su lado.*
- *Finalmente, agradezco a Dios, pues sin su guía ni siquiera estaría escribiendo esto.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados. Por la beca que me otorgaron para la realización del programa Doctoral y el apoyo para las estancias profesionales.

Al Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, por su guía y sobre todo, la libertad y apoyo para realizar todas las actividades que el posgrado y el impulso me permitió.

Al Dr. Frederic Aparicio Herrero y al Dr. Vicente Pallas. Por la paciencia y apoyo para que pudiera entender el complicado y simple proceso de clonación.

A la Dra. Inmaculada Ferriol Safont y al Profesor Bryce Falk, que a pesar de siempre estar haciendo mil cosas, fueron pacientes y tuvieron el tiempo para explicarme todos los procesos y técnicas. Por el apoyo que me permitió conocer un poquito más de los virus y de la Biología Molecular.

A consejo particular, la Dra. Guadalupe Valdovinos, la Dra. Reyna Rojas, el Dr. Sergio Ramírez y el Dr. Javier Hernández. Por el tiempo y apoyo para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Virus fitopatógenos.....	4
3.1.1. Principales virus en jitomate	4
3.1.2. <i>Pepino mosaic virus (PepMV)</i>	5
3.1.3. Transmisión mecánica.....	8
3.1.4. Transmisión por vectores.....	8
3.1.5. Transmisión por semilla.....	8
3.1.6. Otras formas de transmisión	9
3.1.7. Control	9
3.2. Viroides	10
3.2.1. Principales viroides fitopatógenos	11
3.2.2. Viroides patógenos de jitomate.....	13
3.2.3. Formas de transmisión.....	15
3.2.4. Síntomas ocasionados por viroides.....	15
3.2.5. Síntomas de viroides en jitomate	16
3.2.6. Manejo.....	17
3.2.7. Pérdidas económicas.....	18
3.3. Bacterias fitopatógenas	19
3.3.1. Principales bacterias patógenas en jitomate	20
3.3.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	20
3.3.2.1. Síntomas	21
3.3.2.2. Transmisión.....	22
3.3.2.3. Manejo.....	22
3.4. Métodos de diagnóstico de bacterias fitopatógenas, virus y viroides.....	22

4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Detección de plantas infectadas por <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	26
4.2. Identificación de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	27
4.3. Inoculación de los patógenos en plantas de jitomate	28
4.4. Construcción de las sondas individuales y la poli-3	29
4.5. Hibridación por gota e impresión.....	32
4.6. Sensibilidad de las sondas	33
4.6.1. Sensibilidad de la sonda de Cmm	33
4.7. Especificidad de la sonda de Cmm	34
4.8. Evaluación de las sondas en plantas de jitomate en producción recolectadas en invernadero	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Detección de <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	35
5.2. Identificación de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	36
5.3. Inoculación de los patógenos en plantas de jitomate	36
5.4. Construcción de las sondas individuales y la poli-3	38
5.5. Hibridación por gota e impresión.....	39
5.6. Sensibilidad de las sondas	40
5.6.1. Sensibilidad de la sonda de Cmm	41
5.7. Especificidad de la sonda de Cmm	42
5.8. Evaluación de las sondas en plantas recolectadas en invernadero.....	43
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIÓN	47
10. LITERATURA CITADA	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies del género Potexvirus (ICTV, 2011).	6
Cuadro 2. Especies de viroides reconocidas oficialmente (8 th ICTV).	12
Cuadro 3. Principales técnicas moleculares para la detección de bacterias fitopatógenas y virus (Modificado de López et al., 2006).	23
Cuadro 4. Secuencias de primers, regiones genómicas utilizadas para su síntesis y programas de PCR.....	27
Cuadro 5. Resultados de PCR, RT-PCR e hibridación molecular no radioactiva, de muestras de jitomate colectadas en campo.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> (Cmm) en agar nutritivo (A). Inoculación en plantas de jitomate mediante inyección.	28
Figura 2. Inoculación mecánica del Pepino mosaic virus en jitomate.	28
Figura 3. Secuencia del plásmido pCM2 del gen Pat1 para diseñar los primers de Cmm utilizados en este trabajo.	30
Figura 4. Secuencia del clon pSK/Cmm donde se muestra el fragmento clonado de Cmm - remarcado en negro - en sentido positivo	30
Figura 5. Representación esquemática de los vectores utilizados y los insertos de <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd), <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) y <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> (Cmm) para sintetizar la poli-3.....	31
Figura 6. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR, utilizando extracciones de RNA total de plantas de jitomate con síntomas y primers específicos para MPVd.....	35
Figura 7. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR, utilizando la cepa bacteriana y primers específicos para Cmm. s.	36
Figura 8. Síntomas iniciales en plantas de jitomate infectadas con el MPVd. Se observan clorosis de nervaduras (A), e islas verdes y deformaciones (B).	37
Figura 9. Plantas de jitomate infectadas con el MPVd con síntomas de enación (A), clorosis (B) y coloración purpura (C). Frutos deformes y pequeños (D) corresponden a los síntomas típicos en etapas avanzadas de la enfermedad.....	37

Figura 10. Síntomas observados en hojas y tallos de plantas de jitomate inoculadas con Cmm.....	38
Figura 11. Secuencia del vector pSK/Cmm/PepMV/MPVd utilizado para sintetizar la poli-3.....	39
Figura 12. Hibridación molecular no radioactiva de la polisonda (Poli-3) con impresiones directas de pecíolos de plantas de jitomate infectadas con <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV), <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	39
Figura 13. Detección de <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV), <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) mediante hibridación molecular no radioactiva con diferentes sondas: A: poli-3; B: sonda MPVd; C: sonda PepMV; D: sonda Cmm.	40
Figura 14. Detección de <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV), <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) mediante hibridación molecular no radioactiva con diferentes sondas: A: poli-3; B: sonda PepMV; C: sonda MPVd; D: sonda Cmm.	40
Figura 15. Sensibilidad de la sonda para <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm). Hibridación molecular no radioactiva de la poli-3 (1) y la sonda Cmm (2) (A)..	41
Figura 16. Detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) en ácidos nucleicos extraídos de plantas sanas más suspensión bacteriana.	42
Figura 17. Hibridación molecular no radioactiva de la sonda específica a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) utilizando suspensiones de diferentes especies bacterianas.....	42
Figura 18. Detección del <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV), <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) en hojas de jitomate recolectadas en invernaderos de Montecillo, Yecapixtla y Zacualpan. Hibridación molecular.....	43
Figura 19. Detección del <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV), <i>Mexican papita viroid</i> (MPVd) y <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) en hojas de jitomate recolectadas en invernaderos de Montecillo, Yecapixtla y Zacualpan. Productos de PCR.....	44
Figura 20. Plantas de jitomate infectadas con Cmm encontradas durante los muestreos en campo y corte transversal del tallo donde se observa el crecimiento bacteriano amarillo.	45

1. INTRODUCCIÓN

En México, la horticultura es una actividad agrícola de importancia social y económica por la captación de divisas y la generación de empleos (Sandoval, 2004). El jitomate o tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza con mayor índice de comercialización en todo el mundo, por lo que la demanda de este producto aumenta constantemente y con ello la superficie cultivable, producción y rendimiento (Santiago *et al.*, 1988). A nivel mundial, el jitomate ocupa el décimo lugar en producción anual de 161 793 834 t (FAOSTAT, 2012) y a nivel nacional se encuentra en el décimo primer lugar con una superficie sembrada de 52 375 ha, siendo Sinaloa y Michoacán las entidades más productivas, y con un valor generado de aproximadamente 16 mil millones de pesos (SIAP, 2014).

El jitomate es afectado por diversas plagas, dentro de las cuales destacan los virus, viroides y bacterias. Los virus son moléculas infecciosas de ADN o ARN rodeado por proteínas, y constituyen el segundo grupo más importante de patógenos en las plantas (Arauz, 1998). El combate de cualquier virus fitopatógeno es preventivo, pues una vez que infecta la planta no puede hacerse nada para eliminarlo selectivamente (Arauz, 1998). El *Pepino mosaic virus* (PepMV) ocasiona una de las principales enfermedades en jitomate cultivado en invernadero y se transmite fácilmente de manera mecánica; este patógeno redujo la producción del fruto hasta en 38% en la Unión Europea (Hanssen y Thomma, 2010), aunque en México se encontró afectando el 50% de los frutos en un invernadero (Ling y Zhang, 2011).

Los viroides son un grupo de patógenos similares a los virus, pero carecen de proteínas y están constituidos de una cadena circular de ARN de bajo peso molecular cerrada covalentemente (Di Serio y Flores, 2008). Tanto virus como viroides pueden replicarse de forma autónoma, utilizando el sistema de transcripción de la célula hospedante (Flores *et al.*, 1998). Los principales síntomas ocasionados por viroides son clorosis, reverdecimiento, amarillamiento, lesiones necróticas foliares y fuerte reducción del crecimiento (Flores y Durán-Vila, 1996). Actualmente, se han descrito 33 especies fitopatógenas (Di Serio y Flores, 2008), algunas de las cuales han causado severas pérdidas económicas a nivel mundial, como el *Potato spindle tuber viroid* que en Canadá ocasionó una reducción de la producción de papa en 64% (Singh, 1971) y actualmente se considera un patógeno

importante en papa y tomate (Owens y Verhoeven, 2009). En México, se encontró al *Tomato chlorotic dwarf viroid* y al *Mexican papita viroid* (MPVd) afectando, de manera simultánea, plantas de jitomate producidas en grandes extensiones de invernaderos de alta tecnología (Ling y Zhang, 2009).

Por otro lado, muchas bacterias son fitopatógenos procariontes que causan enfermedades importantes en diversos cultivos (Vidhyasekaran, 2002). El cancro, provocado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), es una enfermedad severa que se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de jitomate del mundo y cuyo manejo implica una importante pérdida económica (Chang *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1991). En México, esta enfermedad está clasificada como A2 (presente pero delimitada a algunas regiones) (EPPO, 2010).

Las tácticas de manejo de cualquier patógeno requieren en primera instancia de un diagnóstico oportuno basado en su correcta identificación. La dificultad de esto radica en que es frecuente observar varios patógenos afectando a un cultivo al mismo tiempo, además de que varias enfermedades producen síntomas similares. Por esto, es necesario desarrollar técnicas de identificación precisas para detectar oportuna y simultáneamente a los patógenos, y que permitan además procesar un gran número de muestras (De Boer y López, 2012).

En algunos casos, los resultados de técnicas basadas en PCR para la detección de virus y viroides pueden ser inconsistentes debido a su baja concentración en las plantas, a condiciones ambientales y a la presencia de inhibidores de la reacción (fenoles, taninos y polisacáridos). Por otro lado, técnicas serológicas como ELISA pueden utilizarse para analizar un mayor número de muestras, lo cual reduce considerablemente los costos, particularmente en el caso de la inmunopresión (immuno-printing-ELISA), pero tienen la desventaja de ser menos sensibles que la PCR y no se puede utilizar para la detección de viroides (James *et al.*, 2006).

En cuanto a la detección de bacterias, los métodos serológicos más utilizados para Cmm son la inmunofluorescencia y ELISA (de León *et al.*, 2011); no obstante, las técnicas moleculares que utilizan el ADN bacteriano, como PCR, son más específicas (Pallás *et al.*, 2008), aunque la presencia de diversos compuestos en los extractos vegetales, como se indicó antes, pueden inhibir la reacción (de León *et al.*, 2008a; Dreier *et al.*, 1995). Debido a lo anterior, se recomienda siempre un pre-enriquecimiento bacteriano en medio de cultivo para tener colonias visibles que se puedan

caracterizar y seleccionar, aunque este proceso puede tardar hasta 14 días, lo que aumenta el costo y retrasa la obtención del resultado (de León *et al.*, 2008b).

Actualmente, se han desarrollado métodos que permiten realizar detecciones simultáneas de virus y bacterias. Por ejemplo, mediante Multiplex-PCR se han podido detectar seis virus en una sola prueba (Bertolini *et al.*, 2001) y con PCR en tiempo real ha sido posible la detección de PepMV y Cmm (Johnson y Walcott, 2012). Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de estas técnicas requieren equipo y personal altamente especializado, dificultando su uso extensivo además de aumentar el costo del diagnóstico.

Con la técnica de hibridación molecular no radioactiva se han hecho detecciones simultáneas de hasta ocho virus y dos viroides con polisondas (Peiró *et al.*, 2012). Actualmente se están desarrollando polisondas capaces de detectar hasta 18 virus de manera simultánea, lo que disminuye costos y tiempo, y es aplicable para virus con genoma de ADN y ARN (James *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado que las polisondas que detectan diversos virus y viroides en frutales (Peiró *et al.*, 2012; Herranz *et al.*, 2005), jitomate (Aparicio *et al.*, 2009) y vid (Zhang *et al.*, 2012) son tan sensibles como las sondas individuales; e incluso, se ha demostrado que las sondas individuales pueden utilizarse para el diagnóstico masivo de plantas en programas de certificación de jitomate (Saldarelli *et al.*, 1996). Sin embargo, la hibridación molecular no radioactiva es menos sensible que RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa) para detectar virus y viroides, pero tiene igual o mayor sensibilidad que DAS-ELISA (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009; Sánchez-Navarro *et al.*, 1998).

La hibridación molecular no radioactiva con sondas específicas también se ha utilizado para la detección de algunas bacterias fitopatógenas a partir de cultivos bacterianos puros (Fanelli *et al.*, 2007). No se ha utilizado como método de diagnóstico en plantas infectadas naturalmente debido a que podrían presentarse problemas de especificidad y con ello la presencia de falsos positivos o negativos (Pallás *et al.*, 2008).

En algunos invernaderos de productores que usan alta tecnología para producir jitomate en México, se han registrado plantas infectadas por MPVd, PepMV y Cmm ocasionando pérdidas económicas por la disminución del rendimiento y por el costo de las medidas establecidas para hacer un manejo

fitosanitario. Derivado de esto último, surgió la necesidad de contar con una técnica de diagnóstico rápida, confiable para estos tres patógenos, que permitiera su detección oportuna y con ello hacer posible que las medidas de manejo sean más eficientes.

Con base en lo anterior, se realizó la presente investigación con el siguiente objetivo:

2. OBJETIVO

- Desarrollar y evaluar una polisonda para la detección rápida y sensible del *Mexican papita viroid*, *Pepino mosaic virus* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de jitomate.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Virus fitopatógenos

Los virus son moléculas de ADN o ARN y proteínas que dependen de su información genética y de los materiales presentes en la célula hospedante para replicarse. Los virus son isométricos, alargados, en forma de bastones rígidos, flexibles o baciliformes. La mayoría de los virus miden de 0.01 a 1 μm de longitud y conforman el segundo grupo de patógenos más importante en las plantas cultivadas. Se han documentado pérdidas severas en áreas agrícolas extensas a causa de las enfermedades provocadas por estos patógenos como la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*), la mancha anular del papayo (*Papaya ring spot virus*), el complejo de geminivirus en tomate, frijol y yuca (*Tomato yellow leaf curl virus* y *African cassava mosaic virus*), y los virus que afectan frutales de hueso (*Potato virus Y* y *Plum pox virus*) (Arauz, 1998; Scholthof *et al.*, 2011).

3.1.1. Principales virus en jitomate

Las enfermedades causadas por virus en el cultivo del jitomate son importantes pues han provocado graves pérdidas económicas. De acuerdo con Nuez (2001), los virus en jitomate pueden ocasionar

gran diversidad de síntomas en prácticamente todos los órganos de la planta. En hojas se puede presentar mosaico, amarillamiento, manchas cloróticas, tonos violáceos, bronceado, plateado y necrosis; apuntamiento de folíolos, filimorfismo, enrollado, acucharado, rizado o enchinamiento); y reducción del tamaño y pequeñas verrugas). En tallos se observan cambios de color, estrías necróticas, necrosis apical, necrosis vascular, arrosamiento, bronceado y proliferación. En flores pueden ocasionar esterilidad, abscisión o aborto, necrosis y deformaciones. En frutos se inducen mosaicos, reducción del tamaño, necrosis subepidérmicas, manchas necróticas, manchas anulares, manchas con vejigas, manchas apicales y deformaciones, entre otras alteraciones.

En México, los virus en jitomate son muy importantes debido a las pérdidas que ocasionan en la producción y al elevado costo que genera su manejo. En diversas zonas productoras, como en Morelos, el impacto de estos patógenos ha sido devastador (Bautista *et al.*, 2010). En el mundo, se conocen al menos 136 virus que pueden infectar al jitomate (Bautista *et al.*, 2010), pero en nuestro país los más importantes que se han identificado son los siguientes:

- Complejo viral conformado por *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Tomato Spotted wilt virus* (TSWV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV) y *Alfalfa mosaic virus* (AMV) (Ramírez *et al.*, 2001).
- *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Conti *et al.*, 2000).
- *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Stace-Smith, 1970).
- *Potato virus Y* (PVY) (de Bokx y Huttinga, 1981).
- *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Martínez, 1974).
- *Tomato aspermy virus* (TAV) (Hollings y Stone, 1971).
- Pepino mosaic virus (PepMV) (Ling y Zhang, 2011).

3.1.2. *Pepino mosaic virus* (PepMV)

Actualmente, de acuerdo con el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), el PepMV pertenece al Orden Tymovirales, familia Alphaflexiviridae y género *Potexvirus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies del género Potexvirus (ICTV, 2011).

