



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS ÁGRICOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**EFFECTO DE MIEL, AMINOÁCIDOS, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y *Bacillus subtilis* CONTRA *Cucumber mosaic virus* EN CALABACITA, EFECTO DE TERPENOIDES EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Cucumber mosaic virus* (CMV) EN CALABACITA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ESTOS COMPUESTOS EN UN MATERIAL TOLERANTE Y UNO SUSCEPTIBLE A CMV**

**MARIBEL REYES OSORNIO**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO  
2008

La presente tesis, titulada: **EFFECTO DE MIEL, AMINOÁCIDOS, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y *Bacillus subtilis* CONTRA *Cucumber mosaic virus* EN CALABACITA, EFECTO DE TERPENOIDES EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Cucumber mosaic virus* (CMV) EN CALABACITA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ESTOS COMPUESTOS EN UN MATERIAL TOLERANTE Y UNO SUSCEPTIBLE A CMV**, realizada por la alumna: Maribel Reyes Osornio, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOPATOLOGÍA  
FITOSANIDAD  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO -----  
DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR -----  
DRA. EMMA ZAVALA MEJÍA

ASESOR -----  
DR. GABRIEL GUTIÉRREZ ALONSO

ASESOR -----  
DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, México, 13 de junio del 2008.

# EFFECTO DE MIEL, AMINOÁCIDOS, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y *Bacillus subtilis* CONTRA *Cucumber mosaic virus* EN CALABACITA, EFECTO DE TERPENOIDES EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Cucumber mosaic virus* (CMV) EN CALABACITA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ESTOS COMPUESTOS EN UN MATERIAL TOLERANTE Y UNO SUSCEPTIBLE CMV

**Maribel Reyes Osornio, MC.**

Colegio de Postgraduados, 2008

Se comparó en invernadero el efecto de la miel (M), ácido acetilsalicílico (ASA), aminoácidos (AA) y *Bacillus subtilis* (BS) en la severidad del *Cucumber mosaic virus* (CMV), absorbancia, producción de biomasa fresca (PBF), contenido total de terpenoides y de nutrimentos en calabacita variedad Grey Zucchini (GZ). El tratamiento AA presentó estadísticamente la severidad más alta, así como la mayor absorbancia; los tratamientos M, BS y ASA presentaron 12 terpenoides, AA 11 y los testigos 10. El mayor contenido de Fe, Zn y Mn lo tuvieron los tratamientos M, BS y ASA. Por otro lado, se evaluaron dos extractos totales de terpenoides (Tr), obtenidos de plantas de calabacita GZ inoculadas (PI) con CMV y de plantas no inoculadas (PNI), para evaluar la severidad, PBF y absorbancia en plantas de calabacita GZ. Se pesaron 0.5, 0.2 y 0.05g de cada terpenoide, se mezclaron con savia infectiva obtenida de hojas de plantas de calabacita infectadas con CMV (1:1, vol/vol) y se inocularon en plantas sanas. Los tratamientos TrPNI 0.05g y TI tuvieron 15.2% menor severidad, el tratamiento TI redujo su PBF en 53.1% y los tratamientos TrPNI 0.5g, TrPI 0.2g y TI tuvieron 12% más absorbancia que los demás. En otro ensayo se evaluaron las variables antes mencionadas, además del contenido total de terpenoides en plantas de GZ y Terminator® (TR) no inoculadas (S) y plantas inoculadas (I) con CMV. La mayor severidad y absorbancia se registró en GZI y el mayor PBF en TRS. Las plantas de ambos materiales, tanto inoculados como no inoculados, presentaron 11 terpenoides.

**Palabras clave:** Severidad de virosis, concentración viral, triterpenos, análisis nutrimental.

**EFFECT OF HONEY BEE, AMINOACIDS, ACETIL SALICILIC ACID AND *Bacillus subtilis* ON *Cucumber mosaic virus*, EFFECT OF TERPENOIDS ON *Cucumber mosaic virus* (CMV) INFECTION IN ZUCHHINI PLANTS AND DETERMINATION OF TOTAL AMOUNT OF THESE COMPOUNDS IN ONE SUSCEPTIBLE AND ONE TOLERANT MATERIAL TO CMV**

**Maribel Reyes Osornio, MC.**

Colegio de Postgraduados, 2008

The effect of honey bee (HB), acetil salicilic acid (ASA), aminoacids (AA) and *Bacillus subtilis* (BS) on severity caused by *Cucumber mosaic virus* (CMV), absorbance, fresh tissue weight (FTW), total amount of terpenoid and nutrients was evaluated in zucchini plants cv. Grey Zucchini (GZ) under greenhouse conditions. Statistically, treatment AA was the highest severity and absorbance; treatments HB, BS and ASA showed 12 terpenoids, AA 11 and both controls 10. The highest content of Fe, Zn and Mn was recorded in treatments HB, BS and ASA. By the other hand, the effect of two total amounts of terpenoids (Tr), obtained from zucchini plants cv. GZ inoculated (IP) with CMV and no inoculated (NIP), on severity, FTW and absorbance in zucchini plants cv GZ were evaluated. Three amounts of each terpenoid (0.5, 0.2 and 0.05 g) were mixed with infective sap from zucchini plants infected with CMV (1:1, vol/vol) and rubbed onto healthy plants of zucchini. Treatments TrNIP 0.05g and IC (inoculated control) had 15.2% lower severity, treatment IC was 53.1% less FTW and treatments TrNIP 0.5g, TrIP 0.2g and TI had 12% more absorbance than the others. Variables above mentioned were evaluated in other assay as well as the total amount of terpenoids in zucchini plants cv. GZ and Terminator<sup>®</sup> (TR) no inoculated (NI) and inoculated plants (I) with CMV. The highest severity and absorbance were recorded in IGZ and the most high value of FTW in TRS. Plants of both plant materials, inoculated and no inoculated, showed 11 terpenoids.

**Additional key words:** Virus severity, viral concentration, triterpenes, nutritional analysis.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y el Colegio de Postgraduados, por haber financiado mi formación.

Al, **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez**, por la dirección y orientación del presente trabajo, además, por su apoyo, confianza y paciencia brindados.

A la, **Dra. Emma Zavaleta Mejía**, por su asesoría y motivación en la realización de esta investigación.

Al **Dr. Gabriel Gutiérrez Alonso**, por su asesoría y aportaciones brindadas.

Al **Dr. Marcos Soto Hernández**, por su asesoría y aportaciones de gran conocimiento, brindadas.

A todas las personas que de alguna forma colaboraron en el desarrollo y culminación de este trabajo.

## DEDICATORIA

**Dios:** Por sus bendiciones.

**A Francisca Osornio Becerril mi madre:** Por que desde donde esta me cuida, por haberse convertido en mi angel. Y por su grandes enseñanzas que conservaré toda mi vida.

**y Maurilio Reyes Valdez mi padre:** Por su cariño, comprensión y apoyo y por ser un gran viejo.

**A Marco Antonio Guzmán Reyes, mi hijo:** Por ser mi hijo y marcarme cada momento lo difícil pero maravilloso que es ser madre.

**A Marco Antonio Guzman Moreno:** Por ser comprensivo e impulsarme a seguir adelante en todo momento. Pero sobre todo por ser el padre de mi hijo.

**A Maura :** Por su gran apoyo, cariño y comprensión y tratar de conformar la cabeza de la familia.

**A Jaime, Rutilo, Arturo, Guadalupe, Beatriz y Lourdes,** mis hermanos, por su gran apoyo y cariño.

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2.	OBJETIVOS.....	2
3.	HIPÓTESIS.....	3
4.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
	4.1. Origen y distribución.....	3
	4.2. Importancia de Cucurbitaceas.....	4
	4.3. Importancia de CMV en calabacita.....	5
	4.4. <i>Cucumber mosaic cucumovirus</i> (CMV).....	5
	4.5. Transmisión de CMV.....	5
	4.6. Sintomatología.....	6
	4.7. Estrategias de manejo contra virus.....	7
	4.7.1 Rotación de cultivos .....	7
	4.7.2. Control de malezas.....	7
	4.7.3. Barreras físicas.....	7
	4.7.4. Control químico de vectores.....	7
	4.7.5. Resistencia genética.....	8
	4.7.6. Nutrición.....	8
	4.7.7. Cucurbitacinas.....	8
	4.7.7.1. Características estructurales .....	9
	4.7.7.2. Ruta metabólica de las cucurbitacinas.....	10
	4.7.7.3. Productos comerciales a base de cucurbitacinas.....	11
	4.7.7.4. Usos.....	11
	4.7.8. Miel de abeja.....	12
	4.7.8.1. Usos .....	12
	4.7.9. Viretrol®.....	13
	4.7.9.1. Usos.....	13
	4.7.10. Acido acetil salicílico (ASA).....	14
	4.7.11. Resistencia sistémica inducida por <i>Bacillus subtilis</i> (Biologic®).....	14

5	LITERATURA CITADA.....	15
CAPITULO 1.	EFFECTO DE MIEL, AMINOÁCIDOS, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y <i>Bacillus subtilis</i> CONTRA <i>Cucumber mosaic virus</i> EN CALABACITA .....	20
	RESUMEN.....	20
	ABSTRACT .....	20
1.1.	INTRODUCCIÓN.....	21
1.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1.2.1.	Establecimiento de almácigos .....	22
1.2.2.	Trasplante.....	23
1.2.3.	Tratamientos.....	23
1.2.4.	Inoculación.....	23
1.2.5.	Severidad .....	24
1.2.6.	Producción de biomasa fresca .....	24
1.2.7.	Concentración viral .....	24
1.2.8.	Extracción de terpenoides totales .....	25
1.2.9.	Cromatografía .....	25
1.2.10.	Análisis nutrimental.....	26
1.2.11.	Análisis de datos.....	26
1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
1.3.1.	Severidad.....	26
1.3.2.	Producción de biomasa fresca.....	27
1.3.3.	Concentración viral .....	28
1.3.4.	Contenido de terpenoides totales.....	29
1.3.5.	Número de terpenoides.....	29
1.3.6.	Análisis nutrimental.....	31
1.4.	CONCLUSIONES.....	33
1.5.	LITERATURA CITADA.....	33
CAPITULO 2.	EFFECTO DE TERPENOIDES EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) EN CALABACITA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ESTOS	