Especies	Acrónimo
<i>Alstroemeria virus X</i>	AlsVX
<i>Alternanthera mosaic virus</i>	AltMV
<i>Asparagus virus 3</i>	AV-3
<i>Bamboo mosaic virus</i>	BaMV
<i>Cactus virus X</i>	CVX
<i>Cassava common mosaic virus</i>	CsCMV
<i>Cassava virus X</i>	CsVX
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV
<i>Commelina virus X</i>	ComVX
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	CymMV
<i>Daphne virus X</i>	DVX
<i>Foxtail mosaic virus</i>	FoMV
<i>Hosta virus X</i>	HVX
<i>Hydrangea ringspot virus</i>	HdRSV
<i>Lettuce virus X</i>	LVX
<i>Lily virus X</i>	NMV
<i>Malva mosaic virus</i>	MaMV
<i>Mint virus X</i>	MVX
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV
<i>Nerine virus X</i>	NVX
<i>Opuntia virus X</i>	OpVX
<i>Papaya mosaic virus</i>	PapMV
<i>Pepino mosaic virus</i>	PepMV
<i>Phaius virus X</i>	PhaVX
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV
<i>Plantago severe mottle virus</i>	PISMoV
<i>Plantain virus X</i>	PIVX
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	PAMV
<i>Potato virus X (especie tipo)</i>	PVX
<i>Schlumbergera virus X</i>	ScaVX
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	SMYEV
<i>Tamus red mosaic virus</i>	TRMV
<i>Tulip virus X</i>	TVX
<i>White clover mosaic virus</i>	WCIMV
<i>Zygocactus virus X</i>	ZVX

En el género *Potexvirus* se incluyen 35 especies que presentan partículas filamentosos y flexibles de entre 470 y 580 nm de longitud y 13 nm de diámetro, con simetría helicoidal y genoma de ARN de

cadena simple (Adams *et al.*, 2004). Específicamente, las partículas del PepMV miden 510 nm de longitud y 12.5 nm de diámetro, aproximadamente (Córdoba, 2010). Este virus es un problema en el cultivo de jitomate producido en invernadero. De acuerdo con los resultados de una encuesta realizada a productores de la Unión Europea, las pérdidas en campo causadas por este patógeno varían del 5 al 40% (Hanssen *et al.*, 2009). En México se ha reportado afectando el 50% de los frutos (Ling y Zhang, 2011).

El PepMV se describió por primera vez en Perú en un cultivo de pepino (*Solanum muricatum*) en 1980 (Jones *et al.*, 1980) y en 1999 se observó en jitomate cultivado en invernadero en Holanda (Van der Vlugt *et al.*, 2000). Desde entonces el virus se ha diseminado a diversas zonas productoras de jitomate en Alemania (Lesemann, 2000), Bélgica, Reino Unido (Mumford y Metcalfe, 2001), Italia (Roggero *et al.*, 2001), Estados Unidos y Canadá (French *et al.*, 2001), Francia (Cotillon *et al.*, 2002) y Austria (Verhoeven *et al.*, 2003). En México se detectó por primera vez en el 2010, en Jocotitlan (Ling y Zhang, 2011). Desde el año 2001, el PepMV forma parte de la lista de alerta de la EPPO como organismo con riesgo fitopatológico para diversos cultivos (EPPO, 2003).

Aunque por el momento el PepMV solo infecta de forma natural a *S. muricatum* y *S. lycopersicum*, (Jones *et al.*, 1980; van der Vlugt *et al.*, 2000), se ha detectado también en hospederos silvestres asintomáticos como *Lycopersicon chilense*, *L. peruvianum* y *L. pimpinellifolium* (Jones *et al.*, 1980); y mediante inoculación mecánica se ha logrado infectar berenjena (*Solanum melongena*), papa (*S. tuberosum*), chile (*Capsicum annuum*), tabaco (*Nicotiana benthamiana*), toloache (*Datura stramonium*), y tomatillo (*Physalis floridana*) (Jones *et al.*, 1980; Martin y Mousserion, 2002; Salomone y Roggero, 2002; Verhoeven *et al.*, 2003). Recientemente, se reportó un nuevo hospedante natural (*Ocimum basilicum*; Lamiaceae) que no pertenece a la familia Solanaceae (Davino *et al.*, 2009).

Este potexvirus induce una gran variabilidad de síntomas que dependen del aislamiento, la variedad de jitomate, temperatura e intensidad lumínica:

- En planta joven, aparecen ampollas en el haz de los folíolos de coloración verde más oscura que el resto del limbo. El folíolo se estrecha, su margen es menos dentado y toda la hoja se alarga ocasionando filimorfismos muy acentuados (Wright y Mumford, 1999). En hojas

maduras se observa mosaico clorótico de diferentes tonalidades, manchas cloróticas entre las nervaduras, mosaico de color verde, malformación y achaparramiento (Salomone y Roggero, 2002).

- En tallos y pecíolos se forman estrías longitudinales decoloradas (Salomone y Roggero, 2002).
- En frutos, en donde se presenta el síntoma más grave, se observan manchas amarillentas o verdes (jaspeado) debido a una distribución anormal del licopeno (Salomone y Roggero, 2002) y deformación del fruto (Ling y Zhang, 2011), demeritando así su valor comercial (Spence *et al.* 2006).

3.1.3. Transmisión mecánica

El PepMV puede transmitirse fácilmente de forma mecánica, mediante las herramientas utilizadas en las labores culturales, ropa contaminada, manejo de las plantas con las manos y el contacto directo entre plantas (Jones *et al.*, 1980; Spence *et al.*, 2006).

3.1.4. Transmisión por vectores

No se ha demostrado que los insectos vectores de otros virus, que normalmente afectan al jitomate como los áfidos y las mosquitas blancas, transmitan al PepMV (Jones *et al.*, 1980; Loomans *et al.*, 2000); pero los abejorros, utilizados frecuentemente para polinizar, contribuyen en la diseminación de este patógeno (Shipp *et al.*, 2008). También se ha documentado que *Olpidium virulentus*, habitante del suelo, aumenta la dispersión del virus en un 8% (Alfaro-Fernández *et al.*, 2009).

3.1.5. Transmisión por semilla

El porcentaje de transmisión del PepMV por semilla va del 0.005 (Hanssen *et al.* 2010) al 25% (Córdoba-Sellés, 2007), por lo que las semillas infectadas pueden ser la principal fuente de inóculo primario y la principal vía de dispersión mundial que explicaría su aparición en Marruecos, Finlandia, Suecia, Eslovaquia, Bulgaria, Noruega, Dinamarca, Ucrania, Polonia, Hungría, Chile (Anónimo, 2005) y Ecuador (Soler *et al.*, 2005).

3.1.6. Otras formas de transmisión

En papa, el PepMV se transmite a través de tubérculos infectados (van der Vlugt, 2000). Se ha reportado también su diseminación eficiente a través de los sistemas de agua de riego recirculante (Schwarz *et al.*, 2009).

3.1.7. Control

Existen métodos de termoterapia o quimioterapia para eliminar al PepMV, los cuales están limitados a programas de producción de material vegetativo (Arauz, 1998), por lo que la mayoría de las estrategias de control se han dirigido a prevenir la infección, evitando su entrada y establecimiento en nuevas zonas de cultivo (Anónimo, 2009). Por lo anterior, las prácticas preventivas son de uso frecuente para su manejo, siendo las más recomendadas las siguientes (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007; Córdoba, 2010; Cooke, 2010):

- Usar variedades resistentes o tolerantes al virus.
- Eliminar los restos del cultivo anterior, de ser posible sacar la planta completa y llevarla a un vertedero controlado, ya que bajo condiciones naturales de cultivo, el virus puede permanecer al menos tres meses en los residuos, constituyendo un foco de infección secundaria importante si las plantas no se destruyen.
- Eliminar las malas hierbas dentro y fuera del invernadero, independientemente de si hay o no cultivo establecido.
- Desecar el sustrato en cultivos sin suelo (durante 6 semanas) y/o desinfestación de los mismos.
- Desinfestar el sistema de riego.
- Realizar una correcta desinfestación de las estructuras, instalaciones, maquinaria, herramientas, guantes, etc., antes de la plantación.
- Emplear plántulas procedentes de semilleros autorizados, con garantía sanitaria (certificado fitosanitario).
- Evitar el paso de personal no autorizado a los invernaderos, usar batas, no tocar las plantas y desinfestar continuamente las navajas al realizar los injertos.

- Desinfestar las semillas sumergiéndolas en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3 horas.

Durante el cultivo (Anónimo, 2009):

- Realizar inspecciones periódicas en el invernadero y eliminar las plantas con síntomas así como las inmediatamente próximas, introduciéndolas en una bolsa y sacándolas del terreno de cultivo sin tocar ninguna otra.
- Evitar que el personal pase del invernadero afectado a otros invernaderos. Si no es posible, deben cambiarse ropa, zapatos y equipos de protección cuando pasen de un invernadero a otro.
- Realizar desinfecciones de las herramientas de trabajo y poda entre líneas de la plantación lo más frecuentemente posible.
- Desinfestar las herramientas de trabajo con lejía al 5 %, sumergiéndolos durante media hora y cambiar frecuentemente esta solución.
- Usar ropa de protección corporal desechable en invernaderos afectados.
- Marcar la zona afectada para que los trabajadores inicien sus labores en el área no afectada y terminen en la zona afectada, e invertir el sentido de la manipulación.

3.2. Viroides

Los viroides son los agentes infecciosos de menor complejidad estructural y genética que los virus. Están constituidos exclusivamente de una cadena circular de ARN, cerrada covalentemente y de bajo peso molecular (246 a 401 nucleótidos de longitud). Se diferencian de los virus porque su ARN no está envuelto en proteína, no codifica ninguna proteína (Ding, 2009; Di Serio y Flores, 2008), no tiene actividad de ARN mensajero y se replican de forma autónoma utilizando el sistema de transcripción de la célula hospedante. Algunos viroides son patogénicos y otros se replican sin causar síntomas (Flores *et al.*, 1998). Muchas enfermedades ocasionadas por viroides fueron erróneamente adjudicadas a virus (Flores, 2011).

La secuencia de nucleótidos de la mayoría de los viroides tiene muchas variantes. En algunos casos, estas secuencias se han relacionado con la severidad de los síntomas o con diferentes aislamientos de viroides (Visvader y Symons, 1985; Herold *et al.* 1992; Gora *et al.*, 1994). Se considera que los

aislamientos que tienen en su secuencia más del 90% de similitud, son variantes de un viroide particular, y si es menor del 90%, se consideran como una especie distinta (Flores *et al.*, 1998).

3.2.1. Principales viroides fitopatógenos

La gama de hospedantes de los viroides es muy variable y amplia, ya que pueden infectar monocotiledóneas y dicotiledóneas, leñosas y herbáceas (Flores *et al.*, 2005).

En 1922, se describió por primera vez la enfermedad del tubérculo fusiforme de la papa, pero fue a finales de la década de 1960 cuando se estableció que era un patógeno subviral. La comparación de muestras de plantas infectadas con preparaciones de virus mediante análisis de sedimentación y electroforesis, mostró que contenían ARNs de bajo peso molecular (Diener, 1971).

El término viroide se estableció para describir al *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), agente causal del tubérculo fusiforme de la papa, con base en la similitud de los síntomas que induce con los causados por virus (Diener, 1971). Posteriormente se describieron otros dos viroides: *Citrus exocortis viroid* (viroide de la exocortis de los cítricos, CEVd) (Semancik *et al.*, 1973) y *Chrysanthemum stunt viroid* (viroide del enanismo del crisantemo, CSVd) (Diener y Lawson, 1972).

A la fecha se han descrito 33 viroides, los cuales están clasificados por el International Committee on Taxonomy of Viruses (cuadro 2) en las familias *Pospiviroidae*, cuya especie tipo es el PSTVd, y *Avsunviroidae*, cuya especie tipo es el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Di Serio y Flores, 2008). Cada familia está constituida por géneros, y dentro de la especies de cada género se han identificado también numerosas variantes (Flores *et al.*, 1998; 2000).

Cuadro 2. Especies de viroides reconocidas oficialmente (8th ICTV).

Género	Especies	Varian tes	Longitud (nt)	Hospedante (s) natural (es)	Hospedantes emergentes
Familia Pospiviroidae					
Pospiviroid	Potato spindle tuber viroid (PSTVd)*	109	341-364	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	Jitomate (<i>L. icopersicon esculentum</i>), Aguacate (<i>Persea americana</i>)
	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd)	19	348-356	Crisantemo (<i>Chrysanthemum</i> sp.)	
	Citrus exocortis viroid ((CEVd)*	86	366-475	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.), tomate (<i>L. esculentum</i>)	Jitomate (<i>L. esculentum</i>).
	<i>Columnea latent viroid</i> (CLVd)	17	359-456	<i>Columnea</i> , <i>Brunfelsia</i> , <i>Nemathanthus</i>	Jitomate (<i>L. esculentum</i>).
	<i>Iresine viroid</i> (IrVd)	3	370	<i>Iresine</i>	
	Mexica papita viroid (MPVd)*	6	359-360	<i>Solanum cardiophyllum</i>	
	<i>Tomato apical stunt viroid</i> (TASVd)	5	360-363	Jitomate (<i>L. esculentum</i>).	Jitomate (<i>L. esculentum</i>).
	Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)*	2	360	Desconocido	Jitomate (<i>L. esculentum</i>).
	Tomato planta macho viroid (TPMVd)*	2	360	Jitomate (<i>L. esculentum</i>)	
Hostuviroid	<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	144	294-303	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.), vid (<i>Vitis vinifera</i>), <i>Prunus</i> spp.	Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>), pepino (<i>Cucumois sativus</i>)
Cocadviroid	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i> (CCCVd)	8	246-301	Palma de coco (<i>Cocos nucifera</i>)	Palma de aceite africana (<i>Elaeis guineensis</i>), otras monocotiledóneas
	<i>Coconut tinangaja viroid</i> (CTiVd)	2	254	Palma de coco (<i>C. nucifera</i>)	
	<i>Citrus bark cracking viroid</i> (CBCVd)	6	284-286	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.)	
	<i>Hop latent viroid</i> (HLVd)	10	255-256	Lúpulo (<i>H. lupulus</i>)	
Apscaviroid	<i>Apple scar skin viroid</i> (ASSVd)	8	329-333	Manzana (<i>Malus domestica</i>), pera (<i>Pyrus communis</i>)	
	<i>Apple dimple fruit viroid</i> (ADFVd)	2	306	Manzana (<i>M. domestica</i>)	
	<i>Apple fruit crinkle viroid</i> (AFCVd) ^z	29	368-372	Manzana (<i>M. domestica</i>)	
	<i>Australian grapevine viroid</i> (AGVd)	1	369	Vid (<i>V. vinifera</i>)	
	<i>Citrus bent leaf viroid</i> (CBLVd)	24	315-329	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.)	
	<i>Citrus dwarfing viroid</i> (CDVd)	53	291-297	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.)	
	<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> (GYSVd-1)	49	365-368	Vid (<i>V. vinifera</i>)	
	<i>Grapevine yellow speckle viroid-2</i> (GYSVd-2)	1	363	Vid (<i>V. vinifera</i>)	
	<i>Pear blister canker viroid</i> (PBCVd)	18	314-316	Pera (<i>P. communis</i>), Membrillo (<i>Cydonia oblonga</i>)	
Coleviroid	<i>Coleus blumei viroid-1</i> (CbVd-1)	9	248-251	<i>Coleus</i> , <i>Mentha</i> spp.	
	<i>Coleus blumei viroid-2</i> (CbVd-2)	?	295-301		
	<i>Coleus blumei viroid-3</i> (CbVd-3)	3	361-364	<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Melissa officinalis</i>	

Familia Avsunviroidae

<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch viroid (ASBVd)*</i>	83	239-251	Aguacate (<i>P. americana</i>)
<i>Pelamoviroid</i>	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)</i>	21	397-401	Crisantemo (<i>Chrysanthemum</i> sp.)
	<i>Peach latent mosaic viroid (PLMVd)</i>	168	335-351	Durazno, nectarina (<i>Prunus persica</i>)
<i>Elaviroid</i>	<i>Eggplant latent viroid (ELVd)</i>	9	332-335	Berenjena (<i>Solanum melongena</i>)

^x Los nombres de géneros de viroides se derivan de sus respectivas especies tipo (primer listado). ^y Las secuencias están disponibles en la base de datos online de ARN subviral (<http://subviral.med.uottawa.ca>). ^z Especies provisionales (no reconocidas oficialmente). ***Viroides reportados en México** (CABI/EPPO, 2014; Robles-Serna, 1985; Ling y Zhang, 2009; Galindo *et al.*, 1982; De La Torre-A *et al.*, 2002).

Los pospiviroides tienen regiones altamente conservadas en su estructura secundaria en forma de varilla, se replican en el núcleo y se acumulan en el nucléolo; en cambio, los avsunviroides se acumulan y posiblemente se replican en los cloroplastos. Ambos emplean un ciclo continuo de replicación usando diferentes ARN polimerasas ADN-dependientes. La infección sistémica en plantas sucede mediante el paso de una célula a otra, vía plasmodesmos, o por desplazamiento a larga distancia a través del tejido conductor, paralelo al transporte de fotosintatos (Diener, 1987; Flores *et al.*, 2005 y Ding *et al.*, 2005).

La mayoría de viroides pertenecen a la familia Pospiviroidae y al género *Pospiviroid*, en el cual se incluyen 98 especies. Éstos son patógenos que proliferan en plantas desarrolladas en climas cálidos (Singh, 1983) ya que se replican a temperaturas de 25° a 35 °C (Sänger y Ramm, 1975) y a menor temperatura prácticamente no lo hacen (Lizárraga *et al.*, 1980; Paduch-Cichal y Kryczynski, 1987).

3.2.2. Viroides patógenos de jitomate

Desde 1988 se han detectado diversos pospiviroides en plantas de jitomate originarias de diversos países: *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Mishra *et al.*, 1991; Fagoaga y Duran-Vila, 1996), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Leontyeva, 1980; Puchta *et al.*, 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) (Walter *et al.*, 1980; Walter, 1987), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) (Singh *et al.*, 1999), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (Galindo *et al.*, 1982), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Columnea latent viroid* (CLVd) (Matthews-Berry, 2010). Debido a la similitud en sus secuencias, el MPVd y el TPMVd son miembros de una sola especie (Verhoeven *et al.*, 2011).

A pesar de que el PSTVd se describió a finales de la década de 1960, hasta el 2003 se reportó infectando naturalmente a jitomate (Owens, 2007). Se considera que este viroide tiene distribución mundial; sin embargo, actualmente no se encuentra en Estados Unidos. Los principales hospedantes

de importancia económica del PSTVd son papa, jitomate y diversas solanáceas ornamentales, aunque en este último caso por lo general no se observan síntomas (Matthews-Berry, 2010).

El TCDVd se reportó por primera vez afectando jitomate en Canadá (Singh *et al.*, 1999) y posteriormente se encontró en jitomate (Verhoeven *et al.*, 2004) y petunia (*Petunia x hybrida*) en Estados Unidos (Verhoeven *et al.*, 2007), en jitomate en Holanda y Francia, en verbena (*Verbena x hybrida*) en India (Singh y Teixeira da Silva, 2006) y en jitomate en Japón (Matsushita *et al.*, 2008).