	<b>COMPUESTOS EN UN MATERIAL TOLERANTE Y UNO SUSCEPTIBLE A CMV.....</b>	<b>37</b>
	<b>RESUMEN.....</b>	<b>37</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
	<b>2.2.1. Establecimiento del almácigo .....</b>	<b>40</b>
	<b>2.2.2. Trasplante.....</b>	<b>40</b>
	<b>2.2.3. Fuente de inóculo .....</b>	<b>41</b>
	<b>2.2.4. Tratamientos .....</b>	<b>41</b>
	<b>2.2.5. Variables evaluadas.....</b>	<b>42</b>
	<b>2.2.6. Análisis de datos.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
	<b>2.3.1. Severidad.....</b>	<b>44</b>
	<b>2.3.2. Producción de biomasa fresca.....</b>	<b>46</b>
	<b>2.3.3. Análisis serológico .....</b>	<b>46</b>
<b>2.4.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>2.5.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>51</b>
	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....</b>	<b>53</b>
<b>1</b>	<b>Conclusiones. ....</b>	<b>53</b>
<b>2</b>	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE CUADRO

<b>Cuadro 1.</b>	Contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn) y manganeso (Mn) en tejido foliar de plantas de calabacita inoculadas con <i>Cucumber mosaic virus</i> y sometidas a seis tratamientos. *TS, testigo sin inocular; TI, testigo inoculado; M, miel; BS, <i>Bacillus subtilis</i> ; ASA, ácido acetil salicílico y AA, aminoácidos.....	<b>31</b>
------------------	--	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Sintomatología de CMV en plantas de calabacita. A) Planta con mosaico ligero, aclaramiento de venas y deformación foliar ligera a los 10 días después de la inoculación (ddi), B) planta con achaparramiento, deformación foliar severa y amarillamiento de venas a los 30 ddi.....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b>	Estructura básica de las cucurbitacinas (Marino, 2004).....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b>	Biosíntesis de cucurbitacinas, a partir de la ruta del ácido mevalónico (Bramley, 1997).....	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b>	Estructura básica de los aminoácidos (Mckee y Mckee, 2003).	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b>	Efecto de la aplicación de aminoácidos (AA), ácido acetil salicílico (ASA), miel (M) y <i>Bacillus subtilis</i> (BS), en la A) severidad de la virosis, B) peso de biomasa fresca, C) concentración de virus (absorbancia) y D) contenido total de terpenoides en extracto de éter en plantas de calabacita inoculadas con el <i>Cucumber mosaic virus</i> en invernadero. TI, testigo inoculado; TS, testigo no inoculado. *Medias con la misma letra son estadísticamente similares, DMS $P \leq 0.05$ . .....	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b>	Cromatoplaca en capa fina sistema tolueno: acetato de etilo (3:1) y revelador vainillina/ácido fosfórico al 50%, que muestra el número de compuestos encontrados en extractos de éter en plantas de calabacita sometidas a diferentes tratamientos: TS, testigo sin inocular; TI, testigo inoculado; AA, aminoácidos; ASA, ácido acetil salicílico; BS, <i>Bacillus subtilis</i> y M, miel. * Número de compuesto indicado con flechas negras; las flechas rojas marcan los compuestos no detectados en esos tratamientos. ....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b>	Severidad ocasionada por el <i>Cucumber mosaic virus</i> en plantas de calabacita de la variedad susceptible Grey zucchini	

(GZ) y el híbrido Terminator® (TR). 1) planta de TR sin inocular, 2) planta de GZ sin inocular, 3) planta de TR inocular y 4) planta de GZ inoculara.....

45

**Figura 8.**

Efecto de extractos de terpenoides (Tr) obtenidos de plantas de calabacita no inocularas (PNI) y plantas inocularas (PI) con CMV a diferentes concentraciones (0.05, 0.2 y 0.5g) mezclados con savia infectiva de este virus. A) severidad de la virosis, B) peso de biomasa fresca, C) concentración de virus (absorbancia). TS: testigo negativo (sin inocular), TI: testigo positivo (inocularo sólo con CMV), TrPNI0.5g: terpenoides de planta no inoculara 0.5g, TrPI0.5g: terpenoides de planta inoculara 0.5g, TrPNI0.2g: terpenoides de planta no inoculara 0.2g, TrPI0.2g: terpenoides de planta inoculara 0.2g, TrPNI0.05g: terpenoides de planta no inoculara 0.05g y TrPI0.05g: terpenoides de planta inoculara 0.05g. \*Medias con la misma letra son estadísticamente similares, DMS  $\alpha \leq 0.05$ .....

47

**Figura 9.**

Comportamiento de la variedad de calabacita Grey zucchini y el híbrido Terminator® inocularos con el *Cucumber mosaic virus* en invernadero. A) severidad de la virosis, B) peso de biomasa fresca, C) concentración de virus (absorbancia) y D) contenido total de terpenoides en extracto étereo. TRI: Terminator® inocularo; TRS: Terminator® no inocularo; GZI: Grey zucchini inocularo; GZS: Grey zucchini no inocularo. \*Medias con la misma letra son estadísticamente similares, DMS  $\alpha \leq 0.05$ .....

48

**Figura 10.**

Cromatoplaça en capa fina de extracto étereo que muestra a los terpenoides totales (observados de color violeta o rosado) obtenidos de plantas de calabacita tolerantes (Terminator®) y susceptibles (Grey zuchinni) inocularas y no inocularas con

*Cucumber mosaic virus* en el sistema tolueno: acetato de etilo 3:1 y revelador vainillina/ácido fosfórico al 50%. TRS: Terminator® no inoculada, TRI: Terminator® inoculada, GZS: Grey zucchini no inoculada, GZI: Grey zucchini inoculada.

\*Número de terpenoides..... **49**

## **APÉNDICE**

<b>APÉNDICE 1:</b>	ESCALA DIAGRAMATIZADA ARBITRARIA DE SEVERIDAD DE VIROSIS EN CALABACITA .....	<b>55</b>
--------------------	---	-----------

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La calabacita (*Cucurbita pepo* L.H. A. Gray) es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial, cuyo consumo anual se ha incrementado recientemente en 6.6% aproximadamente. Según la FAO, México es el principal exportador de calabacita con una aportación del 40% en el mercado internacional, 84% del cual se exporta a los Estados Unidos de Norteamérica. A nivel nacional, los principales estados productores de calabacita son Sonora y Sinaloa; otras entidades con menor producción de este cultivo son Chiapas, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Puebla, San Luís Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Anónimo, 2005).

El *Cucumber mosaic cucumovirus* (virus mosaico del pepino, CMV) es un virus de distribución cosmopolita que afecta a diversas especies pertenecientes a 70 familias botánicas (Conti *et al.*, 2000 y Sutic *et al.*, 1999), particularmente en las cucurbitáceas, ocasionando grandes pérdidas en calabacita (*Cucurbita pepo*) y melón (*Cumis melo*) establecidos a cielo abierto (Blancard *et al.*, 1996). El CMV es transmitido por cerca de 80 especies de áfidos, siendo las más importantes *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* (Hadidi *et al.*, 2005).

El CMV provoca grandes pérdidas en los cultivos, sobre todo si la infección se presenta en las primeras etapas de desarrollo del cultivo (Blancard *et al.*, 1996). Algunas de las principales estrategias de manejo de la enfermedad provocada por este virus son: uso de insecticidas contra los áfidos vectores, resistencia genética convencional y no convencional, protección cruzada, transgenia (Hadidi *et al.*, 2005) e inducción de resistencia sistémica adquirida (RSA) y resistencia sistémica inducida (RSI) por diversos elicitores contra hongos, nemátodos, plantas parásitas y virus (Vallad and Goodman, 2004). Algunos de los elicitores de mayor uso han sido el ácido salicílico (AS) y la aspirina, que puede modular cambios en la expresión de genes de resistencia de patógenos de plantas al inducir RSA (Yalpani *et al.*, 1993). Si los mecanismos de defensa están activos debido a un estímulo previo, como la

aplicación de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas como *Bacillus subtilis*, a la infección por algún microorganismo fitopatógeno, la enfermedad puede ser reducida. Consecuentemente, la RSI se caracteriza por un aumento en la capacidad defensiva de una planta contra diversos patógenos (Van Loon *et al.*, 1998).

Se sabe también que una nutrición balanceada en las plantas facilita el manejo de las enfermedades debido a que los nutrimentos pueden aumentar o disminuir la resistencia de los cultivos contra los microorganismos fitopatógenos (Velasco, 1999). Otros compuestos, como los aminoácidos, constituyen sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación, tanto foliar como radical, que se transportan a los órganos de demanda favoreciendo el desarrollo de la planta (Franco, 1989); la miel, asperjada al follaje favorece el depósito de glucosa hasta en un 33%, incrementa el nivel de energía para la absorción de nutrimentos y con ello el vigor de la planta (Villegas *et al.*, 2001).

Uno de los sistemas naturales de defensa de las plantas son los metabolitos secundarios, como las cucurbitacinas, que son sustancias tóxicas para los hongos fitopatógenos y algunos insectos (Marino, 2004), y se encuentran presentes en muchas familias botánicas de plantas particularmente en el caso de las cucurbitáceas (Metcalf *et al.*, 1982 y Marino, 2004). Lo que podrían ser benéficos contra CMV en calabacita.

Por lo anterior, se realizó el presente trabajo con los siguientes

## **2. OBJETIVOS**

1. Determinar el efecto de la miel, aminoácidos y ácido acetilsalicílico en la concentración del virus y la severidad del daño inducido por el mismo, el peso

de biomasa fresca, concentración de nutrimentos, y contenido y concentración de terpenoides en plantas de calabacita infectadas con CMV.

2. Conocer si la adición de diferentes cantidades de terpenos a savia infectiva con *Cucumber mosaic virus* (CMV) disminuyen la transmisión y severidad del virus en plantas de calabacita.
3. Determinar si existen diferencias en el contenido de terpenos entre la variedad de calabacita Grey zucchini susceptible a CMV y el híbrido Terminator<sup>®</sup> tolerante a este virus.

### **3. HIPÓTESIS**

1. La aplicación de miel, ácido acetil salicílico, *Bacillus subtilis* y aminoácidos en plantas de calabacita estimulan la producción y concentración de terpenoides.
2. La mezcla de terpenoides presentes en los extractos de tejido de calabacita más CMV inoculadas a calabacita, disminuye la transmisión y severidad de CMV
3. El híbrido de calabacita con resistencia a virosis Terminator tiene mayor contenido de terpenoides que la variedad de calabacita susceptible a virosis Grey zucchini.

### **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **4.1. Origen y distribución**

La calabacita (*Cucurbita pepo* L.H. A. Gray) pertenece a la familia *Cucurbitaceae*. Los restos encontrados en la región del Valle de Tehuacan, Puebla, el Valle de Oaxaca y Tamaulipas, que datan de hace más de 7000 años, sugieren que su origen

fue en el centro-sur de México (Lira, 1992 y Lira, 1995). Se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el Sur de América. Se aprovecha principalmente como verdura (el fruto inmaduro de la calabacita), aunque también se consumen las flores, el fruto maduro y las semillas que tienen cualidades medicinales, además de que algunas calabazas se producen para forraje. Las cucurbitáceas en general presentan diversos problemas fitosanitarios, particularmente las enfermedades virales causadas por el *Cucumber mosaic Cucumovirus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic Potyvirus* (virus amarillo del zucchini, ZYMV), *Watermelon mosaic virus Potyvirus* (virus mosaico de la sandía, WMV), *Papaya ringspot Potyvirus* (mancha anular de la papaya, PRSV) y *Squash mosaic Comovirus* (virus mosaico de la calabaza, SqMV), entre otros (Blancard *et al.*, 1996, Nee, 1993 y Lira *et al.*, 1998).

#### **4.2. Importancia de cucurbitáceas**

La superficie mundial cosechada anualmente de cucurbitáceas de 1994 a 1998, fue de 1.11 millones de hectáreas, con una tasa de crecimiento promedio anual de 6.6% con un rendimiento aproximado de 11.45 ton/ha. Los países que destinan una mayor superficie al cultivo son India y China con 29.8% y 14.6%, respectivamente, seguidos por Rumania con 7.2%, Ucrania con 4.1% y México con 3.8% (Anónimo, 2005).

Según la FAO, México es el primer país exportador de calabacita, abarcando un 40% del mercado internacional con un 84% destinado para los Estados Unidos. En el 2003, México exportó 153,000 ton siendo los principales estados productores Sinaloa (78,200 ton) y Sonora (38,000 ton) (Anónimo, 2005). Para el ciclo 2006-2007, se sembraron 19,241 ha, con un rendimiento de 164,462 ton (Anónimo, 2007).

#### **4.3. Importancia de CMV en calabacita**

El CMV es uno de los principales virus distribuidos a nivel mundial, presentándose con mayor frecuencia en las cucurbitáceas, ocasionando grandes pérdidas en

cultivos de la calabacita (*Cucurbita pepo*) y melón (*Cucumis melo*), sandía (*Citrullus vulgaris*) y pepino (*Cucumis sativus*) (Blancard *et al.*, 1996). Tiene una amplia gama de hospedantes naturales que comprenden cerca de 800 especies pertenecientes a 70 familias botánicas (Hadidi *et al.*, 2005). El primer cultivo donde se reportó, fue en maíz (*Zea mays*) en 1934, como su hospedante natural, posteriormente fue reportado en alfalfa (*Medicago sativa*) en Yugoslavia (Sutic *et al.*, 1999).

Además de las cucurbitáceas, otros cultivos de importancia económica son afectados considerablemente por el CMV como el jitomate (*Lycopersicon esculentum*), pimiento (*Capsicum pendulum*), apio (*Apium graveolens*), chile (*Capsicum annum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), lechuga (*Latuca sativa*), además de diversas malezas como el quelite (*Chenopodium quinoa* y *Ch. amaranticolor*) y algunas especies del género *Prunus* (Sutic *et al.*, 1999 y Conti *et al.*, 2000).

#### **4.4. Cucumber mosaic Cucumovirus (CMV)**

El CMV pertenece a la familia *Bromoviridae*, presenta partículas virales poliédricas con un diámetro de 30 nm y constituidas por 180 subunidades constituidas por 12 pentámeros y 20 hexámeros que forman la cápside; su genoma está compuesto de tres segmentos de RNA monocatenario de polaridad positiva (Matthews, 1991, Blancard *et al.*, 1996, Sutic *et al.*, 1999 y Conti *et al.*, 2000).

#### **4. 5. Transmisión de CMV**

El CMV se transmite de forma no persistente por cerca de 80 especies de áfidos, siendo el más importante *Aphis gossypii* (Sutic *et al.*, 1999 y Hadidi *et al.*, 2005). Otros áfidos que transmiten el CMV son: *A. fabae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Myzus persicae*. El virus es adquirido por el insecto en sesenta segundos mediante picaduras de prueba y puede ser transmitido inmediatamente a otro hospedante susceptible. Los individuos que han adquirido el virus solamente por picadura de

prueba permanecen virulíferos durante un periodo máximo de 4 horas si no se alimentan de plantas infectadas nuevamente (Blancard *et al.*, 1996, Sutic *et al.*, 1999 y Conti *et al.*, 2000). El CMV puede transmitirse por semilla en diversas especies de las familias *Leguminosae*, *Solanaceae* y *Cucurbitaceae* (Hadidi *et al.*, 2005).

#### 4. 6. Sintomatología

Al inicio de la infección, las hojas muestran mosaicos y una ligera reducción en el crecimiento, conforme avanza la enfermedad las hojas presentan un ligero enchinamiento (Figura.1A), posteriormente las venas se muestran cloróticas, el enchinamiento y los mosaicos se hacen más severos; puede presentarse una deformación foliar (ligeramente filiforme), achaparramiento y deformación de la planta (Figura.1B). Los frutos pueden presentar resistencia al corte, quedar ahoyados o picados y ligeramente deformes con lo cual se reduce la calidad de la producción (Blancard *et al.*, 1996).



**FIGURA 1. SINTOMATOLOGÍA DE CMV EN PLANTAS DE CALABACITA. A) PLANTA CON MOSAICO LIGERO, ACLARAMIENTO DE VENAS Y DEFORMACIÓN FOLIAR LIGERA A LOS 10 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN (DDI), B) PLANTA CON ACHAPARRAMIENTO, DEFORMACIÓN FOLIAR SEVERA Y AMARILLAMIENTO DE VENAS A LOS 30 DDI.**

#### 4. 7. Estrategias de manejo contra virus

En el caso del CMV, se deben considerar algunas estrategias preventivas para retrasar o evitar que el virus se presente en las primeras etapas de desarrollo como las que se indican a continuación:

#### **4. 7.1. Rotación de cultivos**

La rotación de cultivos resulta eficiente si en el ciclo previo al establecimiento de un cultivo susceptible se establece una especie no susceptible como la lechuga o la espinaca con lo cual se reduce considerablemente la incidencia de la enfermedad (Hadidi *et al.*, 2005).

#### **4. 7.2. Control de malezas**

Deben eliminarse las malezas para disminuir la fuente de inóculo así como de hospedantes del vector. Las plantas a eliminar deben ser aquellas presentes en los caminos, entre parcelas y los desagües de los canales de riego.

#### **4. 7.3. Barreras físicas**

Los cultivos de calabacita pueden protegerse de las infestaciones de áfidos utilizando mallas o cubiertas flotantes, colocadas directamente sobre las plántulas y plantas jóvenes. Asimismo, pueden utilizarse acolchados de plástico de colores para alejar a los pulgones (Conti *et al.*, 2000).

#### **4. 7.4. Control químico de vectores**

La aplicación de insecticidas contra los áfidos, en cuanto se presenten individuos (especialmente en su forma alada) sobre la parte inferior de las hojas o sobre los ápices de las plántulas a trasplantar, si no se han notado síntomas de virosis, pues en caso contrario, se empeora el problema ya que la transmisión del virus ocurre con picaduras muy leves, antes de que el insecticida tenga tiempo de actuar (Blancard *et al.*, 1996).

#### **4. 7.5. Resistencia genética**

En este caso se confiere resistencia contra el virus con la introducción de un gen o genes encontrados en especies silvestres, que muestran resistencia dentro de variedades comerciales. Actualmente existen a la venta un gran número de híbridos de calabacita resistentes o tolerantes a diversos virus (Blancard *et al.*, 1996 y Hadidi *et al.*, 2005).

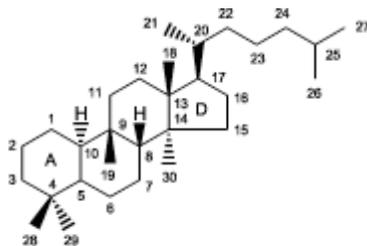
#### **4. 7.6. Nutrición**

Según Huber, (1997) la enfermedad es la expresión de la interacción entre la planta, el patógeno y el ambiente, y el combate de la enfermedad es más efectiva cuando estos factores son reconocidos y comprendidos. Los nutrimentos son un factor importante del ambiente que involucra la enfermedad. Puesto que la nutrición en las plantas es externa, se puede manejar fácilmente dando a la planta solo lo que necesita, puesto que los nutrimentos influyen también en el crecimiento y la supervivencia de los patógenos, en la predisposición, resistencia y tolerancia de las plantas a las enfermedades. En el caso particular de los virus, se sabe que la infección provocada por estos fitopatógenos disminuye la absorción, translocación y concentración de los nutrimentos en la planta; sin embargo una óptima nutrición promueve el desarrollo de la planta ayudando a disminuir la severidad de los daños (Velasco, 1999).

#### **4. 7.7. Cucurbitacinas**

Las cucurbitacinas son metabolitos secundarios presentes en las plantas. Químicamente son triterpenos altamente oxigenados de sabor amargo para los humanos. Estos compuestos se encuentran en diferentes familias botánicas, son de alta toxicidad y tienen varias actividades biológicas. Hasta la fecha hay más de 44

diferentes cucurbitacinas cuyo esqueleto original se muestra en la Figura 2 (Metcalf *et al.*, 1982 y Marino, 2004).