El CLVd se encuentra en especies ornamentales como *Brunfelsia erythrophae*, *Columnnea undulate* y *Nematanthus wettsteini*; sin embargo, un análisis retrospectivo de muestras de brotes de viroides en Holanda y Bélgica mostró que puede infectar también jitomate. Además, en 2007, el CLVd se detectó en cuatro cultivos de jitomate en el Reino Unido y en uno de Francia (Matthews-Berry, 2010).

El CEVd tiene distribución mundial, principalmente en cítricos, pero en Europa es limitada. Hay pocos reportes de infecciones naturales en jitomate, principalmente en la India y en Holanda (Matthews-Berry, 2010).

El TASVd se detectó en invernaderos productores de jitomate en Israel, y en el 2000 se consideró como un patógeno severo en este cultivo. También reportó en Alemania y Holanda afectando otras especies de solanáceas (Antignus *et al.*, 2002).

El MPVd se considera como el antecesor de todos los viroides, se identificó en 1996 por primera vez en México en plantas de papita silvestre (*S. cardiophyllum*) (Martínez-Soriano *et al.*, 1996) y en 2008 se encontró por primera vez en Canadá infectando un cultivo de jitomate (Ling y Bledsoe, 2009). Sin embargo, debido a la gran similitud con la secuencia del TPMVd, Verhoeven *et al.* (2011) sugieren considerar al MPVd como una variante del TPMVd.

En México, a inicios de 2008, en un cultivo de jitomate (*S. lycopersicum*) en invernaderos, se encontraron plantas con síntomas de infección por viroides. Inicialmente, las plantas enfermas se confinaron en un invernadero de 5 ha, pero la enfermedad se dispersó rápidamente a otros dos invernaderos. A finales de ese mismo año, aproximadamente 5 % de las plantas de jitomate distribuidas en 25 ha de invernadero estaban infectadas. Se encontró que el MPVd y el TCDVd

fueron los responsables de dicha enfermedad; ésta fue la primera evidencia de mezclas de infección con dos viroides que infectan jitomate en México (Ling y Zhang, 2009).

3.2.3. Formas de transmisión

Se demostró que los viroides se transmiten fácilmente por inoculación mecánica y se dispersan eficientemente por contacto con herramientas utilizadas en la poda, mediante la ropa, la manipulación del cultivo con las manos y el contacto directo entre plantas (Hammond y Owens, 2006). Dependiendo del viroide y de la planta hospedante, estos patógenos pueden transmitirse también mediante semillas, propagación vegetativa, injertos, polen e insectos (Verhoeven *et al.*, 2004). Es por ello que la ocurrencia inicial de algunas enfermedades causadas por viroides en campo e invernadero se debe al uso de semilla infectada.

Generalmente, todos los pospiviroides se transmiten de forma mecánica; el TCDVd y el PSTVd además se puede dispersar mediante semilla (Matthews-Berry, 2010). Se demostró que la transmisión horizontal ocurre con el ASBVd en aguacate (Whitesell, 1952) y con el PSTVd en jitomate y pepino (Hollings y Stone, 1973), pero no con el TPMVd (Galindo, 1987).

Se demostró que la transmisión por polen es posible para varios viroides en jitomate (Kryczynski, *et al.*, 1988) y, en el caso particular del TASVd, se encontró que los abejorros pueden transmitirlo durante la polinización (Matthews-Berry, 2010). Solo se comprobó la transmisión por insectos del TPMVd, donde *Myzus persicae* pudo transmitirlo de *Physalis foetens* a jitomate (Galindo *et al.*, 1986).

3.2.4. Síntomas ocasionados por viroides

Las plantas herbáceas y ornamentales infectadas por viroides frecuentemente muestran clorosis, reverdecimiento, amarillamiento, lesiones necróticas en el limbo y venas, epinastia y alteraciones en la forma, tamaño y fragilidad de la hoja. En general, las plantas infectadas son enanas por el acortamiento de entrenudos (Flores y Durán-Vila, 1996).

En plantas leñosas y arbóreas, su latencia puede ser de varios años. Los síntomas más comunes son lesiones en la corteza del tronco o tallos (grietas, acanaladuras, escamas, descortezamiento, proyecciones acompañadas por exudaciones o impregnaciones de goma, etc.); los frutos pueden

presentar alteraciones en la forma, tamaño y coloración, por ejemplo: moteado, manchas, canchales y suberización (Flores y Rodríguez, 1981; Flores y Durán-Vila, 1996).

En general, los síntomas son muy variables y la severidad de éstos dependerá del viroide, el hospedante y las condiciones ambientales (Verhoeven, 2007). Por ejemplo, en los invernaderos (donde generalmente se tiene alta temperatura y luminosidad) se favorece la multiplicación de los viroides, resultando en una mayor severidad de los síntomas (Sänger y Ramm, 1975).

Aunque los viroides se descubrieron por su asociación con enfermedades específicas, ahora se conoce que no todas las plantas infectadas por estos patógenos expresan síntomas. En algunos casos, un viroide podría estar latente en un hospedante y mostrar síntomas en otro (Hammond y Owens, 2006). Un ejemplo es el *Columnea latent viroid*, el cual se aisló de plantas de *Columnea erythrophae* aparentemente sanas y al ser inoculado en papa causó síntomas severos (Flores y Randles, 2003).

Por otra parte, en hospedantes susceptibles a la infección con distintos viroides, como los cítricos y la vid, es frecuente encontrar infecciones múltiples (Flores *et al.*, 1985; Semancik *et al.*, 1988; Durán-Vila *et al.*, 1991; Szychowski *et al.*, 1991) por lo que los síntomas podrían ser diferentes a los esperados. Por ejemplo, una planta de jitomate puede ser infectada simultáneamente por los viroides TCDVd y PSTVd haciendo difícil distinguir a un viroide de otro solamente por los síntomas (Verhoeven *et al.*, 2004).

3.2.5. Síntomas de viroides en jitomate

Los síntomas ocasionados por PSTVd pueden ser variables. En plantas maduras, los síntomas aparecen en la parte apical. Las hojas se tornan amarillentas y tienen un matiz violáceo con las nervaduras centrales de color verde brillante; son más pequeñas de lo normal, se agrupan en racimo, se enroscan, distorsionan y se vuelven quebradizas. En los casos severos hay necrosis de las nervaduras y las hojas mueren (NSW Government, 2012). Los entrenudos son cortos por lo que los brotes parecen atrofiados. Con frecuencia, los síntomas no son obvios hasta después de 2 a 3 semanas de haber plantado el jitomate. Generalmente después de que 5 ramilletes florales se han desarrollado, y comúnmente hay aborto de flores. La fruta infectada puede ser pequeña, dura, con manchas verde oscuro y con maduración irregular (Matthews-Berry, 2010).

En el caso del TCDVd los primeros síntomas aparecen después de 3 a 6 semanas de iniciar la infección; se observa reducción del crecimiento y amarillamiento de hojas (clorosis) en las zonas jóvenes y terminales de la planta. Con el tiempo, las plantas infectadas no se desarrollan, pues hay una reducción de follaje y frutos, que con el tiempo las zonas cloróticas se tornan color bronce y/o púrpura; las hojas y peciolo pueden mostrar lesiones necróticas y volverse quebradizas y deformes (epinastia). En casos extremos, las plantas infectadas mueren (Matthews-Berry, 2010).

El CLVd causa típicamente retraso en el desarrollo, distorsión de hojas y clorosis. En el Reino Unido, los síntomas más evidentes fueron bronceado y necrosis de hojas; y aunque la calidad de fruta no fue afectada, la producción sí. Los síntomas ocasionados por el TASVd consisten en entrenudos cortos (aparición de matorral), deformación y amarillamiento foliar, hojas quebradizas, frutos pequeños y descoloridos (Antignus *et al.*, 2002). Las plantas infectadas por el TPMVd generalmente producen frutos muy pequeños que no son comerciales (Matthews-Berry, 2010). El MPVd ocasiona retraso del crecimiento observable a las 2-8 semanas después de la inoculación (Li y Ling, 2012); asimismo puede causar clorosis apical que posteriormente se torna bronceada o púrpura. Las plantas no producen frutos o éstos son pequeños (Matthews-Berry, 2010; Ling y Zhang, 2009).

3.2.6. Manejo

No existen métodos químicos o biológicos disponibles para eliminar a los viroides de las plantas infectadas. Por lo tanto, la exclusión de semillas o de material propagativo infectado y la destrucción del mismo, aunado a medidas de higiene para prevenir su dispersión, son las únicas formas de manejo (Matthews-Berry, 2010).

Algunas medidas de exclusión son (Sabaratnam, 2010):

- Para el TCDVd se demostró que el sumergir a las semillas en una solución de hipoclorito de sodio no es suficiente para eliminar al viroide por lo que se recomienda usar siempre semillas y plántulas certificadas, libres de viroides (Matthews-Berry, 2010).
- Cumplir con estrictos requerimientos fitosanitarios y de bioseguridad en el invernadero.
- Mantener un estricto programa de prácticas de higiene (lavado de manos, uso del tapete desinfectante de calzado, restringir el movimiento de material vegetal de un invernadero a otro, entre otras medidas).

- Realizar periódicamente un riguroso monitoreo de presencia de síntomas asociados a virus y viroides durante todo el ciclo de producción.
- Enviar a algún laboratorio certificado cualquier planta con síntomas sospechosos para su diagnóstico.
- Eliminar maleza y evitar tener plantas ornamentales dentro y alrededor de los invernaderos, ya que muchas de éstas pueden estar infectadas de manera latente.
- Evitar usar herramientas de poda contaminadas de un invernadero a otro, y dentro de un mismo invernadero desinfectarlas antes y después de utilizarlas de planta en planta.
- Restringir el acceso del personal que ingresa y minimizar la manipulación de las plantas.
- Retirar y enterrar o incinerar los residuos de cosecha y plantas infectadas, incluyendo raíces; no se deberán reutilizar los contenedores de cultivos previos sin tratarlos con algún desinfectante.
- Eliminar las plantas que se encuentren alrededor de la que muestre síntomas, aun cuando las primeras no muestren síntomas.
- Limpiar profundamente todo el invernadero entre cada ciclo de producción.

3.2.7. Pérdidas económicas

Las pérdidas económicas ocasionadas por los viroides son difíciles de predecir pues la severidad del daño depende del hospedante, modo de dispersión y epidemiología. Las medidas de control pueden estar disponibles para algunos viroides, mientras que la falta de conocimiento de la epidemiología podría impedir el establecimiento de estrategias de control confiable para otros. Por lo anterior, se necesitará definir los ciclos de enfermedad de cada viroide para tener un sistema de evaluación específico que ayude a predecir las pérdidas y las medidas de control a establecer (Flores y Randles, 2003).

Los principales aspectos que determinan el impacto económico debido a viroides son: a) severidad del daño; b) prevalencia y c) habilidad para dispersarse y producir una epidemia. La pérdida directas ocasionadas por los viroides pueden medirse considerando la disminución del producto obtenido en campo, o bien, con el costo monetario que implica. Estas pérdidas variarán con el o los viroides presentes, el valor del cultivo, el tiempo y el medio ambiente. Además, el costo de la

producción será diferente entre los productores de países en desarrollo y los de países desarrollados (Flores y Randles, 2003).

Algunos ejemplos específicos de pérdidas económicas ocasionadas por viroides en el cultivo de jitomate, son los siguientes:

- En Israel la incidencia de plantas infectadas por TASVd fue de casi 100 %, generando una fuerte pérdida en campo (Antignus *et al.*, 2002).
- El TPMVd (MPVd) y TCDVd causan grandes pérdidas en cultivos comerciales (Matthews-Berry, 2010) y se detectaron en un cultivo comercial de jitomate en México afectando el 5% de las plantas en producción (Ling y Zhang, 2009).
- En Australia las pérdidas por PSTVd en jitomate oscilan del 10 al 60% (NSW Government, 2010) mientras que en Países bajos, en papa varían del 39 al 82% dependiendo del aislado (Verhoeven *et al.*, 2004).

3.3. Bacterias fitopatógenas

Las bacterias son microorganismos unicelulares, procariontes, que generalmente miden de 1-2 μm . Su forma es variable, pero las más frecuentes son bacilos (bastones), cocos (esféricas), bastones pleomórficos (tendencia hacia formas irregulares) y espirilos. La mayoría de las bacterias fitopatógenas son baciliformes y muy heterogéneas (Vidaver y Lambrecht, 2004).

En todo el mundo, las bacterias fitopatógenas causan enfermedades importantes (Vidhyasekaran, 2002), aunque en menor frecuencia que los hongos o los virus (Kennedy y Alcorn, 1980). Pueden ser aeróbicas, anaerobias facultativas (pueden crecer con o sin oxígeno) y muy pocas son anaeróbicas. Generalmente se requieren concentraciones de 10^6 unidades formadoras de colonia/mililitro (UFC/mL) o mayores, para que causen enfermedad (Vidaver y Lambrecht, 2004). Los géneros a los que pertenecen las bacterias fitopatógenas se dividen en dos grandes grupos: Proteobacterias (comprende a todas las bacterias Gram negativas) y Firmicutes (donde se agrupan a las bacterias Gram positivas) (Boone *et al.*, 2001).

3.3.1. Principales bacterias patógenas en jitomate

A nivel mundial, las principales bacterias patogénicas en jitomate son *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cancro), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (peca), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (mancha), *Pectobacterium carotovorum* (pudrición del tallo y frutos), *Ralstonia solanacearum* (marchitez), *Pseudomonas corrugata* (necrosis de médula) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (mancha foliar) (Jones *et al.*, 1991).

3.3.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

En 1983, se estableció que el agente causal del cancro era *Corynebacterium michiganensis*, actualmente clasificado *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm) (Gleason *et al.*, 1993). Estas bacterias son bacilos ligeramente curvados o en forma de varilla, miden de 1.5-4 por 0.5- 0.9 μm , son Gram positivas, no móviles, aeróbicas, productoras de cápsula, que forman colonias de color amarillo claro a naranja en agar nutritivo y mucosidad en medio de cultivo YDC (Agrios, 2005). Su temperatura óptima de crecimiento *in vitro* es de 25 a 28 °C (Schaad *et al.*, 2000).

Cmm tiene un cromosoma circular que consta de más de 3 millones de pares de bases, con casi 3000 secuencias codificadoras, y tiene dos plásmidos, el pCM1 (27 357 pb) y el pCM2 (69 989 pb) y se demostró que la patogenicidad se encuentra en estos plásmidos. Uno de los factores de patogenicidad es el gen *celA* que codifica una β -1,4-endocelulasa que está en el plásmido pCM1; y el segundo factor es el gen *Pat-1* que putativamente codifica para una serin proteasa, ubicado en el plásmido pCM2. Además, genes homólogos a *Pat-1* se han identificado tanto en el plásmido pCM2 como en el cromosoma. Todos los genes requeridos para la infección, colonización y evasión o supresión del sistema de defensa de la planta son llevados en el cromosoma. (Dreier *et al.*, 1997; Eichenlaub y Gartemann, 2011).

Por lo anterior, Cmm, en plantas de tomate, no pierde su virulencia si tienen cualquiera de los dos plásmidos (pCM1 o pCM2), pero los síntomas no son severos y su desarrollo es lento. Por el contrario, la ausencia de ambos plásmidos en una cepa de Cmm (NCPB382) provocó un fenotipo no virulento, que convirtió a las bacterias en endófitas que solo causaron una pequeña reducción en

la biomasa. La ausencia de los plásmidos podría dar una explicación del porqué se aislaron cepas de *Clavibacter* tanto epífitas como endófitas de diversas especies de plantas asintomáticas (Gartemann *et al.*, 2008; Dreier *et al.*, 1997).

Esta bacteria tiene varios hospedantes alternativos (Thyr *et al.*, 1975) y se encuentra en todas las zonas productoras de jitomate del mundo. Ocasiona una enfermedad poco frecuente pero severa y de gran importancia económica (Chang *et al.*, 1991).

En México, este patógeno se considera como A2 (presente pero delimitado a algunas regiones) (EPPO, 2010) y en Sinaloa se detectó por vez primera en el Valle de Culiacán. De 1994 a 1996 se extendió rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de los estados de Jalisco, San Luis Potosí y Baja California (Holguín-Peña *et al.*, 2006). En Sonora, el patógeno se presenta en sistemas de producción bajo invernadero y malla sombra (Barboa *et al.*, 2009). Hasta el 2006, se han presentado daños en 200 ha en sistemas de producción protegida con pérdidas estimadas en 40 millones de dólares (Holguín-Peña *et al.*, 2006).

3.3.2.1. Síntomas

El cancro provocado por *Cmm* ocasiona una serie de alteraciones fisiológicas que pueden estar influenciadas por las condiciones ambientales, edad y susceptibilidad de la planta (Carlton *et al.*, 1994). El marchitamiento marginal de folíolos es uno de los primeros síntomas y el más común en plantas de todas las edades (Carlton *et al.*, 1994). Posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo, ya que la bacteria es un invasor sistémico de tejidos del xilema, médula y corteza. Finalmente, la planta se necrosa y marchita. Los bordes de folíolos inferiores se secan y curvan hacia abajo, adquiriendo un color castaño y necrótico con el peciolo unido al tallo. Bajo ciertas condiciones, las manchas necróticas se abren y forman canchales que constituyen fuente de inóculo de infecciones secundarias (Nuez, 2001).

Las plantas enfermas pueden sobrevivir hasta la cosecha y esporádicamente en el fruto se forman pequeñas manchas necróticas rodeadas de un halo claro, que se conocen comúnmente como “ojo de pájaro” u “ojo de pavo” (Blancar, 1996). En las primeras etapas de crecimiento de las plantas provoca marchitez y muerte temprana, en muchos casos las plantas no alcanzan a llegar a la cosecha por los daños que ocasiona tanto en invernadero como a campo abierto (Hausbeck *et al.*, 2000).

3.3.2.2. Transmisión

La principal forma de diseminación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es por semilla (Nuez, 2001). Una vez emergidas las plántulas, la bacteria penetra los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátodos (Gleason *et al.*, 1993). En cultivos establecidos, las labores culturales facilitan su diseminación. Por otra parte, ya que la bacteria sobrevive en los residuos de cosecha y en el suelo hasta por dos años (Ramírez y Sainz, 2006), la enfermedad podrá presentarse continuamente si no se eliminan dichas fuentes de inóculo.