**FIGURA 2.** ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS CUCURBITACINAS (MARINO, 2004).

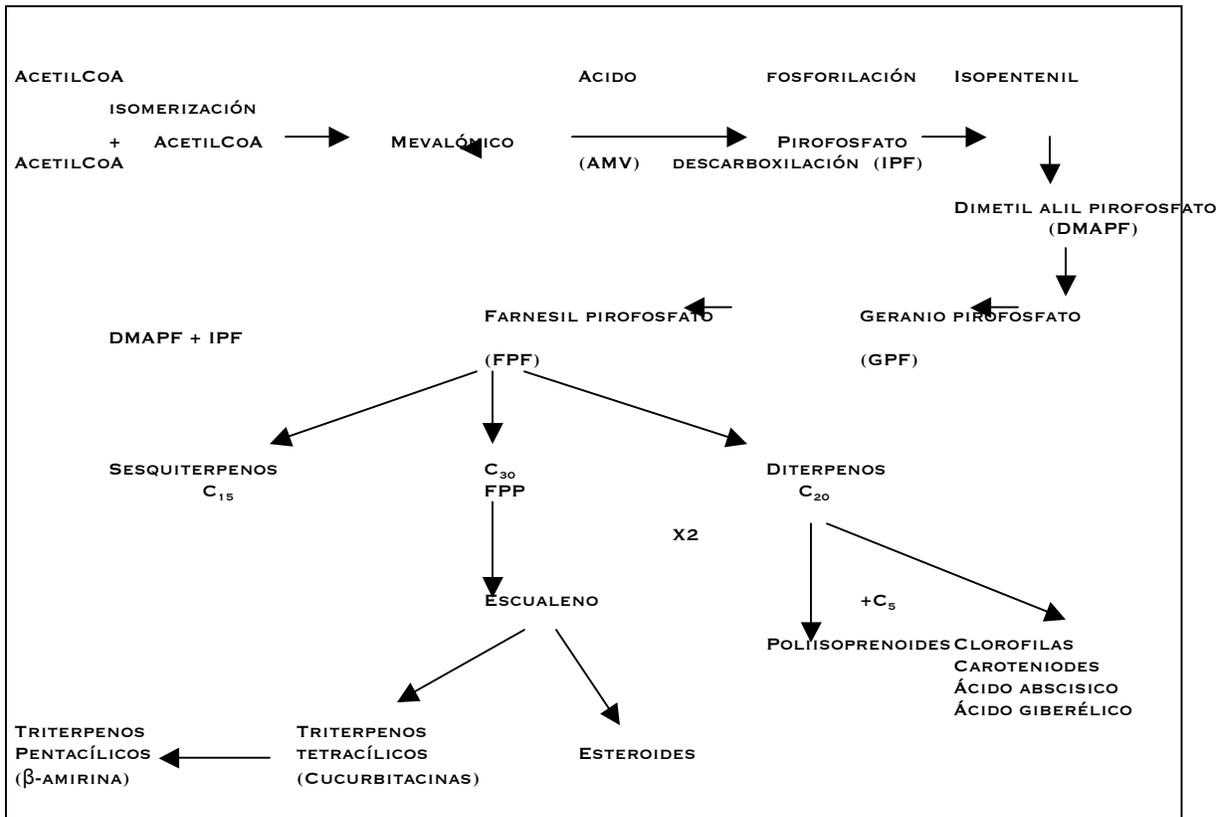
#### 4. 7.7.1. Características estructurales

Las primeras agliconas aisladas como estructura cucurbitano, recibieron como nombre la palabra cucurbitacina seguida de una letra, de acuerdo con una cronología de aislamiento estructural (Figura. 3), pero no se constituyó como una regla general, encontrándose actualmente diversos nombres para esa sustancia (Marino, 2004).

Las cucurbitacinas B y E son las más frecuentes, pues se encuentran en el 90% las plantas. Entre las familias más comunes que contienen cucurbitacinas están la *Cucurbitaceae*, *Begoniaceae*, *Chysobalanaceae*, *Cruciferae*, *Datisceae*, *Desfontaniaceae*, *Elaeocarpaceae*, *Flacourtiaceae*, *Lauraceae*, *Liliaceae*, *Chrysobalanaceae*, *Polemoniaceae*, *Primulaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Sterculiaceae* y *Thymelaeaceae*. Éstos compuestos pueden encontrarse en la raíz, tallo, hojas, flores y frutos (Metcalf y Metcalf, 1992 y Marino, 2004).

#### 4.7.7.2. Ruta metabólica de las cucurbitacinas

Las cucurbitacinas derivan de la misma ruta de biosíntesis del ácido mevalónico (MAV) (Figura. 3).



**FIGURA 3. BIOSÍNTESIS DE CUCURBITACINAS, A PARTIR DE LA RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO (BRAMLEY, 1997).**

Las cucurbitacinas se biosintetizan por la ruta de la acetil coenzima A, a través de un intermediario que es el ácido mevalónico (AMV), ésta ruta se inicia por condensación de dos moléculas de acetil coenzima A (ACoA), dando acetoacetil-CoA (AcCoA), el producto final de la condensación de ésta, con otra molécula de AcCoA, se reduce al convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidro-3-metil valerianico), y posteriormente por fosforilación da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPF). El acoplamiento a DAMPF de nuevas unidades de IPF, origina al geranio pirofosfato (GPF), que incrementa el número de carbonos de cinco en cinco, formando a los diterpenos como las clorofilas y carotenoides y los triterpenos como las cucurbitacinas (Bramley, 1997).

#### 4. 7.7.3. Productos comerciales a base de cucurbitacinas

El producto comercial denominado Pesticida carrier grits 980<sup>®</sup> de Illinois Cereals Mills, contiene cucurbitacina E (2m $\mu$ ) asociado al insecticida metonil a 0.1%, contra diabrotica. La frecuencia de alimentación de los insectos aumenta gradualmente con el aumento de la concentración de la sustancia a 50 mg; por encima de 50 mg actúa como sustancia supresora de la alimentación. Otros productos comerciales a base de cucurbitacinas contra insectos son Slan<sup>®</sup> de Microflo Company a base de cucurbitacinas B y D a 0.12% más carbaril obtenidas en extracto clorofórmico de *Cucumis maxima* x *Cucumis andreana*, para el control de *Diabrotica*, (Medeiros-Macedo *et al.*, 2007).

#### 4. 7.7.4. Usos

Las cucurbitacinas se han utilizado principalmente para el control de diversas especies de insectos plaga; pues incrementa la longevidad de las hembras de *Repipta flavicans* depredador del escarabajo del pepino (*Diabroticina acalymma*), al consumir a *D. acalymma* que a su vez, se alimentaban de pepino, lo que la favorece para controlar la población del insecto plaga (Gámez-Virué y Eben, 2005); Ferguson *et al.*, (1983) realizó un estudio, donde encontró una correlación positiva entre el contenido de cucurbitacina y la alimentación del escarabajo del pepino *Diabroticina acalymma*, pues se mezcla con un insecticida para su control. Otras funciones que se les atribuye a las cucurbitacinas es como sustancias aleloquímicas, kairomonas y fagoincitantes (Medeiros-Macedo *et al.*, 2007).

No obstante a lo anterior, existen muchas cucurbitacinas cada una con funciones diferentes, por lo que pueden ser específicas para diversos insectos o incluso microorganismos. Bar-Num and Maye, (1988) al colocar cucurbitacinas D e I de un extracto de *Ecballium elaterium* en el medio de cultivo donde crecía el hongo *Botrytis cinerea*, encontraron que se inhibió la formación de la fenoloxidasa del hongo. La fenoloxidasas junto con proteasas provocan una reacción de incompatibilidad de genes, entre los hongos para su reproducción, como es el caso de *Podospora*

*anserina*, y en el caso de *Aspergillus nidulans*, de la fenoloxidasa depende, el desarrollo del pigmento verde oscuro de los conidios (Elliot, 1994).

#### **4. 7.8. Miel de abeja**

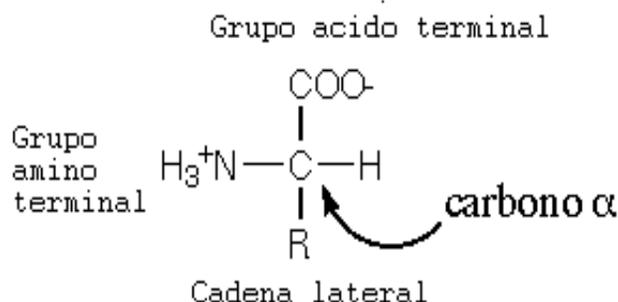
La miel se puede utilizar para estimular o ayudar a las defensas de las plantas, aunque la composición de la miel de abeja varía según el tipo de flores, sus componentes principales son: carbohidratos, minerales, proteínas, vitaminas, aminoácidos y agua (Crane, 1985, Piana *et al.*, 1989, Rodríguez-Otero *et al.*, 1992 y Martínez *et al.*, 1993). Se han encontrado también enzimas como la invertasa, la amilasa y la glucosidasa (Crane, 1985, Piana *et al.*, 1989 y Prior, 1989), además de otros compuestos de sales minerales como: potasio, fósforo, sodio, magnesio, calcio, hierro, cobre, manganeso, cromo, hierro y níquel, así como vitaminas C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, y niacina. De los aminoácidos, principalmente la prolina, en menor cantidad la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico (Davies y Jarris, 1982).

##### **4. 7.8.1. Usos**

Además del consumo humano de la miel, ha sido utilizada también como nutrimento para las plantas; sin embargo, son pocos los reportes acerca de la utilización de la miel para este fin. Una prueba realizada en plántulas de jitomate establecidas en tezontle regadas con solución Steiner + miel de abeja al 1% y asperjadas al follaje con miel al 2%, las plántulas desarrollaron 138.54% más tamaño, grosor y peso de raíz; el diámetro del tallo aumentó de 0.37 (Testigo) a 0.80 cm en plantas tratadas con miel (Villegas *et al.*, 2001). En el caso de virosis, se encontró que en plantas de jitomate asperjadas con melaza, ácido acetil salicílico (ASA)+ melaza y ASA + miel, se disminuyó la concentración del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) a los 15 días después de la inoculación, respecto al testigo (Ramírez *et al.*, 2006).

##### **4. 7.9. Viretrol®**

Es una fórmula comercial hecha a base de aminoácidos (aa), citocininas y acondicionadores utilizados para el manejo de virosis en los cultivos. Los aminoácidos son moléculas orgánicas pequeñas, con un grupo amino (NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo (COOH). La gran cantidad de proteínas que se conocen están formadas únicamente por 20 aa diferentes, todos ellos con la misma fórmula general (Figura. 4). El número de aa que forman una proteína oscila entre 100 y 300 (Mckee y Mckee, 2003).



**FIGURA 4.** ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS AMINOÁCIDOS (MCKEE Y MCKEE, 2003).

#### 4. 7.9.1. Usos

El Viretrol® se recomienda para cualquier tipo de cultivo y, de acuerdo con la etiqueta del producto, promueve y aumenta el efecto antioxidante de los carbohidratos e incrementa la diferenciación y el crecimiento de los primordios de los tejidos foliares, meristemáticos y parenquimáticos de las plantas.

Los aminoácidos constituyen las proteínas que forman la cápside de los virus, por lo que células infectadas por estos fitopatógenos dejan de aprovecharlos íntegramente para la síntesis de sus propias proteínas. Lo anterior, explica en parte la deficiencia general de compuestos solubles nitrogenados en tejidos infectados por virus comparados con tejidos sanos, lo cual puede ocurrir especialmente durante los períodos de mayor replicación viral (Matthews, 1991).

La aplicación de aminoácidos se ha utilizado para incrementar la resistencia natural contra patógenos de los cultivos (Kato *et al.*, 1985). En el caso particular del CMV, se

encontró que la aplicación de aminoácidos ocho días antes de la inoculación inhibió el movimiento sistémico del virus en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) (Santiago, 2007).

#### **4.7.10. Acido acetilsalicílico (ASA)**

El ácido salicílico (AS, ácido 2-hidroxibenzoico) puede modular cambios en la expresión de genes que confieren resistencia a patógenos incluyendo hongos, bacterias y virus (Yalpani *et al.*, 1993). La adición a la raíz de plantas de jitomate de 200 µM de AS incrementa significativamente los niveles de AS en hojas, además de que activa la RSA contra *Alternaria solani* (Spletzer and Enyedi, 1999). Sin embargo Coquoz *et al.*, (1995) asegura que las aplicaciones foliares de AS a plantas de papa y de aspirina (ASA) a plantas de tomate no incrementan la RSA. Ramírez *et al.*, (2006) reportaron una disminución en la concentración de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en plantas de jitomate tratadas con ASA + miel y ASA + melaza a los 15 y 30 después de la inoculación. Por otro lado, Coquoz *et al.*, (1995) mencionan que al aplicar directamente AS al 17.4% a plantas de papa se observó a los tres días un incremento hasta de 51 g, comparado con el testigo que solo pesó 0.83 g de peso fresco, además encontró que plantas de papa con altas concentraciones de AS son resistentes a *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani*. Algo parecido se obtuvo con el Acido acetil salicílico (Hammond-Kosack *et al.*, 1989).

#### **4.7.11. Resistencia sistémica inducida por *Bacillus subtilis* (Biologic®)**

El Biologic® es un producto comercial hecho a base de *B. subtilis*, utilizando como sustrato ácidos húmicos. Múltiples especies de *Bacillus* spp. han sido reportadas como elicitores de RSI en muchas especies vegetales como jitomate, chile, sandía, remolacha, tabaco y pepino contra enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus que infectan la parte aérea así como hongos patógenos de la raíz, nematodos y complejos de hongos causantes de ahogamiento de plántulas (Kloepper *et al.*, 2004).

McSpadden (2004) menciona que numerosos aislamientos de especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* expresan actividades supresoras en diversas enfermedades de las plantas además de promover su crecimiento. Lo anterior pudo corroborarse en plantas de calabacita tratadas con *B. subtilis*, aplicadas al suelo y follaje simultáneamente, obteniéndose una menor absorbancia en plantas de calabacita infectadas con CMV, que el testigo y en las plantas de calabacita donde se aplicó *B. subtilis* al suelo y se asperjaron con ASA presentaron un mayor tamaño (Maldonado-Cruz *et al.*, 2007). Se han hecho varias pruebas en diferentes cultivos que son atacados por diferentes patógenos, provocando RSI con *Bacillus subtilis*, siendo efectivo contra *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Bravo y García, 1974).

## 5. LITERATURA CITADA

- ANONIMO, 2007. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Centro de Estadística Agropecuaria.
- ANONIMO, 2005. La calabaza y la calabacita mexicanas en el mercado norteamericano. Claridades Agropecuarias. Diciembre. 2-21.
- BAR-NUM, N. AND MAYE, M. A. 1988. Cucurbitacins repressors of induction of laccase formation. *Phytochemistry*. 28:1369-1371.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H. Y PITRAT, M., 1996. Enfermedad de las *Cucurbitáceas*, Ed. Mundi-prensa, España. 301 p.
- BRAMLEY, M. P. 1997. Isopreniod metabolism. En *Plant biochemistry*. DEY, P. M., HARBORNE, J. B. Ed. Academic Press. 431 p.
- BRAVO OR, G. M. H. 1974. Phytochemical study of *Cucurbita maxima* seeds. *Annual Review. Academic Farm*. 40:463-73.
- CONTI, M.; GALLITELLI, D.; LISA, V.; LOVISOLO, G.; MARTELLI, P. G., RAGOZZINO, A.; LUIGI, R. G. Y VOVLAS, C., 2000. Principales virus de las plantas hortícolas, Ed. Mundi prensa, España, 206 p.
- CRANE, E. 1985. El libro de la miel. Fondo de la cultura económica. México. 384 p.

- COQUOZ, J. L.; BUCHALA, A. J.; MEUWLY, P. H. AND MÉTRAUX, J. P. 1995. Archidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* 85:1219-1224.
- DAVIES, A. M. C. AND HARRIS, R. G. 1982. Free amino acid analysis of honey from England and Wales application to geographical origin of honeys. *Journal. Apiculture Research*. 21:166-173.
- ELLIOT, G. C. 1994. Reproduction in fungi, General and physiological aspects. Ed. Chapman and Hall. London. 309 p.
- FERGUSON, J. E.; METCALF, E. R.; METCALF, R. L. AND RHODES, A. M. 1983. Influence of cucurbitacin content in cotyledons of *Cucurbitaceae* cultivars upon feeding behavior of Diabroticina beetles. *Journal Economical Entomology*. 76:47-51.
- FRANCO, J. A. 1989. Utilización de hidrolizados proteicos en horticultura. *Horticultura* 52:60-64.
- GÁMEZ-VIRUÉS, G. AND EBEN, A. 2005. Predatory behavior of *Repipta flavicans* stal (hemiptera: reduviidae), a natural enemy of diabroticina (coleoptera: chrysomelidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*: 107:642–651.
- HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K. AND KOGANEZAWA, H. 2005. Plant virus disease control, 2d. Ed. Ed. APS. PRESS. U.S.A. 684 p.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; ATKINSON, H.J. AND BOWLES, D. J. 1989. Systemic accumulation of novel proteins in the apoplast of the leavess of potato plants following root invasion by the cyst-nematode *Globodera rostochiensis*. *Physiol Molecular Plant Pathology*. 35:495-506.
- HUBER, D. M. 1997. Manejo de la nutrición para el combate de patógenos de plantas. *Agronomía Costarricense* 21:99-102.
- KATO, T.; YAMAGATA, M. AND TSUKUHARA, S. 1985. Upwar translocation of 14 C- amino compounds in xylem and phloem of citrus trees (Citrus unshiu Marc.). *Journal Japanese. Society Horticulture. Science*. 54:163-170.
- KLOEPPER, J. K.; RYU, C. M. AND ZHANG, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94:1259-1266.
- LIRA S. R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. IPGRI y UNAM. 280 p.

- LIRA, S. R.; RODRÍGUEZ, C. J.; RODRÍGUEZ-ARÉVALO, J. L.; CASTREJÓN, I. J. R. Y DOMÍNGUEZ-MARIANI, A. 1998. Diversidad e importancia de la familia Cucurbitáceas en México. Acta Botánica Mexicana, Volumen 42.
- LIRA, S. R. 1992. Recolección de cucurbitáceas. Memorias curso internacional recursos fitogenéticos. Palmira. 2:1-26.
- MALDONADO-CRUZ, E.; OCHOA-MARTÍNEZ, D. L. Y TLAPAL-BOLAÑOS, B. 2008. Efecto del Acido Acetil Salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por *Cucumber mosaic virus* en calabacita. Revista Chapingo, serie horticultura. 14:55-60.
- MARINO, V. L. M. 2004. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. Química Nova. 27:6 994-948.
- MARTÍNEZ, M. E. E.; GUERRA, H.J.; MONTILLA, G.J.L. AND MOLINA, M. 1993. Physicochemical análisis of spanish comercial eucalyptus honeys. Journal Apiculture Research. 32:121-126.
- MATTHEWS, R. E. F. 1991. Plant virology, 3rd ed. Ed. Academic Press, INC. New York. 835 p.
- McKEE, T. AND MAcKEE, J. R. 2003. Biochemistry, The molecular basis of life. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Companies. Co.Inc. New York, NY. 771 p.
- McSPADDEN, G. B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In agricultural systems. Phytopathology 94:1252-1258.
- METCALF, R. L.; RHODES, A. M. AND METCALF, E. R. 1982. Cucurbitacin contents and Diabroticite (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding upon *Cucurbita* spp. Environmental Entomology. 11:931-937.
- METCALF, R. L. AND METCALF, E. R. 1992. Plant kairomones in insect ecology and control. Chapman y Hall. New Cork. 168p.
- MEDEIROS-MACEDO, L. P.; CARÚS-GUEDES, J. V. Y GARCIA, J. F. 2007. Cucurbitacinas como fator de resistênci a insetos-praga, caatinga, Mossoró, Brasil. 20:127-132.
- NEE, M. 1993. Cucurbitaceae A.L. Juss. En: Flora de Veracruz. Fascículo 74. Instituto de Ecología. México. 133 p.
- PIANA, G.; RICCIARDELLI, G.E ISOLA, A. 1989. La miel, Mundi Prensa. Madrid España. 106 p.