3.3.2.3. Manejo

Los tratamientos con cobre pueden reducir las poblaciones bacterianas y los síntomas que ocasionan; además, se observó un efecto sinergista cuando este elemento se combina con un fungicida como mancozeb y compuestos quelantes de cobre (de León *et al.* 2008a; Hausbeck *et al.*, 2000).

Otras tácticas sugeridas para el manejo de esta enfermedad son el uso de antagonistas de la bacteria (Amkraz *et al.*, 2010; El-Abyad *et al.*, 1993), compostas (Yogev *et al.*, 2009), activadores de resistencia de la planta (Ustun *et al.*, 2009), aplicación de aceites o extractos vegetales (Daferera *et al.*, 2003; Balestra *et al.*, 2009) y la solarización del suelo (Antonioni *et al.*, 1995). Sin embargo, independientemente de la estrategia a usar, siempre es recomendable la prevención basada en el uso de semillas libres del patógeno (de León *et al.*, 2011).

3.4. Métodos de diagnóstico de bacterias fitopatógenas, virus y viroides

Para el manejo de cualquier problema fitosanitario, es fundamental identificar al agente causal. Si bien el diagnóstico de enfermedades en campo se realiza por lo general con base en los síntomas, generalmente se conduce a errores, entre otras cosas, porque es frecuente tener varios patógenos afectando al cultivo en el mismo periodo. Por lo anterior, es necesario desarrollar técnicas oportunas y confiables para detectar simultáneamente a los agentes patógenos en un gran número de plantas (De Boer y López, 2012).

Las técnicas comúnmente usadas para la identificación de bacterias se basan en microscopía, aislamiento, caracterización bioquímica, bioensayos o pruebas de patogenicidad y técnicas

serológicas como la inmunofluorescencia y ELISA. En el caso de virus y viroides se utilizan técnicas basadas en sus propiedades biológicas, electroforesis, microscopía electrónica y ELISA (esta última sólo para virus) (López *et al.*, 2006). Sin embargo, todas estas técnicas requieren de una a varias semanas para realizarlas, algunas son caras, no siempre son sensibles y específicas, y no son adecuadas para procesar un gran número de muestras (López *et al.*, 2006). Por lo anterior, los métodos de diagnóstico se enfocan cada vez más al uso de técnicas moleculares (cuadro 3).

Cuadro 3. Principales técnicas moleculares para la detección de bacterias fitopatógenas y virus (Modificado de López *et al.*, 2006).

Técnica	Sensibilidad	Confiabilidad
Hibridación molecular ^a	+ ^b	+
FISH	++	++
PCR convencional / RT-PCR	++	++
PCR anidada en un solo tubo	+++	+++
Co- PCR	+++	+++
Múltiplex-PCR	++	++
PCR anidada múltiplex	+++	+++
PCR en tiempo real	+++	+++
NASBA	+++	+++
Microarreglos	+	++

^a Usado principalmente para virus, no frecuente para bacterias. ^b +: aceptable, ++: buena, +++: óptima

A continuación se muestran las características principales de las técnicas serológicas (para más información consultar De Boer y López, 2012; Ausubel *et al.*, 2003):

Las pruebas de inmunoadsorción ligada a una enzima (ELISA), se utilizan con mucha frecuencia e inclusive existe una modificación de esta técnica denominada “tissue print-ELISA” que permite realizar una impresión directa del tejido vegetal sobre la membrana, evitando así los problemas de contaminación. Sin embargo, esta técnica sólo se aplica para detectar virus (De Boer y López, 2012).

Dispositivos de flujo lateral (LFD’s) que detectan virus en extractos vegetales mediante anticuerpos mono o policlonales. Sin embargo, no son útiles en infecciones latentes debido a su baja sensibilidad (De Boer y López, 2012).

Citometría de flujo. Se usa en el caso de bacterias o virus y consiste en hacer pasar de manera individual las células bacterianas o moléculas virales a través de un sensor por efecto de una corriente. Las células se identifican con colorantes fluorescentes conjugados a anticuerpos específicos que se detectan electrónicamente. Con esta técnica es posible medir el tamaño de las células y distinguir las vivas de las muertas, pero por el alto costo del equipo no es muy utilizada (López *et al.*, 2003). Se utiliza de manera cotidiana para el diagnóstico de enfermedades humanas pero su uso en la agricultura aún es muy limitado (Laguado, 2007).

Las técnicas moleculares detectan segmentos específicos del genoma bacteriano, viral o viroidal mediante hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación se mencionan de manera general las características principales de ellas:

Hibridación molecular. Esta técnica requiere el uso de sondas que se marcan radioactiva o no radioactivamente con isótopos o haptenos, respectivamente. Las muestras de ADN o ARN blanco se fijan a una membrana de nylon y mediante lavados y temperatura, que mantienen las condiciones ideales de pH y concentración de sales, las muestras positivas hibridan. Una variante de esta técnica es la impresión directa de tejido infectado (hibridación no radioactiva dot-blot) y hasta el momento solo se utiliza para la detección simultánea de virus y viroides, pero no para bacterias (Herranz *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006).

FISH (hibridación fluorescente *in situ*). Esta técnica hace uso de fluoróforos unidos a una sonda específica cuya fluorescencia se puede observar en un microscopio de fluorescencia o en un microscopio confocal. En teoría se podría detectar una célula blanco pero en la práctica el nivel de detección es de 10^3 células/mL (López *et al.*, 2006).

PCR. Con esta técnica se amplifican segmentos específicos de ADN o ADNc (obtenido de la retrotranscripción), lo cual implica realizar extracción de ácidos nucleicos de buena calidad y sin inhibidores evitando la contaminación entre muestras (López *et al.*, 2003). Para ello, en el caso de bacterias, se realiza un proceso de pre-enriquecimiento para aumentar el ADN bacteriano en medio de cultivo que puede durar de una a varias semanas (Bertoloni, 2006).

En general, se considera que la PCR o RT-PCR es sensible y específica para virus, viroides y bacterias (López *et al.*, 2003). No obstante, para la detección de virus, su sensibilidad es usualmente similar a las técnicas de ELISA o hibridación (Olmos, *et al.*, 2005).

Co-PCR. Se trata de una variante de PCR que utiliza de manera simultánea de 4 a 2 pares de primers, dos de los cuales primero amplificarán una región grande que servirá como molde para el resto de los primers con los que se amplificará una región menor. Esta técnica es más sensible que la RT-PCR y se utiliza para detectar bacterias, virus e inclusive hongos. La ventaja de esta técnica, comparada con la PCR anidada, es que todo el proceso se puede realizar en una sola reacción, reduciendo el riesgo de contaminación (López *et al.*, 2006).

Multiplex-PCR. Permite la detección simultánea de diversos patógenos en una sola reacción y en el caso de virus se han logrado detectar hasta 6 especies. Una de las principales características y desventajas de esta técnica es que se deben utilizar primers compatibles (con temperaturas de alineamiento similares) en la reacción de PCR, lo que limita la selección de regiones de los genomas blanco para el diseño de los primer (López *et al.*, 2006).

Multiplex RT-PCR anidada. Esta técnica se puede realizar en un solo paso separando momentáneamente las reacciones, es decir, primero se realiza RT-PCR con primers que amplifican un fragmento grande y posteriormente se agregan primers que amplifican un segmento (por lo general de menor tamaño que el primero) localizado en el fragmento grande. De esta manera, en una misma reacción y un mismo tubo se realiza todo el proceso, evitando riesgos de contaminación y aumentando la sensibilidad de la prueba (López *et al.*, 2006).

PCR cuantitativo o en tiempo real. En teoría, la naturaleza exponencial de la técnica de PCR permite calcular la cantidad inicial del producto desde cualquier punto de la reacción; sin embargo, en la práctica, las condiciones de la reacción pueden interferir con la amplificación y afectar la concentración del producto. Esta técnica requiere de equipo especializado y sondas fluorescentes para cuantificar en tiempo real la amplificación del producto (López, *et al.*, 2003).

NASBA. Es una técnica que puede ser aplicada para la amplificación de segmentos específicos de ARN y ADN. Requiere primers que en el extremo 5' tengan el promotor T7 RNA pol, y diversas enzimas como la T7 ARN pol, AMV-RT y ADNpol-ADN dependiente, entre otras. Se demostró que tiene alta sensibilidad y especificidad para detectar virus comparado con la RT-PCR, además de requerir menos de una hora para completar la reacción. También se utiliza para detectar bacterias (López, *et al.*, 2003).

Microarreglos. Son dispositivos que permiten detectar múltiples patógenos en una sola prueba. Consisten en una superficie de vidrio, nylon, o diversos polímeros, en los cuales se tienen múltiples sondas que pueden hibridar con distintas secuencias blanco de ARN o ADN. Esta técnica requiere de varios fluoróforos y equipo altamente especializado para detectar las muestras positivas. Actualmente, para detectar microorganismos fitopatógenos con esta prueba, es necesario realizar un paso previo de amplificación del ADN por PCR o de transformación del ARN a ADN complementario. Con esta técnica se hicieron sondas para detectar 52 virus fitopatógenos de diferentes géneros en una sola prueba y se desarrollaron sondas capaces de detectar más de 600 virus fitopatógenos (Nicolaisen, 2011). Sin embargo, aún es muy difícil hacer una detección simultánea de bacterias y virus (De Boer y López, 2012; López *et al.*, 2003).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Detección de plantas infectadas por *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Pepino mosaic virus* (PepMV)

Para tener material vegetal infectado con los patógenos de interés y poder realizar los experimentos planteados en esta investigación, se recolectaron 10 muestras de plantas de jitomate con síntomas característicos a los ocasionados por MPVd y PepMV en diferentes zonas productoras de México, de hojas con síntomas se hizo extracción de ARN total con TRIzol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se realizó retrotranscripción de manera individual para el virus y el viroide utilizando 30ng de RNA total obtenido previamente de las muestras colectadas, 1mM de dNTPs, 100 mM de los primers antisentido correspondientes al virus y el viroide, 40 U de RNAsin[®] y 10U de M-MLV retrotranscriptasa (Promega[®]) en un volumen final de 20 μ L. Para la PCR se utilizaron 2 μ L de ADNc, 2 mM MgCl₂, 0.2 μ M de dNTPs, 0.2 μ M de cada primer, 1U de TaqPol (Promega[®]), en 20 μ L de reacción final (cuadro 4).

4.2. Identificación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

De la colección de bacterias fitopatógenas del Colegio de Postgraduados, se obtuvo un aislamiento de Cmm el cual se incrementó en agar nutritivo. La identidad de la bacteria se corroboró mediante PCR utilizando 1 µL de una suspensión bacteriana (10^9 UFC/mL) (la cual previamente se mantuvo durante 5 min a -20 °C al término de los cuales se calentó a 96 °C por 5 minutos), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 µM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1U de TaqPol (Promega®), en un volumen final de 10 µL (cuadro 4).

Los productos de PCR obtenidos de MPVd, PepMV y Cmm se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio, se limpiaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System® (Promega®) y se enviaron a secuenciar a MACROGEN-Korea. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias existentes en el GenBank.

Cuadro 4. Secuencias de primers, regiones genómicas utilizadas para su síntesis y programas de PCR.

Patógeno	Primers 5'→3'	Localización en el genoma y número de acceso	Programa de PCR
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	S CTCGAGTCAGCCCATATCAACGTGCTG	55612-55981 (plásmido pCM2) AM711866	95°C- 4 min
	As GTCGACGCTGATACCCAATTACACAG		94°C- 1 min
			55°C- 1 min
			72°C- 1 min
			72°C- 4 min
			30 ciclos
<i>Tomato planta macho viroid</i> TPMVd ^a (=Mexican papita viroid)	S CTCGAGCTGTCGCTTCGGAGACTAC	1-360 (genoma completo) K00817	94°C- 2 min
	As GGGTGTCGACCGCAGAGGAAG		94°C- 15 seg
			53°C- 15 seg
			68°C- 15 seg
			68°C- 4 min
			30 ciclos
<i>Pepino mosaic virus</i>	S CTCGAGGCCCTTGCTGCTCAGTTTG	5961-6184 (CP) AJ606359	95°C- 2 min
	As GTCGACTCATTGGCTGCCTGATAAG		94°C- 1 min
			55°C- 1 min
			72°C- 1 min
			72°C- 6 min
			35 ciclos

^a Se considera al MPVd y el TPMVd como una sola especie (Verhoeven *et al.*, 2011).

4.3. Inoculación de los patógenos en plantas de jitomate

En el caso de la bacteria, se preparó una suspensión a concentración de 10^9 UFC/mL, a partir de un cultivo crecido en agar nutritivo durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se inyectaron 100 μ L de esta suspensión en el tallo de plantas sanas de jitomate (figura 1). En total se inocularon 9 plantas. Como control negativo, se inyectó agua destilada estéril a los tallos de 3 plantas sanas de jitomate.



Figura 1. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) en agar nutritivo (A). Inoculación de una suspensión de 10^9 UFC/mL de Cmm en plantas de jitomate mediante inyección.

Tejido vegetal colectado en campo que resultó positivo a MPVd y PepMV se utilizó como fuente de inóculo para realizar la transmisión mecánica, de cada uno de ellos por separado, en plantas sanas de jitomate. Del material vegetal colectado se tomaron 2 g de hojas con síntomas y se colocaron en un mortero con 10 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 y carborundum 400 mallas. El tejido vegetal se maceró con el pistilo de un mortero, y con un isopo se frotó el macerado sobre las hojas de 9 plantas de jitomate sanas (Figura 2). Como control negativo, se frotó agua destilada estéril sobre las hojas de 3 plantas de jitomate sanas.



Figura 2. Inoculación mecánica del *Pepino mosaic virus* en jitomate.

Para conocer si MPVd, PepMV y Cmm se transmitieron a las plantas sanas y para contar con tejido vegetal positivo, ocho días después de la inoculación se realizó extracción de ácidos nucleicos totales de las plantas inoculadas (incluyendo los controles negativos para descartar contaminación) con el método de sílica (Thompson *et al.*, 2003) y se analizaron mediante RT-PCR o PCR, respectivamente, de la manera antes indicada.

4.4. Construcción de las sondas individuales y la poli-3

MPVd y PepMV

Para obtener la sonda del PepMV y del MPVd, se utilizaron los clones pSK/poly 6 (Aparicio *et al.*, 2009) y pSK/MVPd respectivamente, pertenecientes a la colección del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

Los fragmentos de PepMV y de MPVd se liberaron de los plásmidos mediante la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SalI*. La digestión se realizó a 37°C por 2 horas, utilizando 1-4 µL de ADN del plásmido, 2 µL de Buffer 10X, 0.5µL de *SalI*, 1µL de *XhoI* y 13 µL de H₂O.

Cmm

Para Cmm, se seleccionó parte de la región Pat-1 del plásmido pCM2 (Figura 3) para diseñar los primers específicos, denominados Sense y Antisense, a los cuales se añadieron los sitios de reconocimiento de *XhoI* y *SalI*, respectivamente. Con estos primers se hizo PCR a partir de ADN total extraído con CTAB de 0.5 g de segmentos de tallo de plantas de jitomate infectadas con la bacteria. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en el punto 6.2 (ver cuadro 4).

```

Atgcagttcatgtcgcgataaacaggatattgttcgctgctgtagtcagttctcagcgttctcggttgctgtcgcgccgccaccagcccaggctgta
gaccgtatagcccgtgttcggtgctgtacgggcgggtactcatctcatctcagcgacagtcgaaggtcctgctcgttcggcggactacgactgcacggc
tggggctgtgctgacggggctggggatcctctcgcgaatcagccatatcaacgtgctgtccgatatgctgtaccgcgaagcattgcggcggctgtgg
tgcgcatgtgcgctcgggtgacgtgcaagtcggctcggcattgggaatcgtcagacgccgatctctcgattgtccggatcgagccctgcagacgacc
agaagaagtgttatccgacttcggccggcatacgtgtactctcgtcaatgactacgagcctcgggctagcgggtgaggtcttcggcgaaggaaaccgat
caggccaggagtcacccgtgcaggtagccggaaccaaagtcgggctgatcgagagattttctcactagcggggcaataaccggaattctgtgtaatt
gggtatcagctccaccgcctcgagggctggaaataggaagtcaccaagtcgtagcggagacctttcagctgcgacgaggcaaggggactcggggg
ggcccgttgcagcaggacatgaaaatcatcggtgtaatatgcgacgggtgggtgccagggtctggagacgatacctatatgactaccttccgatttcg
gtgctttccgcgagcaaccgtattacatattagcgacctctgacgcgcgccggctccgcgtgatcgtgccgaggtgatgacctgcctcgtggagc
attgaccaggcg

```

Figura 3. Secuencia del plásmido pCM2 (número de acceso: AM711866) del gen Pat1 (putative extracellular serine protease) para diseñar los primers de Cmm utilizados en este trabajo (marcados en amarillo).

El amplicón obtenido (615 pb) se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa a partir del cual se cortó y purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System® (Promega®). Después, el fragmento se ligó al plásmido psK+ utilizando la enzima T4-ADN ligasa (Fermentas®), mismo que se incorporó a células competentes de *Escherichia coli* DH-5a mediante electroporación con un multiporador (Multiporator, Eppendorf®, Alemania). Las células se suspendieron en medio líquido LB por 30 min a 37 °C y luego se cultivaron en medio sólido (LB+ampicilina+Xgal) en cajas Petri y se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas para realizar Bio-PCR y verificar la presencia y orientación del inserto en el plásmido. Para ello, las colonias positivas se sembraron en medio líquido (LB+ ampicilina) y se dejaron durante toda la noche en agitación (200 rpm) a 37 °C. Posteriormente, se purificaron los plásmidos de las colonias crecidas en el medio líquido con el kit Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification System® (Promega®). Finalmente, la orientación y propiedad del inserto se verificó por secuenciación (Figura 4).

```

ctccgactacctaactaaaggaacaaaagctggagctccaccgcgggtggcggccgctctagaactagtgatccccgggctgcaggaattcgatat
caagctatcgataccgtcgac(ctcgag)tcagccatatcaacgtgctgtccgatatgctgtaccgcgaagcattgcggcggctgtggtgcga
tgtgcgctcgggtgacgtgcaagtcggctcggcatttgggaatcgtcagacgccgatctcgattgtccggatcgagccctgcagacgacca
gaagaagtgttatccgacttcggccggcatacgtgtactctcgtcaatgactacgagcctcgggctagcgggtgaggtcttcggcgaaggaa
ccgatcaggccaggagtcacccgtgcaggtagccggaaccaaagtcgggctgatcgagagattttctcactagcggggcaataaccggaat
tctgtgtaattgggtatcagc(gtc gag)gtc gaggggggggcccggtaaccaattgccctatagtgagtcgtattacaattcactggccgtcgtttaca
acgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaactaatgccttcgacacatcccccttcgccagctggc

```

Figura 4. Secuencia del clon pSK/Cmm donde se muestra el fragmento clonado de Cmm - **remarcado en negro**- en sentido positivo. Las secuencias entre paréntesis corresponden a fragmentos reconocidos por enzimas de restricción.