- PRIOR, C. M. L. 1989. La miel en la alimentación humana. Ministerios de la agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 19 p.
- RAMÍREZ-FLOREZ, J.; OCHOA-MARTÍNEZ, D. L.; RODRÍGUEZ-MENDOZA, M. N. Y MORA-AGUILERA, G. 2006. Efecto de ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. Revista Chapingo, Serie Horticultura 12:239-243.
- RODRÍGUEZ-OTERO, J. L.; PASEIRO, P. J.; SIMAL, L.; TERRADILLOS, A. AND CEPESA. 1992. Determination de Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn and total cationic miliequivalents in Spanish commercial honey. Journal Apiculture Research. 31:65-66.
- SANTIAGO, S. E. 2007. Efecto de aminoácidos y hormonas vegetales en la distribución y concentración del *Cucumber mosaic virus*, y su efectividad biológica en la incidencia y severidad de virosis en jitomate. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 104 p.
- SPLETZER, M. E. AND ENYEDI, A. J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. Phytopathology 89:722-727.
- SUTIC, D. D.; FORD, R. E. AND TOSIC, M. T. 1999. Hamdbook of plant virus diseases. CRC Press. New York, NY. 553 p.
- VALLAD, G. E., AND GOODMAN, R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science. 44:1920-1934.
- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. AND PIETERSE, C.M.J. 1998. "Systemic Resistance Induced By Rhizosphere Bacteria". Annual Review. Phytopathology. 36: 453-483.
- VELASCO, V. V. A. 1999. Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. Terra 17:193-200.
- VILLEGAS, T. O. G.; RODRÍGUEZ, M. N.; TREJO, T. L. Y ALCANZAR, G. G. 2001, Potencial de la miel de abeja en la nutrición de plántulas de tomate, Terra 19:97-102.
- YALPANI, N.; SHULACV, V. AND RASKIN, I. 1993. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. Phytopathology. 83:702-708.

## **CAPITULO 1. EFECTO DE MIEL, AMINOÁCIDOS, ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y *Bacillus subtilis* CONTRA *Cucumber mosaic virus* EN CALABACITA**

### **RESUMEN**

Se evaluó en invernadero el efecto de la miel (M), ácido acetilsalicílico (ASA), aminoácidos (AA) y *Bacillus subtilis* (BS) en la concentración y severidad del *Cucumber mosaic virus* (CMV), peso de biomasa fresca (PBF), contenido total de triterpenos y contenido de nutrimentos en calabacita variedad Grey Zucchini. Los tratamientos evaluados fueron: 1) M+CMV, 2) ASA+CMV, 3) AA+CMV, 4) BS+CMV, 5) Testigo positivo (inoculado con CMV) (TI) y 6) Testigo sano (sin inocular) (TS). Se inoculó mecánicamente al CMV en las plantas de todos los tratamientos, excepto en TS. Se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de virus, medido mediante absorbancia, la cual fue mayor en los tratamientos AA y TI, así como en la severidad cuyo valor más alto se registró en el tratamiento AA. Estadísticamente, el mayor peso de biomasa fresca se tuvo en TS seguido de M y el menor en AA. En los tratamientos M, BS y ASA se detectaron 12 compuestos, en AA 11 y en TS y TI 10. El tratamiento M tuvo el mayor contenido total de compuestos. Los tratamientos M, BS y ASA tuvieron contenidos de Fe, Zn y Mn mayores que ambos testigos.

**Palabras clave:** Severidad de virosis, concentración viral, triterpenos, análisis nutrimental.

### **ABSTRACT**

The effect of honey bee (HB), acetyl salicylic acid (ASA), amino acids (AA) and *Bacillus subtilis* (BS) on concentration and severity of *Cucumber mosaic virus* (CMV), weight of fresh tissue (WFT), total amount of triterpenes as well as nutrient concentration were evaluated on plants of zucchini cv. Grey Zucchini inoculated with CMV under greenhouse conditions. Evaluated treatments were: 1) M+CMV, 2) ASA+CMV, 3) AA+CMV, 4) BS+CMV, 5) Positive control (inoculated with CMV) (PC) and 6) Negative control (no inoculated) (NC). Plants of all treatments were inoculated mechanically with CMV, except NC. The most high absorbance value was registered in AA and TI, while the most severity value was observed in AA, in both cases, they were statistically different of the other treatments. Statistical differences were observed in WFT in which case treatment TS was the highest value and in the second place was HB; the lowest value was observed in AA. Treatments M, BS and ASA showed 12 compounds, AA 11 and TS and TI, 10. The treatment M was the most total amount of compounds. Treatments M, BS and ASA were the most high content of Fe, Zn and Mn compared with both controls.

**Additional key words:** Virus severity, viral concentration, triterpenes, nutritional analysis.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por insectos son una de las limitantes más importantes en la producción de hortalizas ocasionando pérdidas económicas en cultivos como calabacita (*Cucurbita pepo* L.H. A. Gray) (Blancard *et al.*, 1996). El *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino, CMV) tiene una amplia gama de hospedantes y puede ser transmitido por más de 80 especies de áfidos de manera no persistente (Hadidi *et al.*, 2005). La aplicación de insecticidas ha sido el principal método de manejo para enfermedades virales transmitidas por insectos (Sikora *et al.*, 1998). Una alternativa al uso de insecticidas para el manejo de enfermedades virales transmitidas por áfidos, es el uso de compuestos que fortalezcan las defensas naturales de las plantas (Gozzo, 2003), mediante procesos como la resistencia

sistémica adquirida (RSA) y resistencia sistémica inducida (RSI) (Van Loon *et al.*, 1998). La RSA y RSI han sido efectivas contra hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parásitas e insectos fitófagos (Sticher *et al.*, 1997, Van Loon *et al.*, 1998). El ácido acetilsalicílico (ASA) es un inductor de RSA cuya concentración se incrementa local y sistémicamente antes de que aparezca la resistencia (Coquoz *et al.*, 1995). La aplicación de aminoácidos promueve y aumenta la antioxidación de carbohidratos en los tejidos foliares, meristemáticos y parenquimáticos de la planta, con el consecuente incremento en el crecimiento y desarrollo de los mismos (Mckee y Mackee, 2003). La aspersion de miel de abeja al follaje aumenta el nivel de energía para la absorción activa de carbohidratos, minerales, proteínas, vitaminas, aminoácidos y agua (Crane, 1985; Martínez *et al.*, 1993), incrementando el vigor de las plantas debido a su fácil difusión y penetración a los tejidos (Villegas *et al.*, 2001). Se tiene el antecedente de que algunos metabolitos secundarios como las cucurbitacinas, compuestos constituidos de triterpenos altamente oxigenados (Chambliss y Jones, 1966), pueden alterar el comportamiento alimenticio de algunos insectos ya que cuando son aplicados en bajas concentraciones inhiben la alimentación de *Diabrotica undecimpunctata howardi* y *Acalymma vittatum* (Ferguson *et al.*, 1983). Con base en lo anterior, se realizó el presente trabajo con la finalidad de determinar el efecto de la miel, aminoácidos y ácido acetilsalicílico en la concentración del virus y la severidad del daño inducido por el mismo, el peso de biomasa fresca, concentración de nutrimentos, y contenido y concentración de terpenoides totales en plantas de calabacita infectadas con CMV.

## **1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.2.1. Establecimiento de almácigos**

Se sembraron semillas de calabacita Grey Zucchini de Caloro® en almácigos de unisel de 200 cavidades (una semilla/cavidad) teniendo como sustrato peat moss®. Durante la germinación de la semilla y emergencia de la plántula, el almácigo

permaneció en una cámara de ambiente controlado, con una temperatura promedio de 25 °C día-noche y un fotoperíodo de 12 h. Los almácigos se regaron diariamente hasta el trasplante de las plántulas.

### **1.2.2. Trasplante**

Seis días después de la siembra, las plántulas se trasplantaron individualmente en vasos de unicel de un litro de capacidad, usando como sustrato una mezcla de tierra negra y tierra de hoja (1:1 v/v). Las plantas se regaron cada cuatro días con una solución fertilizante con la fórmula 12-12-17 + 2 Mg a una dosis de 1 g·litro.

### **1.2.3. Tratamientos**

Se evaluaron seis tratamientos con 20 repeticiones: 1) miel de abeja (M) a una concentración de 2 mL/100 mL de agua; 2) ácido acetilsalicílico (ASA) a una concentración de 1 g/L de agua; 3) aminoácidos (AA), utilizando el producto comercial Viretrol<sup>®</sup> a una dosis de 0.5 mL/100 mL de agua; 4) *Bacillus subtilis* (BS), utilizando el producto comercial Biologic<sup>®</sup> a una dosis de 0.5 mL/100 mL de agua; 5) Testigo inoculado con CMV (TI) y 6) Testigo sin inocular (TS). Todos los productos se aplicaron al follaje hasta punto de goteo cada tercer día a partir del trasplante, excepto la primer aplicación en el caso del tratamiento con *B. subtilis* que se hizo al suelo a los cuatro días después de la siembra y posteriormente cada tercer día.

### **1.2.4. Inoculación**

Siete días después de la siembra se hizo la inoculación mecánica del *Cucumber mosaic virus* (CMV) en las plántulas. Como inóculo se utilizaron plantas de calabacita infectadas con este virus mantenidas en cámara de crecimiento para evitar la llegada de insectos vectores y la potencial infección por otros virus. La presencia del CMV se confirmó por DAS-ELISA una semana antes de su uso. Se pesaron 6.5 g de tejido foliar de plantas de calabacita que mostraban mosaico y se molieron en un

macerador (Dayton R-4Z522<sup>®</sup>) agregando 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos + DIECA pH 7.2. La savia infectiva se mantuvo sobre un gel refrigerante hasta su inoculación en las hojas cotiledonares, sobre las que previamente se espolvoreó carborundum 600 mallas para ser frotadas posteriormente con un isopo perfectamente humedecido en la savia infectiva sobre toda la superficie foliar.

### **1.2.5. Severidad**

Veinte días después de la inoculación (ddi) se evaluó la severidad de la enfermedad en siete de las 20 plantas de cada tratamiento seleccionadas al azar utilizando una escala esquematizada arbitraria, con los siguientes valores: 0) planta asintomática, 1) enchinamiento foliar, 2) enchinamiento foliar y clorosis de venas, 3) mosaico, deformación de folíolos y achaparramiento, 4) mosaico severo, deformación foliar y achaparramiento, 5) clorosis, deformación de folíolos y achaparramiento y 6) deformación foliar, clorosis y achaparramiento severos.

### **1.2.6. Producción de biomasa fresca**

A los 20 ddi se cortaron desde su base diez plantas tomadas al azar de cada tratamiento con unas tijeras de podar y se pesaron de manera individual en una balanza granataria Ohaus TP200<sup>®</sup>. Estas plantas fueron utilizadas posteriormente para el análisis nutrimental.