Una vez que se confirmó que el inserto se encontraba en sentido positivo, se realizó una digestión utilizando 4 μL del plásmido, 0.5 μL de la enzima *XhoI* (Fermentas[®]) y 2 μL de 10X Buffer R en un volumen de 20 μL de agua libre de nucleasas incubados por 2 h a 37 °C. Con este procedimiento se liberó al inserto por el extremo 5' del plásmido pSK/Cmm y este último quedó linearizado. Posteriormente, el plásmido se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina (SAP Fermentas[®]) y se ligó con el fragmento previamente liberado y digerido del PepMV. Este producto se subclonó en tándem, siguiendo la metodología descrita por Herranz *et al.* (2005) para obtener finalmente el vector pSK/Cmm/PepMV, el cual nuevamente se linearizó con la enzima *XhoI*, se ligó con el fragmento liberado y digerido de MPVd, y se subclonó en tándem para obtener el clon pSK/Cmm/PepMV/MPVd (poli-3) (Figura 5).

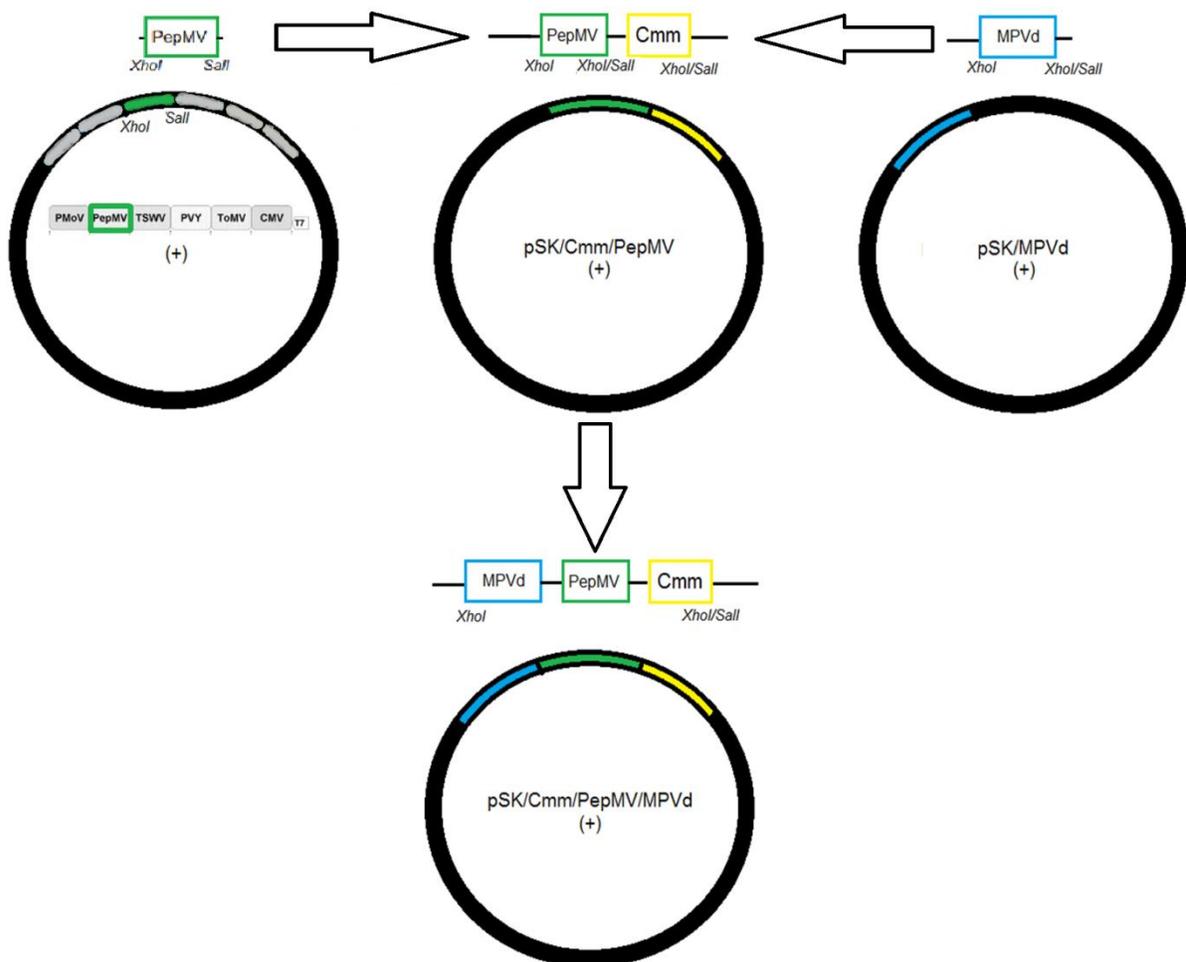


Figura 5. Representación esquemática de los vectores utilizados y los insertos de *Mexican papita viroid* (MPVd), *Pepino mosaic virus* (PepMV) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) para sintetizar la poli-3.

Para sintetizar las sondas individuales y la poli-3, los vectores linearizados se utilizaron como molde para la transcripción con la T7 RNA polimerasa por 2 h a 42°C, utilizando nucleótidos marcados con digoxigenina (Pallás *et al.*, 1998). La transcripción se verificó en gel de agarosa al 1 %.

4.5. Hibridación por gota e impresión

Con una asa bacteriológica se tomaron colonias de Cmm con 48 horas de crecimiento en agar nutritivo, y se suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril hasta tener una concentración de 10^9 UFC/mL. De esta suspensión se tomaron 100 μ L con una jeringa y se infiltraron en el tallo de 9 plantas sanas de jitomate. Posteriormente, se inocularon estas mismas plantas mecánicamente con el PepMV y el MPVd. Ocho días después de la inoculación con los tres patógenos, se realizó un corte transversal de los peciolos de las plantas inoculadas con los cuales se hicieron impresiones de savia sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Roche[®], Mannheim, Alemania). Como control negativo, también se incluyeron impresiones de 3 plantas de jitomate sanas. A la par, de todas las plantas utilizadas (infectadas y sanas), se tomaron muestras de 1 g de tejido del ápice, hoja, tallo y pedicelo, las cuales se maceraron en buffer de extracción, se congelaron y se calentaron durante 5 minutos a 96 °C para extraer los ácidos nucleicos totales por el método de sílica (Thompson *et al.*, 2003) en un volumen de 50 μ L de agua. Parte de estos ácidos nucleicos se utilizaron para evaluar las sondas de manera individual y el resto para determinar su sensibilidad.

La evaluación individual de las sondas se realizó colocando 4 μ L de ácidos nucleicos totales (ver párrafo anterior), previamente desnaturalizados con formamida pura y SSC 20X, en una membrana de nylon. Este procedimiento se realizó en tres membranas más para tener un total de cuatro membranas que contenían las mismas muestras. Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente por 5-10 minutos y los ácidos nucleicos se fijaron exponiéndolas a luz ultravioleta en un transiluminador (First light UVP Illuminator[®]) durante 3 minutos por cada lado. Cada membrana se hibridó de manera individual con las sondas de PepMV, MPVd, Cmm y con la poli-3, respectivamente. La prehibridación, hibridación y lavados se realizaron a 63 °C en un horno HS-101 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.[®]), utilizando el método descrito por Pallás *et al.* (1998). Finalmente,

las membranas se expusieron a las películas de revelado CL-Xposure de 18 x 24 cm (Thermo SCIENTIFIC, Rockford, IL) por 40 minutos.

4.6. Sensibilidad de las sondas

Para determinar la sensibilidad de las sondas, los ácidos nucleicos totales obtenidos previamente se cuantificaron en un nadodrop, y se hicieron diluciones seriales de estos en extractos de ADN total de planta de jitomate sana (1 μ L de ácido nucleico total: 1 μ L de ADN total de planta sana, 1:10, 1:100, 1:1000). En el caso de Cmm se analizaron dos extractos con diferente concentración de ácidos nucleicos (Cmm planta1 y Cmm planta 2) para conocer si había variación en la señal de hibridación. En todos los casos se aplicaron 4 μ L de cada dilución, previamente desnaturalizadas, a cuatro membranas de nylon cargadas positivamente. La hibridación y la exposición de las membranas se realizaron de la manera antes indicada.

4.6.1. Sensibilidad de la sonda de Cmm

Para determinar la cantidad mínima de bacterias que la sonda de Cmm es capaz de detectar, se determinó su sensibilidad.

Se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de 10^9 UFC/mL de colonias con 48 horas de crecimiento en agar nutritivo, a partir de la cual se hicieron cinco diluciones en agua destilada estéril para tener concentraciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/mL. Se colocaron 50 μ L de la última dilución en una caja Petri con agar nutritivo para corroborar la concentración bacteriana. Posteriormente, se aplicaron 4 μ L de cada una de las cuatro diluciones en dos membranas, una de las cuales se hibridó con la sonda de Cmm y la otra con la sonda poli-3. Cada dilución se analizó también por PCR utilizando 1 μ L del líquido como templado.

Por otro lado, se pesaron 0.5 g de tejido foliar de tres plantas sanas de jitomate y se maceraron en el buffer de extracción de sílica. Posteriormente, en 6 tubos eppendorf se colocaron 100 μ L del macerado (100 μ L/ tubo) y a cada uno se le adicionaron 100 μ L de una suspensión bacteriana de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/mL, respectivamente. Estas mezclas se congelaron a -20 °C e inmediatamente se calentaron por 5 minutos a 96 °C para extraer los ácidos nucleicos totales por el método de sílica. De estos, se colocaron 4 μ L de ácidos nucleicos totales, previa desnaturalización, en dos membranas de nylon (4 μ L/membrana), una de las cuales se hibridó con la sonda de Cmm y

la otra con la sonda poli-3. Estas mismas extracciones se analizaron también por PCR utilizando 1 μ L de ácido nucleico total como templado. Como control positivo se utilizó 1 μ L de ácidos nucleicos totales extraídos de una planta infectada por Cmm y como control negativo se usó 1 μ L de ácidos nucleicos totales extraídos de una planta de jitomate sana.

4.7. Especificidad de la sonda de Cmm

Para corroborar que la sonda de Cmm fuera específica solamente a la bacteria Cmm, se procedió a evaluar su especificidad para lo cual de la colección de bacterias del Colegio de Postgraduados, se obtuvieron las siguientes especies fitopatógenas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovorum*, *E. cacticida*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *P. marginalis* y *P. helianthi*, las cuales se purificaron y sembraron en cajas Petri con agar nutritivo al igual que Cmm. Después de 48 horas de crecimiento, se tomaron colonias de cada especie bacteriana, incluyendo la de Cmm, y se suspendieron en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 10^9 UFC/mL de ellas. Cada suspensión se congeló a -20°C e inmediatamente se calentó por 5 minutos a 96°C para obtener los ácidos nucleicos totales. Se colocaron 3 μ L de cada dilución en dos membranas de nylon, previamente marcadas, se dejaron secar y se expusieron durante 3 minutos a luz UV en un transiluminador. Una membrana se hibridó con la sonda poli-3 y la otra con la sonda de Cmm; la hibridación y el revelado se realizaron de la manera descrita anteriormente.

4.8. Evaluación de las sondas en plantas de jitomate en producción recolectadas en invernadero

Se recolectaron hojas (lámina-peciolos) de 80 plantas de jitomate asintomáticas y con síntomas de clorosis, marchitez o achaparramiento, establecidas en invernadero en los municipios de Montecillo (estado de México), Yecapixtla y Zacualpan (estado de Morelos). De cada muestra, se seleccionaron folíolos y/o partes de peciolos, y se extrajeron ácidos nucleicos totales; se analizaron por hibridación con las sondas individuales de Cmm, PepMV, MPVd y con la poli-3, así como por PCR y RT-PCR para Cmm, PepMV y MPVd, respectivamente, de la manera antes indicada. Como controles positivos, se colocó ADN total extraído de plantas infectadas por los patógenos en la parte superior de cada membrana (Cmm, PepMV y MPVd).

5. RESULTADOS

5.1. Detección de *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Pepino mosaic virus* (PepMV)

Al comparar las secuencias obtenidas de los productos amplificados mediante RT-PCR, se tuvo una similitud del 99 % con MPVd (Figura 6) y PepMV.



Figura 6. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de RT-PCR, utilizando extracciones de RNA total de plantas de jitomate con síntomas y primers específicos para MPVd. 1-4: diferentes plantas analizadas, (-): control negativo, RNA total de planta de jitomate sana, (+): tejido vegetal infectado con MPVd, 100 pb: marcador molecular de 100 pares de bases, 200 pb: Peso molecular del producto amplificado. B) Secuencia obtenida del producto de RT-PCR amplificado y purificado. C) Resultado del análisis en el Gen Bank de la secuencia anterior, donde se observa una similitud del 99% con el *Mexican papita viroid*.

5.2. Identificación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Al analizar la secuencia en el GenBank del producto amplificado mediante PCR, se tuvo 99 % de similitud con Cmm (Figura 7).

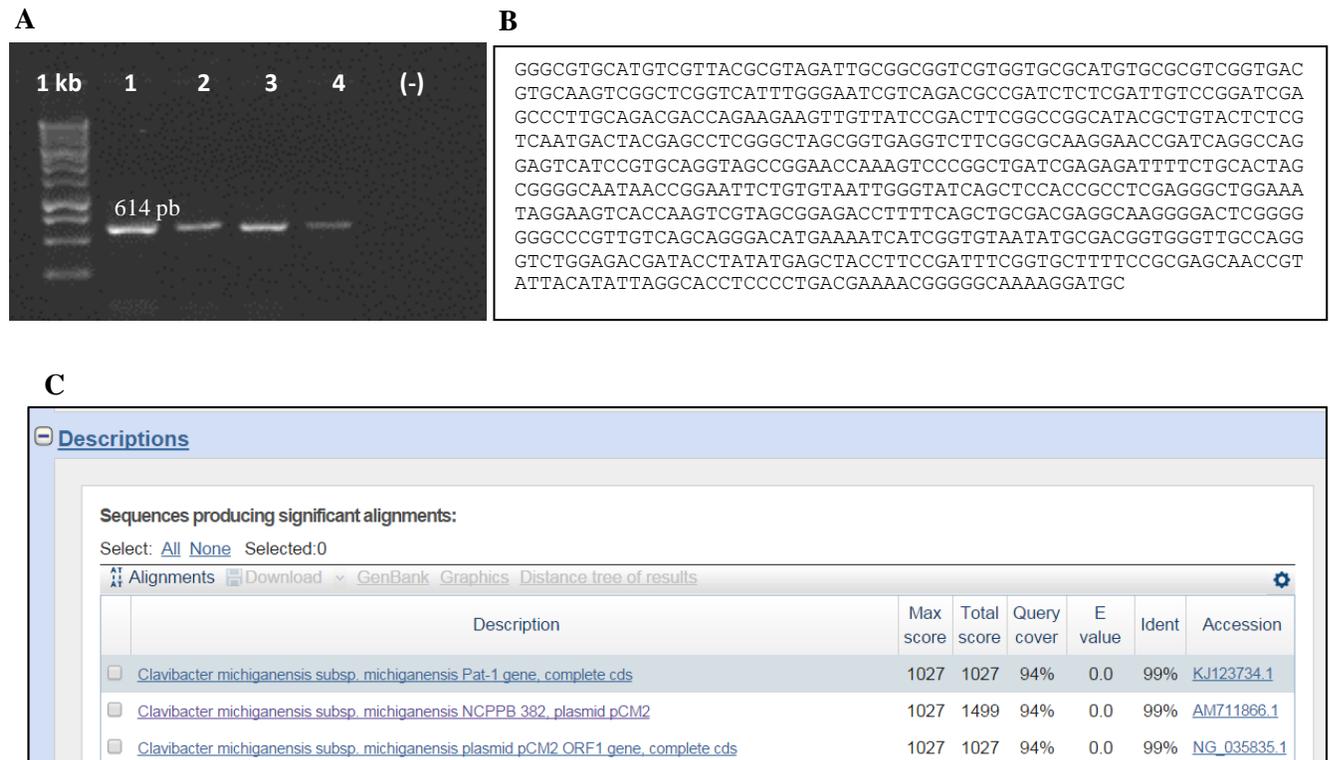


Figura 7. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR, utilizando la cepa bacteriana y primers específicos para Cmm. 1-4: diferentes colonias analizadas, (-): control negativo, 1 Kb: marcador molecular de 1000 pares de bases, 614 pb: Peso molecular del producto amplificado. B) Secuencia obtenida del producto de PCR amplificado y purificado. C) Resultado del análisis en el Gen Bank de la secuencia anterior, donde se observa una similitud del 99% con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

5.3. Inoculación de los patógenos en plantas de jitomate

Las plantas inoculadas con el virus y el viroide mostraron síntomas iniciales a los 5 días después de la inoculación (ddi) y los síntomas fueron más evidentes con el transcurso del tiempo (Figuras 8 y 9). La presencia de los patógenos se corroboró mediante RT-PCR y PCR, respectivamente.



Figura 8. Síntomas iniciales en plantas de jitomate infectadas con el MPVd. Se observan clorosis de nervaduras (A), e islas verdes y deformaciones (B).



Figura 9. Plantas de jitomate infectadas con el MPVd con síntomas de enación (A), clorosis (B) y coloración purpura (C). Frutos deformes y pequeños (D) corresponden a los síntomas típicos en etapas avanzadas de la enfermedad.

Las plantas inoculadas con Cmm mostraron los primeros síntomas a los 8 ddi (Figura 10 B, C y D), posteriormente los síntomas fueron más evidentes y severos (Figura 10 A, E, F y G).



Figura 10. Síntomas observados en hojas y tallos de plantas de jitomate inoculadas con Cmm donde se observa: Marchitez (A), Apertura del tallo (B), Hiponastia (C), Clorosis inicial en hojas (D), Necrosis en hojas (E), Fruto con coloración no uniforme (F) y Corte transversal de un fruto donde se observa crecimiento bacteriano amarillo (G).

5.4. Construcción de las sondas individuales y la poli-3

Las secuencias de los productos obtenidos de los plásmidos purificados (minipreps), confirmaron que los fragmentos seleccionados se insertaron en la orientación requerida (positiva) (figura 11) por lo que se utilizaron para sintetizar las sondas individuales de MPVd, PepMV, Cmm y poli-3.

```

CCCGATTACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGTCCACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGTGGATCCCCGGGCTGCA
GGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAC (CTCGAG) CTGTCGCTTCGGAGACTACCCGGTGGAAACAACGAAGCTCCCA
AGCGCCGCTTTTTCTCTATCTTGGCTCCGGGGCGAGGGTGGAAAACCCCTGGAACCCCTTCGAAAAGGGTCCCTCGGGATCTTTT
CCTTGTGGTTCTGTGGTACACACCTGACCTCCTGACCAGAAAAGAAAAAGAATTGCGGCCAAAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCG
GGGAAACCTGGAGCGAAGTGGCGAAGGAGTCGCGGCTGGGGAGTCTCCCCAGACAGGAGTAATCCCGCTGAAACAGGGTTTTTAC
CCTTCCTTTCTTCGGGTTTCTTCCTCTGCG (GTCGAG) GCCCTTGCTGCTCAGTTTGATCGAATCAATATAACCCCAAGCAATT
TTGCATGTACTTTGCCAAAGTTGTTTGGAAACATCTTCTCGACAGCAACATTCACCAGCAAATGGGGCAAACCTGGTTACCAAG
AAGATACAAAATTTGCTGCATTTGACTTCTTCGATGGAGTCACCAACCCCTGCCAGCCTGCAGCCTGCTGATGGTCTTATCAGGCAG
CCAAATGA (GTCGAG) TCAGCCCATATCAACGTGCTGTCGATATGTCGTTACCGCGAAGCATTGCGGCGGTGCTGGTGCATGT
GCGCGTCGGTGACGTGCAAGTCGGCTCGGTCATTTGGGAATCGTCAGACGCCGATCTCTCGATTGTCCGGATCGAGCCCTTGCAGA
CGACCAGAAGAAGTTGTATCCGACTTCGGCCCGCATACGCTGTACTCTCGTCAATGACTACGAGCCTCGGGGCTAGCGGTGAGGT
CTTCGGCGCAGGGAACCGATCAGGCCAGGAGTCATCCGTGCAGGTAGCCGGACCAAGTCCCGGCTGATCGAGAGATTTTCTGCACT
AGCGGGGCAATAACCGGAATTCTGTGTAATTGGGTATCAGCGTCGAG (GTCGAG) GGGGGGCCCGGTACCCAATTTCGCCCTATA

```

Figura 11. Secuencia del vector pSK/Cmm/PepMV/MPVd utilizado para sintetizar la poli-3. La región en azul corresponde al fragmento que reconoce al MPVd, la verde al PepMV y la roja a Cmm. Las secuencias entre paréntesis corresponden a los sitios de unión entre secuencias.

5.5. Hibridación por gota e impresión

Ocho días después de la inoculación de las plantas de jitomate (ver punto 6.5), con hibridación molecular no radioactiva utilizando la polisonda (poli-3), solo se detectó mediante la impresión directa al PepMV y al MPVd (Figura 12). Sin embargo, con los ácidos nucleicos totales obtenidos de estas plantas, todos los tejidos presentaron hibridación con todas las sondas (MPVd, PepMV, Cmm y poli-3). En el caso particular de las plantas infectadas con Cmm, la señal de hibridación con muestras de tallo y pecíolos fue más intensa (Figura 13).

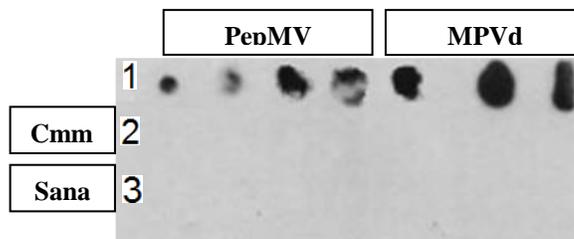


Figura 12. Hibridación molecular no radioactiva de la polisonda (Poli-3) con impresiones directas de pecíolos de plantas de jitomate infectadas con *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Fila 1: impresiones de plantas infectadas con PepMV y MPVd; fila 2: impresiones de plantas infectadas con Cmm; fila 3: impresiones de plantas sanas.

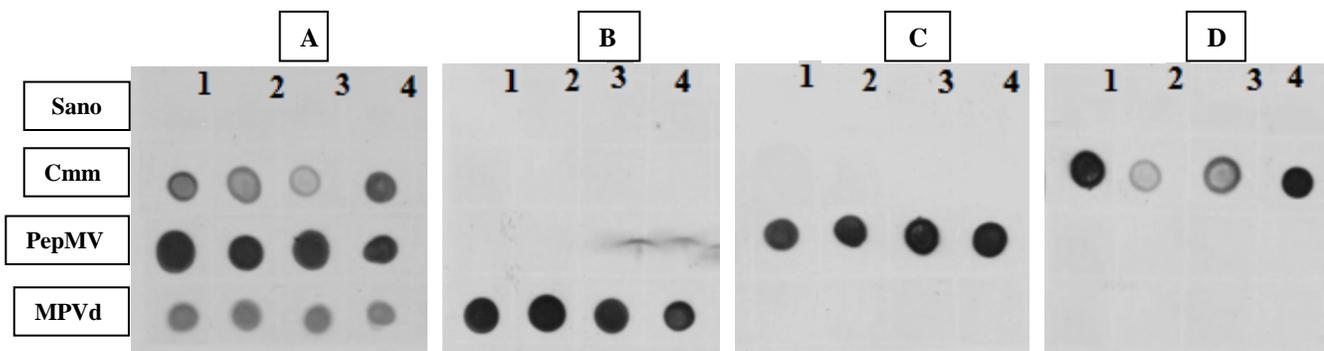


Figura 13. Detección de *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mediante hibridación molecular no radioactiva con diferentes sondas: **A:** poli-3; **B:** sonda MPVd; **C:** sonda PepMV; **D:** sonda Cmm. Se utilizaron ácidos nucleicos totales de plantas sanas e infectadas con Cmm, PepMV y MPVd (filas) de peciolo (1), ápice (2), hoja (3) y tallo (4).

5.6. Sensibilidad de las sondas

Las sondas poli-3, PepMV y MPVd detectaron los ácidos nucleicos correspondientes en todas las diluciones. Para Cmm, la señal de hibridación solo se presentó en la muestra sin diluir y en la primera dilución con la poli-3 y con la sonda Cmm en las dos muestras analizadas (Cmm planta 1 y Cmm planta 2) (Figura 14).

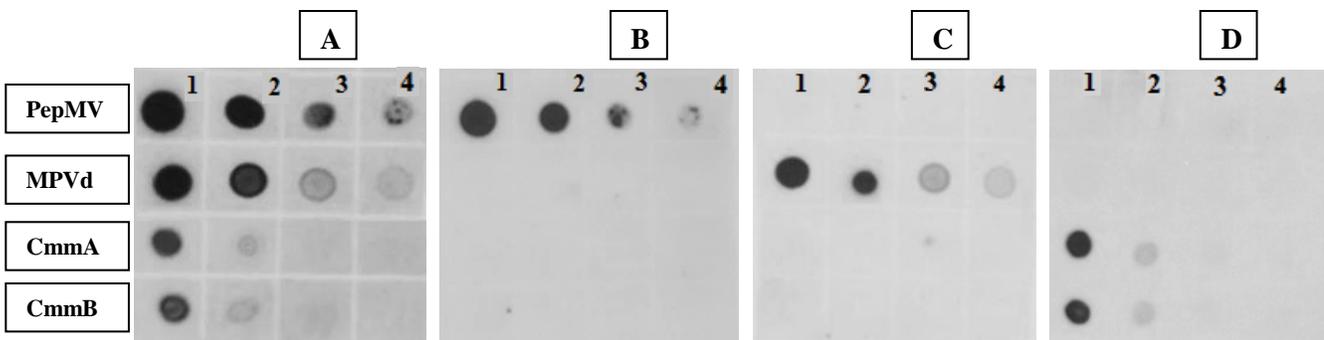


Figura 14. Detección de *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mediante hibridación molecular no radioactiva con diferentes sondas: **A:** poli-3; **B:** sonda PepMV; **C:** sonda MPVd; **D:** sonda Cmm. Se utilizaron diluciones de extractos de ácidos nucleicos totales de tejido infectado. **PepMV:** 1238.4 ng (1), 123.8 ng (2), 30.9 ng (3), 7.7 ng (4). **MPVd:** 254.4 ng (1), 25.4 ng (2), 6.3 ng (3) y 1.5 ng (4). **Cmm planta 1:** 2985 ng (1), 298.5 ng (2), 74.6 ng (3), 18.6 ng (4). **Cmm planta 2:** 1665 ng (1), 166.5 ng (2), 41.6 ng (3), 10.4 ng (4).

5.6.1. Sensibilidad de la sonda de Cmm

El límite de detección de la sonda individual y la poli-3 en las diluciones bacterianas fue de 10^6 UFC/mL (Figura 15: A). Considerando que se aplicaron solo 4 μ L de cada dilución, el número de bacterias que se detectó por hibridación fue de 4000. La última dilución que amplificó mediante PCR fue de 10^4 UFC/mL (Figura 15: B). Si se toma en cuenta que se utilizó 1 μ L como templado, el límite de detección fue de 100 bacterias.

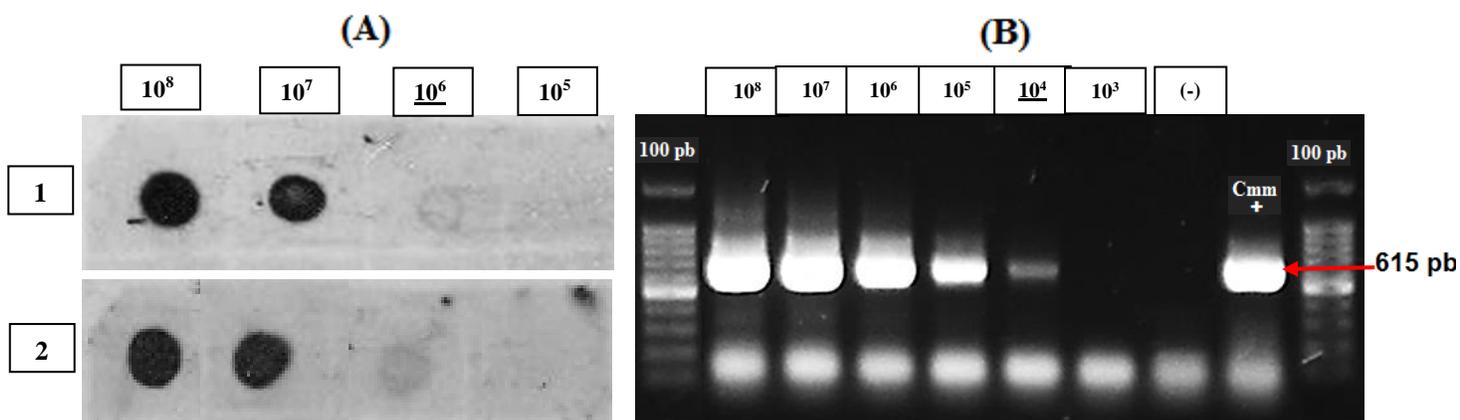


Figura 15. Sensibilidad de la sonda para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Hibridación molecular no radioactiva de la poli-3 (1) y la sonda Cmm (2) (A). Productos de PCR utilizando concentraciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B). Control negativo: (-), Control positivo (Cmm+).

Respecto a las hibridaciones de la sonda de Cmm y la poli-3 con ácidos nucleicos extraídos de plantas sanas más 100 μ L de suspensión bacteriana (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/100 μ L), el límite de detección fue de 10^6 UFC/mL (figura 16A). Considerando que se aplicaron 100 μ L de cada concentración bacteriana al macerado vegetal antes de hacer la extracción de los ácidos nucleicos totales, el límite de detección en este caso fue de 10^6 UFC/0.5g de tejido mientras que por PCR fue de 10^4 UFC/0.5g de tejido (Figura 16B).

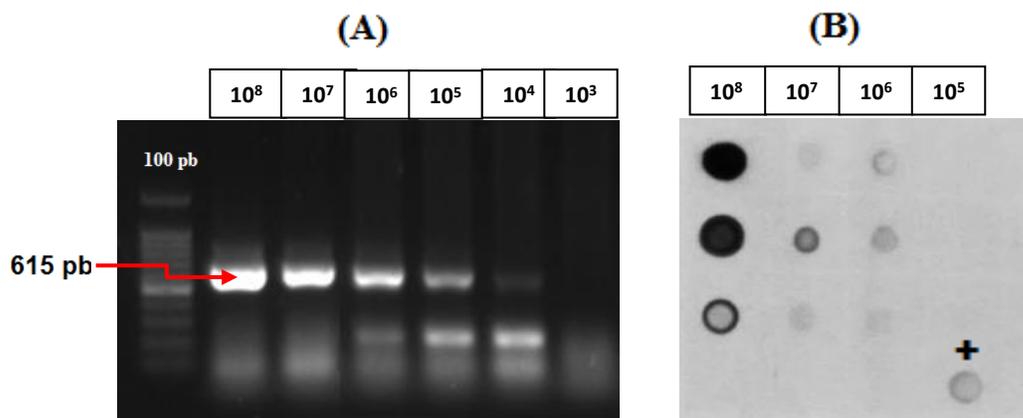


Figura 16. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en ácidos nucleicos extraídos de plantas sanas más suspensión bacteriana. Productos de PCR (A). Hibridación molecular no radioactiva de la poli-3 utilizando ácidos nucleicos totales obtenidos de 0.5 g de planta sana + 100 mL de suspensión bacteriana de Cmm (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 UFC/100 mL) (B). Control positivo que consistió en ADNtotal de una planta infectada con Cmm (+). Las bandas inferiores al producto esperado son inespecíficas.

5.7. Especificidad de la sonda de Cmm

Ninguna de las especies bacterianas utilizadas (*Agrobacterium tumefasciencies*, *Erwinia caticida*, *Pectovacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*, *P. marginalis* y *P. helianthi*) hibridó con la sonda de Cmm ni con la poli-3, a excepción de Cmm (Figura 17).

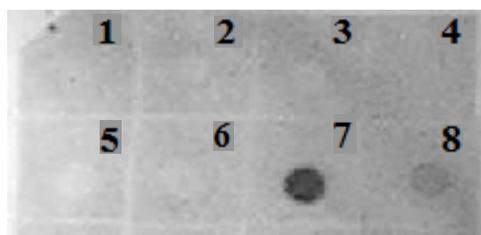


Figura 17. Hibridación molecular no radioactiva de la sonda específica a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) utilizando suspensiones bacterianas de 10^9 UFC/mL de *Agrobacterium tumefasciencies* (1), *Erwinia caticida* (2), *Pectovacterium carotovorum* (3), *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* (4), *P. marginalis* (5), *P. helianthi* (6) y Cmm (7 y 8) a concentraciones de 10^9 y 10^8 UFC/mL, respectivamente.

5.8. Evaluación de las sondas en plantas recolectadas en invernadero

Solamente en 5 de las 80 muestras analizadas, se detectó a Cmm por hibridación y PCR (cuadro 5). Las muestras que hibridaron (Figura 18) son las mismas que fueron positivas mediante PCR (Figura 18A). En ninguna de estas 80 muestras se detectó a PepMV ni MPVd (Cuadro 5), lo cual se corroboró mediante RT-PCR (Figuras 18B y 18C).

Cuadro 5. Resultados de PCR, RT-PCR e hibridación molecular no radioactiva, de muestras de jitomate colectadas en campo.

Localidad / Muestras analizadas	Hibridación				PCR	RT-PCR	
	Poli-3	Sonda Cmm ^b	Sonda PepMV ^c	Sonda MPVd ^d	Cmm	PepMV	MPVd
Montecillo / 12	0 ^a	0	0	0	0	0	0
Yecapixtla / 33	0	0	0	0	0	0	0
Zacualpan / 35	5	5	0	0	5	0	0
Positivo PepMV	1	0	1	0	0	1	0
Positivo MPVd	1	0	0	1	0	0	1
Positivo Cmm	1	1	0	0	1	0	0

^aNúmero de muestras positivas; ^bCmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; ^cPepMV: *Pepino mosaic virus*; ^dMPVd: *Mexican papita viroid*.

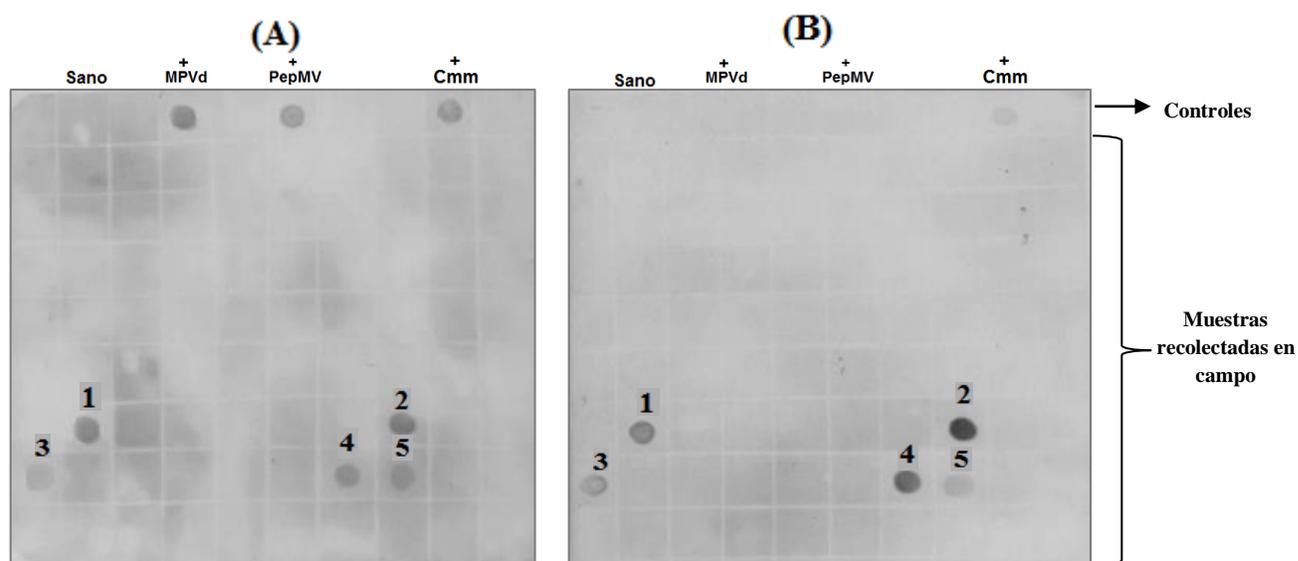


Figura 18. Detección del *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en hojas de jitomate recolectadas en invernaderos de Montecillo, Yecapixtla y Zacualpan. Panel **A**: Hibridación molecular no radioactiva con la poli-3. Panel **B**: Hibridación molecular no radioactiva con la sonda específica para Cmm. Muestras **1 a 5** plantas positivas a Cmm. Controles: ácidos nucleicos totales de planta sana (**Sano**), ácidos nucleicos totales de planta infectada por Cmm (**+Cmm**), ácidos nucleicos totales de planta infectada con PepMV (**+PepMV**); ácidos nucleicos totales de planta infectada por MPVd (**+MPVd**).