### **1.2.7. Concentración viral**

A los 15 ddi se realizó la prueba DAS-ELISA para conocer la concentración relativa del CMV en las plantas de cada uno de los tratamientos evaluados, excepto en las plantas testigo (no inoculadas). En este caso se tomaron dos hojas jóvenes del tercio superior de seis plantas tomadas al azar por tratamiento y se utilizó antisuero, conjugado, positivo y negativo de CMV adquirido en AGDIA, siguiendo el protocolo de Clark y Adams modificado por Sutula *et al.*, (1986). Las lecturas de absorbancia

se realizaron a 405 nm en un lector de ELISA Ophys Microplater Reader<sup>®</sup>, los valores mayores a 0.1 se consideraron positivos.

#### **1.2.8. Extracción de terpenoides totales**

A los 20 ddi, las diez plantas restantes de cada tratamiento se cortaron a nivel del suelo con unas tijeras de podar y se colocaron en bolsas de plástico debidamente identificadas. En todos los casos, el peso del tejido foliar se ajustó a 135.9 g, para hacer una comparación más precisa del contenido de terpenoides totales en las plantas de cada uno de los tratamientos. El tejido se cortó finamente con un cuchillo y se colocó en un frasco de vidrio de 2.5 L de capacidad, se agregó alcohol metílico hasta cubrir completamente el material vegetal. El alcohol se cambió cada tres días (cuatro veces por muestra) y los pequeños restos de material vegetal que se quedaron en el alcohol metílico se eliminaron haciéndolo pasar por un papel filtro y en cada ocasión se colectó el alcohol en frascos de vidrio color ámbar, etiquetados con el nombre del tratamiento, fecha y el número de cambio. Posteriormente, el extracto colectado se pasó por un rotovapor (Buchi<sup>®</sup>) a 60°C hasta obtener dos residuos (líquido y sólido). El residuo acuoso se extrajo en embudo de separación que contenía 30 mL de éter etílico para obtener un extracto denominado etéreo; el material que quedó adherido al matraz se desprendió con éter etílico llamado extracto de éter etílico. Ambos extractos se dejaron secar y se pesaron por separado (Afifi *et al.*, 1999).

#### **1.2.9. Cromatografía**

Se pesaron 20 mg del extracto etéreo y se diluyeron en 2 mL de éter etílico para realizar cromatografía en capa fina. La placa (60 F<sub>254</sub> de 20 X20, Merck<sup>®</sup>) se desarrolló en tolueno-acetato de etilo (3:1). Transcurrida la coloración desarrollada en placa y que se evaporó el exceso de disolvente, se asperjó vainillina-ácido fosfórico al 50% (0.2 g de vainillina + 12 mL de H<sub>2</sub>PO<sub>5</sub> al 50% + 8 mL de agua destilada) como revelador cromogénico en toda la placa. La observación de las

bandas se hizo con luz UV y luz blanca. La identificación de los metabolitos se realizó comparando su valor de retención (rf) en la placa de cromatografía.

#### **1.2.10. Análisis nutrimental**

Se tuvieron aproximadamente 151g de tejido vegetal fresco de cada uno de los tratamientos, el cual se lavó y se secó a temperatura ambiente para determinar el contenido de nitrógeno por el método de digestado con mezcla diácida y determinado por arrastre de vapor, fósforo por fotolorimetría y reducción con molibdo-vanadato, potasio por espectrofotometría de emisión de flama, calcio, magnesio, fierro, cobre, zinc y manganeso por espectrofotometría de absorción atómica y boro por fotolorimetría con azometina-H.

#### **1.2.11. Análisis de datos**

Los datos de severidad (previa transformación arcsen), peso de biomasa fresca y absorbancia, se sometieron a un análisis de varianza y posterior separación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) ( $\alpha=0.05$ ). Con las medias de las variables indicadas anteriormente, los contenidos de cucurbitacinas en extracto de éter y los micronutrientes se realizó un análisis de correlación para determinar si existía alguna asociación entre ellas. En todos los casos se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

### **1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **1.3.1. Severidad**

El tratamiento con mayor severidad fue el de aminoácidos (AA), el resto de los tratamientos fueron estadísticamente similares al testigo positivo, excepto el testigo negativo que tuvo un valor de cero (Figura 1A). En un trabajo hecho con plantas de

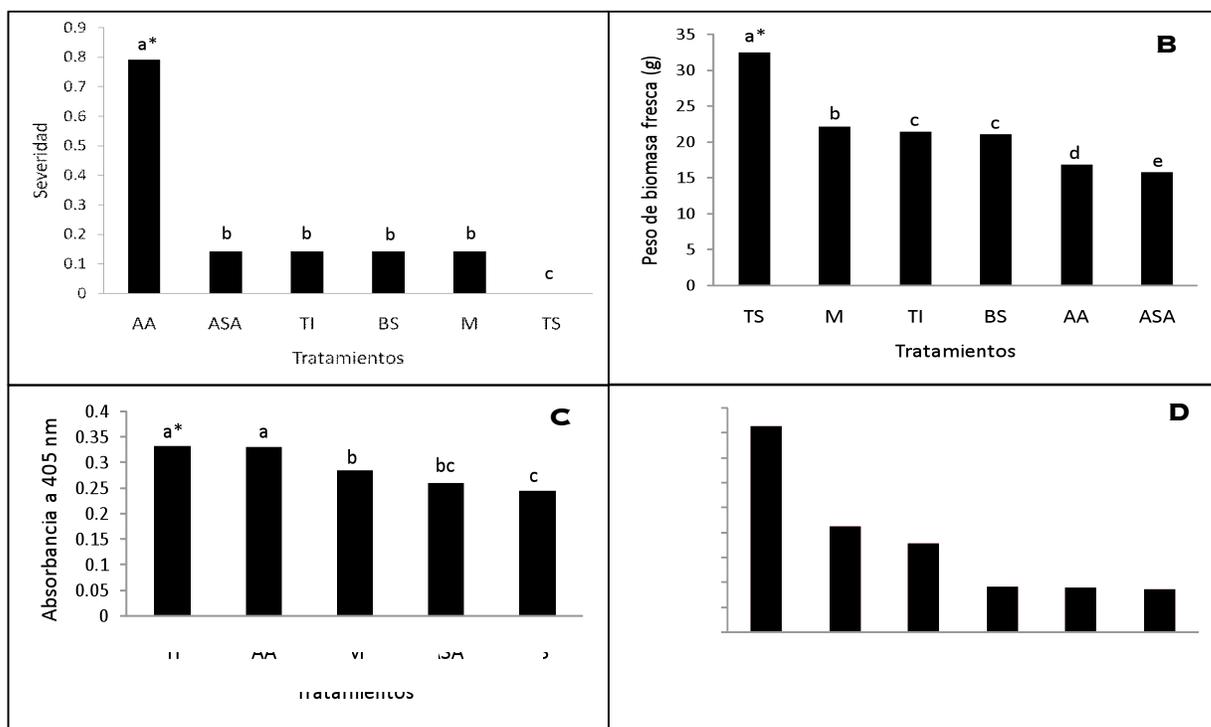
jitomate inoculadas con CMV a las cuales se les aplicó aminoácidos dos días después de la inoculación (al igual que en el presente estudio) se detectó al virus en la parte apical de las plantas a partir de la hoja inoculada, mientras que en las plantas tratadas con aminoácidos ocho días antes de la inoculación, el virus se detectó sólo en la hoja inoculada (Santiago, 2007). Lo anterior sugiere que la aplicación de aminoácidos dos días después de la inoculación no restringió al virus al sitio de inoculación y que éste pudo moverse a la parte apical donde se encuentran las hojas más jóvenes lo cual pudo estar asociado a la mayor severidad observada en este tratamiento.

### **1.3.2. Producción de biomasa fresca**

El mayor peso de biomasa fresca se registró en el tratamiento testigo no inoculado (TS) seguido del tratamiento con miel (M), mientras que el menor valor se tuvo en el tratamiento con ácido acetil salicílico (ASA) (Figura 1B). Se sabe que la miel contiene nutrimentos, carbohidratos y aminoácidos, además de algunas hormonas (Crane, 1985) que pudieran explicar este resultado. Los tratamientos testigo inoculado (TI) y con *Bacillus subtilis* (BS) fueron estadísticamente similares pero menores que TS y mayores que el tratamiento con aminoácidos (AA) (Figura 1B). Es conocido que numerosos aislamientos de especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* expresan actividades supresoras en diversas enfermedades de las plantas además de promover su crecimiento (McSpadden, 2004). Sin embargo, estos resultados difieren de lo reportado por Maldonado *et al.* (2008), quienes encontraron que el mayor peso de biomasa fresca de plantas de calabacita inoculadas con CMV se tuvo en los tratamientos con *Bacillus subtilis* y ácido acetil salicílico, y el menor peso en el testigo inoculado. Estas diferencias pueden atribuirse principalmente al hecho de que en el presente estudio la aplicación de BS y ASA se realizó un día antes de la inoculación de las plantas con el CMV, y el BS se aplicó una vez al trasplante en raíz, mientras que en el caso de Maldonado *et al.* (2008), la aplicación de BS se inició al momento de la siembra y la del ASA a la emergencia de las plántulas, esto es, antes de la inoculación con el virus.

### 1.3.3. Concentración viral

No se observó diferencia estadística en la concentración viral (valores de absorbancia) entre el testigo positivo y el tratamiento con aminoácidos, los cuales tuvieron los valores más altos con respecto al resto de los tratamientos (Figura 1C). Los valores de absorbancia de los tratamientos miel (M) y ácido acetil salicílico (ASA) fueron estadísticamente similares al igual que el de este último con *Bacillus subtilis* (BS) (Figura 1C). Lo anterior es congruente con lo reportado por Maldonado *et al.* (2008) en calabacita infectada con CMV y tratada con BS o ASA y por Ramírez *et al.* (2006) en el caso de jitomate infectado con TSWV tratado con miel, donde los valores de absorbancia de las plantas tratadas con estos productos fueron estadísticamente menores que el testigo.



**FIGURA 5. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE AMINOÁCIDOS (AA), ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO (ASA), MIEL (M) Y BACILLUS SUBTILIS (BS), EN LA A) SEVERIDAD DE LA VIROSIS, B) PESO DE BIOMASA**

FRESCA, C) CONCENTRACIÓN DE VIRUS (ABSORBANCIA) Y D) CONTENIDO TOTAL DE TERPENOIDES EN EXTRACTO DE ÉTER EN PLANTAS DE CALABACITA INOCULADAS CON EL *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* EN INVERNADERO. TI, TESTIGO INOCULADO; TS, TESTIGO NO INOCULADO.