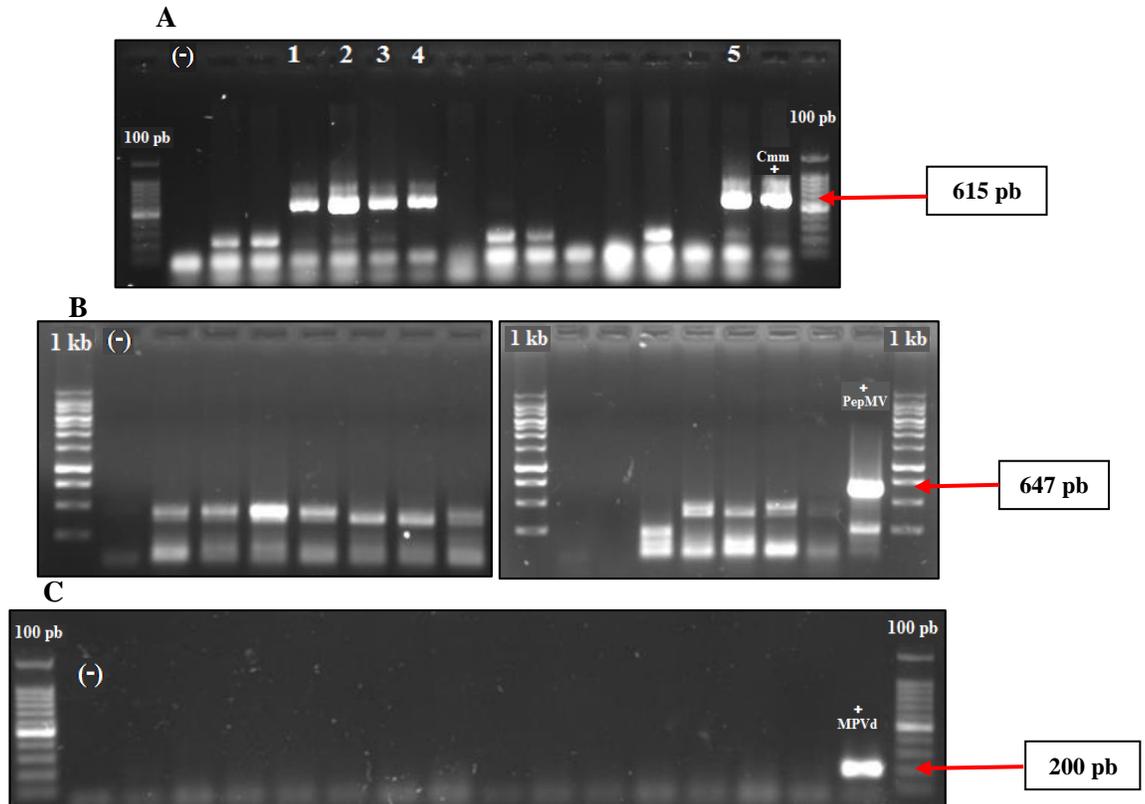


Figura 19. Detección del *Pepino mosaic virus* (PepMV), *Mexican papita viroid* (MPVd) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en hojas de jitomate recolectadas en invernaderos de Montecillo, Yecapixtla y Zacualpan. **(A):** Productos de PCR para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm); muestras colectadas positivas a la bacteria **(1-5)**. **(B):** Productos de RT-PCR para PepMV y **(C):** Productos de RT-PCR para MPVd. **100 pb:** marcador de peso molecular de 100 pares de bases; **1kb:** marcador molecular de 1 kilobases; **(-):** ácido nucleico de planta sana de jitomate; **Cmm+:** ácido nucleico de planta infectada por Cmm; **PepMV+:** ácido nucleico de planta infectada con Pepino mosaic virus; **MPVd+:** ácido nucleico de planta infectada por Mexican papita viroid. Las bandas inferiores al amplicón esperado (indicado con flecha), son inespecíficas.



Figura 20. Plantas de jitomate infectadas con Cmm encontradas durante los muestreos en campo y corte transversal del tallo donde se observa el crecimiento bacteriano amarillo.

8. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la hibridación molecular no radioactiva mediante impresión directa de tejido infectado es útil para el diagnóstico de virus y viroides en jitomate (Aparicio *et al.*, 2009), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo para el *Mexican papita viroid* (MPVd) y el *Pepino mosaic virus* (PepMV), pero no para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (Figura 4). Estos resultados probablemente se deban a la accesibilidad del material genético de los diferentes patógenos en la planta; pues a diferencia de virus y viroides, Cmm posee pared y membrana celular que impiden que su genoma, o más específicamente el segmento del gen *pat-1* (utilizado para hacer la sonda específica para esta bacteria) que se encuentra en un plásmido, esté libre en el citoplasma vegetal y por lo tanto, no está disponible en la savia de plantas infectadas evitando que los ácidos nucleicos bacterianos se fijen a la membrana. Este inconveniente para detectar por hibridación a Cmm con impresión directa de tejido se solventó al utilizar ácidos nucleicos totales de plantas infectadas o suspensiones de cultivos bacterianos (Figura 4). Por otro lado, no se observaron diferencias en la señal de hibridación al analizar las láminas y pedicelos de plantas infectadas por MPVd y PepMV, pero sí en plantas infectadas con Cmm, en donde las muestras de tallo y pedicelo siempre tuvieron una intensidad más fuerte (Figura 13). Ello puede deberse a que hay una mayor acumulación de células de Cmm en el xilema y que dependerá del

tiempo de infección, y sobre todo de la cepa, para que la concentración bacteriana aumente en toda la planta (Chalupowicz *et al.*, 2012).

Los resultados del presente estudio demuestran que la hibridación molecular no radioactiva utilizando la poli-3 permitió la detección simultánea de PepMV, MPVd y Cmm. El análisis masivo de plantas para el diagnóstico de virus, viroides y bacterias mediante hibridación molecular no radioactiva usando polisondas tiene la ventaja de minimizar el costo y tiempo utilizado para la extracción de ácidos nucleicos que es necesario en el caso de RT-PCR o PCR. En investigaciones donde no sea necesario el análisis masivo de plantas, el uso de polisondas puede no ser lo más adecuado. Sin embargo, su utilidad es mayor cuando se requiere la detección simultánea de los patógenos más importantes de un cultivo (James *et al.*, 2006).

Se observó que las sondas individuales del PepMV y MPVd tienen la misma sensibilidad que la poli-3, lo cual concuerda con los resultados obtenidos previamente en trabajos para detectar virus y viroides (Peiró *et al.*, 2012; Herranz *et al.*, 2005; Aparicio *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). La poli-3 y las sondas de PepMV y MPVd detectaron la mínima dilución de ácidos nucleicos totales obtenidos de plantas infectadas, lo cual indica su alta sensibilidad como se ha demostrado en estudios en donde se reporta que la sonda individual de PepMV puede detectar hasta 0.5 pg de transcritos de RNA viral (Aparicio *et al.*, 2009) y la de viroides hasta 2.5 pg (Peiró *et al.*, 2012).

A la fecha no hay datos sobre la concentración mínima de ácidos nucleicos que se requiere para detectar a Cmm por hibridación, pero sí de la concentración mínima mediante PCR punto final. Johnson y Walcott (2012) encontraron que el umbral de detección utilizando PCR en tiempo real con una sonda Taqman fue de 10^5 UFC/mL. Dreier *et al.* (1995) habían reportado previamente que mediante PCR de punto final e hibridación Southern pudieron detectar concentraciones de 10^3 y 10^2 UFC/mL, respectivamente de Cmm. Estas diferencias de resultados obtenidos por PCR punto final se atribuyen al método de extracción de ADN y a la presencia de inhibidores en la muestra, ya que en algunos ensayos no se detecta a Cmm y en otros se detecta a una concentración de 10^3 UFC/mL (de León *et al.*, 2008b). De igual manera, con los métodos serológicos el límite reportado varía de 10^3 a 10^6 UFC/mL (de León *et al.*, 2011). Estos antecedentes evidencian la dificultad inherente de estandarizar un método confiable para detectar a Cmm en plantas naturalmente infectadas, debido

principalmente a que al momento de tomar el tejido vegetal para su análisis la concentración bacteriana puede estar por debajo del límite de detección. En plantas naturalmente infectadas por Cmm en campo se observó que la concentración de la bacteria depende en gran medida de la carga inicial de inóculo y de las condiciones ambientales; asimismo, se tiene un incremento de la concentración bacteriana aun en plantas asintomáticas (Chang *et al.*, 1992). Por otro lado, cuando Cmm se inocula en plantas de jitomate haciendo un corte con una navaja infestada, se tienen concentraciones iguales o mayores a 10^7 UFC/mL cuatro días después de la inoculación (ddi) y los síntomas se observan entre los 11 y 40 ddi (Gitaitis *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992). Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos en esta investigación, el límite de sensibilidad de la sonda de Cmm y la poli-3 (10^6 UFC/mL) posibilitará su detección en plantas en etapas iniciales de la infección, y muy probablemente también en plantas asintomáticas. Considerando que labores culturales como la poda y la cosecha incrementan la incidencia de plantas con síntomas (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991), es recomendable analizar las plantas después de cuatro días de realizar las primeras podas.

Por otro lado, la región génica que se utilizó en la presente investigación para diseñar y sintetizar la sonda de Cmm, permite descartar cepas que no tienen el gen *Pat-1* y por lo tanto las cepas detectadas serán aquellas que sean patogénicas debido a lo cual se asegura su especificidad y confiabilidad (Hadas *et al.*, 2005; Gartemann *et al.*, 2008).

Finalmente, aunque en campo no se detectaron plantas de jitomate infectadas por PepMV y MPVd, con los controles positivos para estos patógenos se confirmó que la poli-3 es una opción adecuada para el diagnóstico rutinario y masivo de Cmm, PepMV y MPVd.

9. CONCLUSIÓN

- La poli-3 diseñada y elaborada en esta investigación detectó a *Mexican papita viroid*, *Pepino mosaic virus* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de jitomate mediante hibridación molecular no radioactiva.
- Mediante hibridación molecular no radioactiva se puede detectar de manera simultánea a virus, viroides y bacterias.

10. LITERATURA CITADA

- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G. and Fauquet C.M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-60.
- Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5^a Ed. Academic Press. USA. 922 p.
- Alfaro-Fernández A., Sánchez Navarro J., Cebrián M. C., Córdoba-Sellés M.C., Pallás V., Jordá C. 2009. Simultaneous detection and identification of *Pepino mosaic virus* (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *European J of Plant Pathology* 125: 143-158.
- Amkraz N., Boudyach E. H., Boubaker H., Bouizgarne B., and Ben Aoumar A. A. (2010). Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1059-1065.
- Anónimo (2005). EPPO Alert list-Viruses. *Pepino mosaic potexvirus* - a New Virus of Tomato Introduced into Europe.
- Anónimo (2009). Medidas Preventivas para el Control del Virus del Mosaico del Pepino dulce (PepMV). Gobierno de las Canarias. GMR Canarias. Consultado el 19/02/2013. Disponible en:
http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/doc/agricultura/infofito/virus_del_tomate.pdf
- Anónimo (2012). Análisis de Riesgo de Plagas para la importación de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) a México. SAGARPA- SENASICA. DGSV. 330 p.
- Antignus Y., Lachman O., Pearlsmand M., Gofman R. and Bar-Joseph M. (2002). A new disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain to *Tomato apical stunt viroid* (TASVd). *Phytoparasitica*, 30(5): 502-510.
- Antoniou P.P., Tjamos E. C. and Panagopoulos C. G. (1995). Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. *Plant Pathology*, 44:438-447.
- Aparicio H. F., Soler S., Aramburu J., Galipienso L., Nuez F., Pallás V., López C. (2009). Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *European J of Plant Pathology*, 123:117-123.
- Arauz C.L.F. (1998). *Fitopatología. Un enfoque agroecológico*. Ed. de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 443 p.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 047150338X. 4410 p.

- Balestra G. M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E., and Quattrucci A. (2009). Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*. 28:807-811.
- Barboa F.J., Rueda P.E.O., Acedo F.E., Ponce F.J., Cruz M., Grimaldo J.O. y García O.M.M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4): 319-326.
- Bautista M.N., Chavarín P.C. y Valenzuela E.F. (2010). Jitomate. Tecnología para su producción en invernadero. Colegio de Postgraduados. 213 p.
- Bertolini E., Olmos A., Martínez M. C., Gorris M. T., Cambra M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J of Virological Methods* 96:33–41.
- Blancar D. (1996). Enfermedades del Tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España. 109 p.
- Boone D. R., Castenholz R. W., Garrity G. M., Staley J. T., Brenner, D. J., Goodfellow M., Krieg N. R., Rainey F. A. and Schleifer, K. H. (2001). The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. p. 359. *In*: G. M. Garrity. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York. 721p.
- CABI/EPPO, 2014. Potato spindle tuber viroid. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*, No. April. Wallingford, UK: CABI, Map 729 (Edition 3).
- Carlton W.M., Glaeson M.L. and Braun E.J. (1994). Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 78: 742 –745
- Chang R.J., Rie S. M. and Pataky J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. *Phytopathology* 81 (10):1276-1281.
- Chang R.J., Ries S.M. and Pataky J.K. (1992). Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker tomato. *Plant Disease*, 76: 1150: 1155.
- Chalupowicz L., E.-M. Zellermann, M. Fluegel, O. Dror, R. Eichenlaub, K.-H. Gartemann, A. Savidor, G. Sessa, N. Iraki, I. Barash, and S. Manulis-Sasson. (2012). Colonization and Movement of GFP-Labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* During Tomato Infection. *Phytopathology Bacteriology*, 102(1): 23-31.
- Conti M., Gallitelli D., Lisa V., Lovisolo O., Martelli G.P., Ragozzino A., Rana G.L. y Vovlas C. (2000). Principales virus de las plantas hortícolas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 206 p.
- Cooke A. (2000). Mystery virus. *Grower* (Feb 24): 19-20.

- Córdoba S.M.C. (2010). El virus del mosaico del pepino (*Pepino mosaic virus*) dulce afectando al cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y Epidemiología. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 216 p.
- Córdoba-Sellés M.C., García-Rández A., Alfaro-Fernández A., and Jordá-Gutiérrez C. (2007). Seed Transmission of *Pepino mosaic virus* and Efficacy of Tomato Seed Disinfection Treatments. *Plant Disease*, 91(10): 1250-1254.
- Cotillon A. C., Girard M., and Ducouret S. (2002). Complete nucleotide sequence of genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Arch. Virol.* 147:2231-2238.
- Daferera D. J., Ziogas B. N., and Polissiou M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot.* 22: 39-44.
- Davino S., Accotto G.P., Masenga V., Torta L. and Davino M. (2009). Basil (*Ocimum basicilum*), a new host of *Pepino mosaic virus*. *Plant Pathol.* 58, 407.
- De Bokx J.A. and Huttinga H. (1981). *Potato virus Y*. Commonwealth Mycological Institute and the association of Applied Biologist. Descriptions of Plant Viruses No. 242. 6p.
- De Boer S. H. and López M. M. (2012). New Grower-Friendly Methods for Plant Pathogen Monitoring. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 197–218.
- De La Torre-A R.; Téliz-Ortiz D., Pallás V. and Sánchez-Navarro J.A. (2009). First Report of Avocado sunblotch viroid in Avocado from Michoacán, México. *Plant Disease*, 93(2): 2002.
- De León L., Siverio F., López M. M. and Rodríguez A. (2008a). Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27:1277-1283.
- De León L., Rodríguez A., López M.M. and Siverio F. (2008b). Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 776–786.
- De León L., Siverio F., López M. M. and Rodríguez A. (2011). *Clavibacter mchiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seed are Still de Goal. *Plant Disease*, 95(11): 1328-1338.
- Diener T. O. (1971). Potato spindle tuber ‘virus’ IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology*, 45: 411–428.
- Diener T.O. and Lawson R.H. (1972). Chrysanthemum Stunt: A viroid disease. *Virology* 51: 94-101.

- Diener T. O. (1987). *The Viroids*. Plenum Press, New York, NY. 373 p.
- Diener T.O. (2003). Discovering viroids-a personal perspective. *Nature Review Microbiology* 1:75-80.
- Ding B., Itaya A., and Zhong X. (2005). Viroid trafficking: A small RNA makes a big move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:606-612.
- Ding B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 47:105–131.
- Di Serio F. and Flores R. (2008). Viroids: Molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biology*, 5: 128–131.
- Dreier J., Bempohl A. and Eichenlaub R. (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85, 462–468.
- Dreier J., Meletzus D., and Eichenlaub R. (1997). Characterization of the plasmid-encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 10:195– 206.
- Duran-Vila N., Pina J.A., Molins M.I.m and Navarro L. (1991). A new indexing method for cachexia. *In: Proc. 11th Conf. Int. Organ. of Citrus Virol.* Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (Eds.). IOCV, Riverside, California. pp. 224-229.
- Eichenlaub R. and Gartemann K. (2011). The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* , 49: 445-64.
- El-Abyad M. S., El-Sayed M. A., El-Shanshoury A. R., and El-Sabbagh S. M. (1993). Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 149:185-195.
- EPPO (2003). *Pepino mosaic potexvirus*. EPPO Alert list. <http://www.eppo.org>.
- EPPO (2010). Data Sheets on cuarentines Pest. *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. EPPO A2 List No. 50.
- Fagoaga C. and Duran-Vila N. (1996). Naturally occurring variants of *citrus exocortis viroid* in vegetable crops. *Plant Pathology* 45: 45–53.
- Fanelli V., Cariddi C. and Finetti-Sialer M. (2007). Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology*, 56: 683–691.

- FAOSTAT, Database 2012. Última actualización 23/10/2014. Consultado el 6/06/2016. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Flores P. R. (2011). Descendiendo por la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida: los viroides. *Virología*, 14 (3): 39-47.
- Flores R., Duran-Vila N., Pallás V. and Semancik J.S. (1985). Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. *Journal of Genetics Virology*, 66:2095-2102.
- Flores R., Duran-Vila N. (1996). Viroides. *In: Patología Vegetal*, Llácer, G. López, M.M., Trapero, A. y Bello, A. eds., SEF/Phytoma, España, 1:149-183.
- Flores R., Hernández C., Martínez de Alba A. E., Daros J. A., and Di Serio F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43:117-139.
- Flores R., Rodriguez J.L. (1981). Altered pattern of root formation on cutting of *Gynura aurantiaca* infected by citrus exocortis viroid. *Phytopathology*, 71: 964-966.
- Flores R., Randles J. W., Bar-Joseph M. and Diener T. O. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143: 623-629.
- Flores R., Randles J.W., Bar-Joseph M. and Diener T.O. (2000). Viroids. *In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B. (eds) Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp 1009–1024) Academic Press, San Diego, USA.*
- Flores R., and Randles J. (2003). *Viroids: Properties, Detection, Diseases and Their Control* Ahmed Hadidi, Science publishers, Inc. United States of America. 392 p.
- French C. J., Bouthillier M., Bernardy M., Ferguson G., Sabourin M., Johnson R. C., Masters C., Godkin S., and Mumford R. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* in Canada and the United States. *Plant Dis.* 85:1121.
- Galindo J. A. (1987). *Tomato planta macho*. Pages 315-320 in: *The Viroids*. T. O. Diener, ed. Plenum Press, New York, NY.
- Galindo J., López M. and Aguilar T. (1986). Significance of *Myzus persicae* in the spread of *tomato planta macho viroid*. *Fitopatol. Bras.* 2: 400-410.
- Galindo J., Smith D.R. and Diener T.O. (1982). Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopatology*, 72: 49–54.
- Gartemann K., Abt B., Bekel T., Burger A., Engemann J., Flügel M., Gaigalat L., Goesmann A., Gräfen I., Kalinowski J., Kaup O., Kirchner O., Krause L., *et al.* (2008). The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp.

- michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 2138-2149.
- Gleason M., Braun E. J. and Peterson R. H. (1993). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81:1519-1523.
- Gora A., Candresse T. and Zagorski W. (1994). Analysis of the population structure of three phenotypically distinct PSTVd isolates. *Archives of Virology*, 138: 233-245.
- Gitaitis R.D., Beaver R.W., Voloudakis A.E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant disease*, 75: 834-838.
- Hadas R., G. Kritzman, F. Klietman, T. Gefen and S. Manulis. (2005). Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54, 643–649.
- Hanssen I. M. and B. P. H. J. Thomma. (2010). *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular plant pathology*, 11(2): 179–189.
- Hanssen I.M., Paeleman A., Van Bergen L., Vandewoestijne E., Wittemans L., Goen K., Vanachter A.C.R.C. and Thomma B.P.H.J. (2009). Survey of symptom expression and damage caused by *Pepino mosaic virus* (PepMV) in commercial tomato production in Belgium. *Acta Hort.* 808:185–192.
- Hammond R. and Owens R.A. (2006). Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APS Net Feature artículo disponible en: <http://www.apsnet.org/online/feature/viroids/>.
- Hanssen I. M., Paeleman A., Vandewoestijne E., Van Bergen L., Bragard C., Lievens, B., *et al.* (2009). *Pepino mosaic virus* isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology*, 58: 450–460.
- Hanssen I. M., Mumford R., Blystad D., Cortez I., Hasiów-Jaroszewska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.M., J. Peters, Pospieszny H., Ravnikar M., Stijger I., Tomassoli L., Varveri C., van der Vlugt R. and Nielsen S. L.. (2010). Seed transmission of *Pepino mosaic virus* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 126:145–152.
- Hausbeck M. K., Bell J., Medina-Mora C., Podolsky R., and Fulbright D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90:38-44.
- Herold T., Haas B., Singh R. P., Boucher A. and Sanger H. L. (1992). Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of *potato spindle tuber viroid* (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Molecular Biology*, 19: 329-333.

- Herranz M.C., Sánchez-Navarro J.A., Aparicio F., Pallás V. (2005). Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. *Journal of Virological Methods*, 124: 49–55.
- Hollings M. and Stone O.M. (1971). *Tomato aspermy virus*. Commonwealth Mycological Institute and the association of Applied Biologists. Descriptions of Plant Viruses No. 79.
- Hollings M., and Stone O. M. (1973). Some properties of chrysanthemum stunt, a virus with the characteristic of an uncoated ribonucleic acid. *Ann. Appl. Biol.* 74:333-348.
- Holguín-Peña R.J., Vázquez-Juárez R.C. and Rueda-Puente E.O. (2006). Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, 90:1150.
- James D., A. Varga, V. Pallás and Candresse T. (2006). Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 16–29.
- Johnson K. L. and Walcott R.R. (2012). Progress Towards a Real-time PCR Assay for the Simultaneous Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pepino mosaic virus* in Tomato Seed. *Journal of Phytopathology*, 160: 353–363.
- Jones J.P., Stall R.E. and Zitter T.A. (1991). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul: American Phytopathological Society. 73p.
- Jones R.A.C., Koenig R. and Lesemann D. E. (1980). *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94:61-68.
- Kennedy B. W. and Alcorn, S.M. (1980). Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64:674-676.
- Kryczynski S., Paduch-Cichal E., and Skzeczowski L. J. (1988). Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121:51-57.
- Laguado J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura *Revista Médica veterinaria zootecnista Cordoba*, 12(2): 1077-1095.
- Leontyeva J.A. (1980). Tomatoes and potato spindle tuber viroid. *Zashchita-Rastenii* 8: 22.
- Lesemann D. E., Dalchow J., Winter S., and Pfeilstetter E. (2000). Occurrence of *Pepino mosaic virus* in European tomato crops: Identification, etiology and epidemiology. *Mitt. Biol. Bundesanst, Berlin-Dahlem* 376:323.

- Li R. and Ling K. (2012). Molecular and biological characterization of *Mexican papita viroid*. Tomato Disease Workshop. 28 p.
- Ling K. and Bledsoe M. (2009). First Report of *Mexican Papita Viroid* Infecting Greenhouse Tomato in Canada. *Plant Disease*, 93:839.
- Ling K.S. and W. Zhang. (2009). First Report of a Natural Infection by *Mexican Papita Viroid* and *Tomato Chlorotic Dwarf Viroid* on Greenhouse Tomatoes in Mexico. *Plant Disease*, 93(11): 1216.
- Ling K.S. and Zhang W. (2011). First Report of *Pepino mosaic virus* Infecting Tomato in Mexico, *Plant Disease*, 95 (8): 1035.
- Lizárraga R. E., Salazar L. F., Roca, W. M., and Schilde- Rentschler L. (1980). Elimination of potato spindle tuber by low temperature and meristem culture. *Phytopathology*, 70, 754–755.
- Loomans A., Franssen J., van der Staaij M., Stijger I. and Klapwijk J. (2000). Latest news on whitefly in the Netherlands. *EWSN Newsletter* 6: 2.
- López M.M., Bertolini E., Marco-Noales E., Llop P., Cambra M. (2006). Update on molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses. In *Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications*, Ed. J.R. Rao, C.C. Fleming, J.E. Moore, pp. 1–46. Norfolk, VA: Horizon Biosci.
- López M.M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M. T., Llop P., Penyalver R., Cambra M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. Review article. *International Microbiology*, 6: 233–243.
- Martin J. and Mousserion C. (2002). Potato varieties which are sensitive to the tomato strains of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Phytoma Défense Végétaux*, 552: 26–28.
- Martínez A.J. (1974). Estudio sobre la enfermedad del pinto del jitomate *Lycopersicon esculentum* Mill. en la región de Actopan, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 98 p.
- Martínez-Soriano J.P., Galindo-Alonso J., Maroon C.J.M., Yucel I., Smith R.D., and Diener O.T. (1996). *Mexican papita viroid*: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 93(18): 9397-401.
- Matthews-Berry S. (2010). Emerging viroid threats to UK tomato production. The Food and Environment Research Agency (Fera). Plant disease Factsheet. Disponible en: <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/publications/documents/factsheets/emergingViroidThreatsTomato.pdf>

- Matsushita Y., Kanda A., Usugi T., and Tsuda S. (2008). First report of a Tomato chlorotic dwarf viroid disease on tomato plants in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 74(2): 182-184.
- Mishra M.D., Hammond R.W., Owens R.A., Smith D.R. and Diener T.O. (1991). Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- Mumford R. A. and Metcalfe E. J. (2001). The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of *Pepino mosaic virus* and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology*, 146:2455-2460.
- Nicolaisen M. (2011). An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of Virological Methods*, 173: 137–143.
- NSW (New South Wales) Government. (2012). FACTSHEET, Plant Biosecurity Orange. Exotic Pest Alert: *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd) in tomatoes. Department of primary Industries. Disponible: <http://www.dpi.nsw.gov.au/factsheets> for updates Plant Biosecurity Primefact 1151 first edition.
- Nuez F. (2001). *El Cultivo del Tomate*. Ed. Mundi-Prensa. Barcelona, España. 793 p.
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. (2005). Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.
- Owens R.A. (2007). *Potato spindle tuber viroid*: The simplicity paradox resolved? *Molecular Plant Pathology* 8:549-560.
- Owens R.A. and Verhoeven J.Th.J. 2009. *Potato spindle tuber*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01.
- Paduch-Cichal E., and Kryczynski S. (1987). A low temperature therapy and meristem- tip culture for eliminating four viroids from infected plants. *Journal of Phytopathology*, 118: 341–346.
- Pallás V., Escobar de L. C, Rodríguez P. P. y Marcos J. F. (2008). Herramientas biotecnológicas en fitopatología. *In: Capitulo 8: Estrategias moleculares en el diagnóstico y análisis de la diversidad bacteriana en plantas*. 464 p. Mundi Prensa Libros S.A.
- Pallás V., Más P., Sánchez-Navarro J.A., (1998). Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. *Methods of Molecular Biology*, 81: 461–468.
- Peiró A., Pallás V. and Sánchez-Navarro J.Á. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132:469–475.

- Puchta H., Herold T., Verhoeven K., Roenhorst A., Ramm K., Schmidt-Puchta W. and Sanger H.L. (1990). A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15: 509–511.
- Ramírez V.J. y Sainz R.R. (2006). Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1^{ra} Ed. Once Ríos Editores. Culiacan Sinaloa, México, 360 p.
- Ramírez R.S., Salazar P. A., y Nakagome T. (2001). Manual de plagas y enfermedades del cultivo de jitomate, jitomate de cáscara y cebolla. Publicación especial No. 28. INIFAP Zacapetec, Morelos. México. 84-86 pp.
- Robles-Serna, R. 1985. Presencia de exocortis en los cítricos de Tamaulipas. Resúmenes XII Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato, México Resumen No. 156.
- Roggero P., Masenga V., Lenzi R., Coghe F., Ena S., and Winter S. (2001). First report of *Pepino mosaic virus* in tomato in Italy. *Plant Pathology*. 50:798.
- Sabaratnam S. (2010). *Tomato Chlorotic Dwarf Viroid (TCDVd): An Overview*. Plant Pathologist Abbotsford Agriculture Centre British Columbia Ministry of Agriculture & Lands. Disponible: <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/tcdvd.htm>
- Salomone A., and Roggero P. (2002). Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Plant Pathology*, 84:65-68.
- Sánchez-Navarro J.A., Aparicio H.F., Rowhanib A. and Pallás V. (1998). Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology* 47: 780–786.
- Sandoval B. C. (2004). Manual Tcnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropnicos Agricultura y la Alimentacin. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- Saldarelli P., Barbarossa L., Grieco F., Gallitelli D. (1996). Digoxigenin labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease*, 80: 1343–1346.
- Sanger H.L. and Ramm K. (1975). Radioactive labelling of viroid RNA. *In: Modification of the Information Content of Plant Cells* (Markham, R, Davies, D.R., Hopwood, D.A. y Horne, R.W., eds., pp 229-252, North Holland, Amsterdam.
- Santiago J., Mendoza M. y Borrego F. (1998). Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, mill) en invernadero: criterios fenolgicos y fisiolgicos. *Agronoma mesoamericana*, 9(1): 59-65.
- Schaad N. W., Jones B. J., Chun W. (2000). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. Ed. APS Press.U.S.A.1-15 pp.

- Schwarz D., Paschek U., Bandte M., Büttner C. and Obermeier C. (2009). Detection, spread, and interactions of *Pepino mosaic virus* and *Pythium aphanidermatum* in the root environment of tomato in hydroponics. *Act Horticulture*. 808: 163–170.
- Scholthof K.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. and G.D. Foster. (2011). Review: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9): 938-954.
- Semancik J.S., Magnuson D.S., and Weathers L.G. (1973). Potato spindle tuber disease produced by pathogenic RNA from citrus exocortis disease: Evidence for the identity of the causal agents. *Virology* 52: 292–294.
- Semancik J.S., Roistacher C.N., Rivera-Bustamante R. and Duran-Vila N. (1988). *Citrus cachexia viroid*, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69:3059-3068.
- SIAP. (2014). Consultado el 5/06/2016. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
- Singh R. P. (1983). Viroids and their potential danger to potatoes in hot climates. *Canadian Plant Disease Survey*, 63, 13–18.
- Singh RP, Finnie RE, Bangall RH. (1971). Losses due to the potato spindle tuber virus. *Am Potato J* 48: 262-267
- Singh R.P. and Teixeira da Silva J. A. (2006). Ornamental plants: Silent carrier of evolving viroids. *In: J. A. Teixeira da Silva (Ed.), Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. London, UK: Global Science Books 3: 531–539.
- Singh R.P., Xianzhou N. and Singh M. (1999). *Tomato chlorotic dwarf viroid*: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Shipp J.L., Buitenhuis R., Stobbs L., Wang K., Kim W.S. and Ferguson G. (2008). Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annal Applied Biology*, 53: 149–155.
- Soler S., López C., and Nuez F. (2005). Natural occurrence of viruses in *Lycopersicon* spp. in Ecuador. *Plant Disease*. 89:1244.
- Spence N. J., Basham J., Mumford R. A., Hayman G., Edmondson R., and Jones D. R. (2006). Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55: 595–606.
- Stace-Smith S.R. (1970). *Tobacco ringspot virus*. Commonwealth Mycological Institute and the association of Applied Biologist. Descriptions of Plant Viruses No. 17.

- Szychowski J.A., Doazan J.P., Lecalir P., Garnier M., Credi R., Minafra A., Duran-Vila N., Wolpert J.A., Semancik J.S. (1991). Relationship and patterns of distribution among grapevine viroids from California and Europe. *Vitis*, 30:25-36.
- Thyr B.D., Samuel M.J. and Brown P.G. (1975). New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter*, 59: 595–8.
- Thompson J. R., Wetzel S., Klerks M. M., Vaskova D., Schoen C.D., Spak J., *et al.* (2003). Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*, 111: 85–93.
- Ustun N., Ulutas E., Yasarakinci N., and Kilic T. (2009). Efficacy of some plant activators on bacterial canker of tomato in Aegean region of Turkey. *Acta Horticulture*. 808:405-408.
- Van der Vlugt R. A. A., Stijger C. C. M. M., Verhoeven J. Th. J. and Lesemann D. E. (2000). First report of *Pepino mosaic virus* in tomato. *Plant Disease*. 84:103.
- Verhoeven J. Th.J., Roenhorst J. W. Owens R. A. (2011). *Mexican papita viroid* and *Tomato planta macho viroid* belong to a single species in the genus *Pospiviroid*. *Archives of Virology*, 156: 1433–1437.
- Verhoeven J. Th. J., van der Vlugt R. A. A., and Roenhorst J.W. (2003). High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology*, 109:419-425.
- Verhoeven J.T., Jansen J. C.C, Willemen T.M, Kox L.F.F, Owens R.A and Roenhorst J.W. (2004). Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823-831.
- Verhoeven J.Th.J, Jansen C.C.C, Werkman A.W. and Roenhorst J.W. (2007). First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in *Petunia hybrida* from the United States of America. *Plant Disease*, 91: 324.
- Vidaver A.K. and Lambrecht P.A. (2004). Las Bacterias como Patógenos Vegetales. *Trans. Ana María Romero. The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01.
- Vidhyasekaran P. 2002. Bacterial disease resistance in plants. *Molecular biology and biotechnological applications*. 452 p. The Haworth Press, Binghamton, NY.
- Visvader J. E. and Symons R. H. (1985). Eleven new sequence variants of *citrus exocortis viroid* and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research*, 13: 2907-2920.
- Walter B., Thouvenal J.C. and Fauquet C. (1980). Les virus de la tomate en Cote d'Ivoire. *Annales de Phytopathologie*, 12: 259– 275.

- Walter B. (1987). *Tomato apical stunt*. pp. 321-327. In: Diener T.O., (ed) *The Viroids*. Plenum Press, New York, USA.
- Whitesell R. (1952). Sunblotch disease of avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 37:216.
- Wright D., and Mumford R. (1999). *Pepino mosaic potexvirus* (PepMV). First records in tomato in United Kingdom. *Plant Disease Notice No. 89*. York, UK: Central Science Laboratory.
- Yogev A., Raviv M., Kritzman G., Hadar Y., Cohen R., Kirshner B. and Katan J. (2009). Suppression of bacterial canker of tomato by composts. *Crop Protection*, 28:97-103.
- Zhang Z., Peng S., Jiang D., Pan S., Wang H. and Li. S. (2012). Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *European Journal of Plant Pathology*, 132:9–16.