\*MEDIAS CON LA MISMA LETRA SON ESTADÍSTICAMENTE SIMILARES, DMS  $P \leq 0.05$

#### 1.3.4. Contenido de terpenoides totales

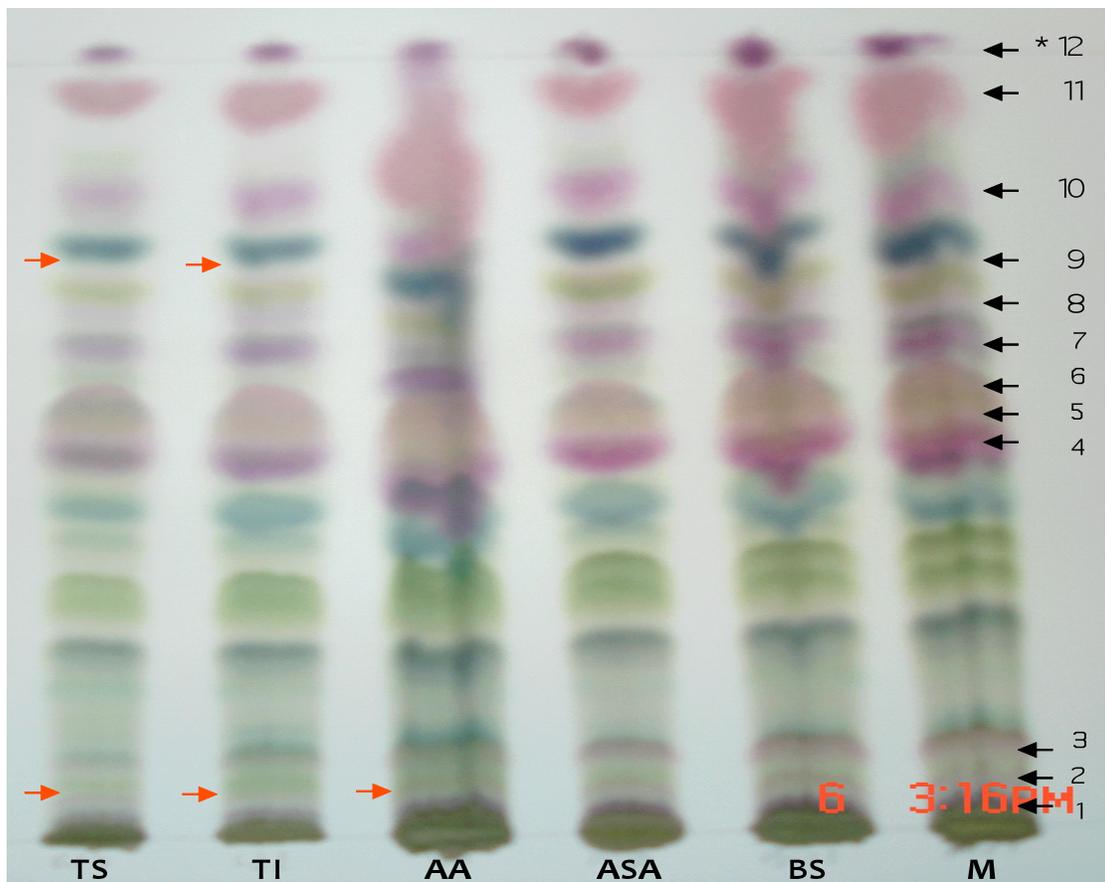
El contenido total de terpenoides totales obtenidos del extracto de éter fue mayor en el tratamiento con miel (M) y menor en los tratamientos no inoculado (TS), inoculado (TI) y con aminoácidos (AA) (Figura 1D). Los tratamientos con ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* tuvieron un contenido similar de compuestos, mismo que fue menor que el del tratamiento M pero mayor que el resto de los tratamientos (Figura 1D).

#### 1.3.5. Número de terpenoides

Los tratamientos con ácido acetil salicílico (ASA), *Bacillus subtilis* (BS) y miel (M) mostraron 12 compuestos (teñidas de color violáceo o rosado), una más que el tratamiento con aminoácidos (AA) y dos más que en los tratamientos testigo no inoculado (TS) y testigo inoculado (TI), los cuales tuvieron 11 y 10 compuestos, respectivamente (Figura 2).

Estos resultados son congruentes con el contenido de terpenoides totales obtenidos del extracto de éter mencionados previamente ya que los tres tratamientos con el menor contenido de éstos (AA, TS y TI) son precisamente los que tuvieron uno o dos compuestos menos; en el caso del tratamiento AA no se observó el compuesto 2, mientras que en TS y TI no se pudieron apreciar los compuestos 2 y 9 (Figura 2). En estudios realizados en plantas de dos cultivares de pepino (uno con alto y otro con bajo nivel de cucurbitacinas que son terpenoides altamente oxigenados), a las cuales se les trató con *Bacillus* spp. antes de ser expuestas a la alimentación por escarabajos, se determinó que al final del experimento ambos cultivares contenían niveles significativamente más bajos de cucurbitacinas totales que las plantas no tratadas con dicha bacteria (Zehnder *et al.*, 1997). Estos resultados son contrarios a los obtenidos en el presente estudio donde las plantas tratadas con *Bacillus subtilis*

incrementaron su contenido de terpenoides. Esto puede deberse a que las rutas metabólicas para la síntesis de cucurbitacinas, terpenoides y otros compuestos de defensa de las plantas que comparten precursores similares, pueden inhibirse o incrementarse con la adición de rizobacterias promotoras del crecimiento (Balliano *et al.*, 1982).



**FIGURA 6.** CROMATOPLACA EN CAPA FINA SISTEMA TOLUENO: ACETATO DE ETILO (3:1) Y REVELADOR VAINILLINA/ÁCIDO FOSFÓRICO AL 50%, QUE MUESTRA EL NÚMERO DE COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EXTRACTOS DE ÉTER EN PLANTAS DE CALABACITA SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS: TS, TESTIGO SIN INOCULAR; TI, TESTIGO INOCULADO; AA, AMINOÁCIDOS; ASA, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO; BS, *BACILLUS SUBTILIS* Y M, MIEL.

\* NÚMERO DE COMPUESTO INDICADO CON FLECHAS NEGRAS; LAS FLECHAS ROJAS MARCAN LOS COMPUESTOS NO DETECTADOS EN ESOS TRATAMIENTOS.

### 1.3.6 Análisis nutrimental

Los porcentajes de N, P, K, Ca y Mg fueron muy similares en las plantas de los diferentes tratamientos ya que las diferencias entre el nivel más alto y el más bajo para cada uno de ellos fue menor del 1% (0.61, 0.04, 0.13, 0.82 y 0.04 %, respectivamente) (Cuadro 1). Por el contrario, diferencias de 9.08 a 52.31 mg·Kg<sup>-1</sup> se observaron en el caso del Fe, Cu, Zn y Mn (52.31, 9.08, 12.86 y 19.38 mg·Kg<sup>-1</sup>, respectivamente), los tratamientos M y BS presentaron valores iguales de nutrimentos (Cuadro 1).

TRATAMIENT o <sup>*</sup>	NUTRIMENTOS								
	N	P	K	CA	MG	FE	CU	ZN	MN
	%					MG KG <sup>-1</sup>			
<b>TS</b>	3.8	0.53	0.56	4.96	1.0	49.7	15.10	58.54	52.23
	6				6	1			
<b>TI</b>	3.8	0.57	0.49	5.12	1.1	44.3	6.02	55.74	40.74
	6				0	2			
<b>M</b>	3.4	0.55	0.51	5.56	1.0	94.0	10.76	65.06	60.12
	5				6	2			
<b>BS</b>	3.4	0.55	0.51	5.56	1.0	94.0	10.76	65.06	60.12
	5				6	2			
<b>ASA</b>	4.0	0.53	0.43	5.30	1.0	96.6	9.98	60.78	54.69
	6				7	3			
<b>AA</b>	4.0	0.57	0.44	5.78	1.0	52.5	9.56	52.2	48.93
	6				8	3			

**CUADRO 1.** CONTENIDO DE NITRÓGENO (N), FÓSFORO (P), POTASIO (K), CALCIO (CA), MAGNESIO (MG), FIERRO (FE), COBRE (CU), ZINC (ZN) Y MANGANESO (MN) EN TEJIDO FOLIAR DE PLANTAS DE CALABACITA INOCULADAS CON *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* Y SOMETIDAS A SEIS TRATAMIENTOS.

\* TS, TESTIGO SIN INOCULAR; TI, TESTIGO INOCULADO; M, MIEL; BS, *BACILLUS SUBTILIS*; ASA, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y AA, AMINOÁCIDOS.

Si se consideran como base las concentraciones de Fe, Cu, Zn y Mn del testigo no inoculado (TS), se observa una disminución de todas ellas en el testigo inoculado (TI), sobre todo en el caso del Cu y el Mn con una reducción de 9.08 y 11.49 mg·Kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 1). Por otro lado, el contenido de Fe, Zn y Mn aumentó en los tratamientos M, BS y ASA con respecto al testigo sano, en el Fe

particularmente se registraron incrementos de 44.31, 44.31 y 46.92 mg·Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. En el caso del Cu, los valores obtenidos en estos tres tratamientos fueron menores en 4.34 a 5.12 mg·Kg<sup>-1</sup> con relación al testigo no inoculado. Los contenidos de Cu, Zn y Mn fueron menores en el tratamiento AA con respecto al TS, principalmente el Cu y el Mn (5.54 y 3.3 mg·Kg<sup>-1</sup>, respectivamente) mientras que se tuvo un incremento de 2.82 mg·Kg<sup>-1</sup> en el contenido de Fe (Cuadro 1).

A pesar de que en diversos estudios se menciona que altos contenidos de nitrógeno amoniacal, fósforo y potasio pueden incrementar la severidad de virus como el *Potato virus Y* o *Cucumber mosaic virus* (Huber y Watson, 1974; Huber, 1980; Huber y Arny, 1985), en el presente estudio dichos elementos no parecen tener una influencia en esta variable debido a que sus contenidos fueron muy similares en todos los casos.

Las plantas de calabacita tratadas con miel (M), ácido acetil salicílico (ASA) y *Bacillus subtilis* (BS) tuvieron la menor concentración de CMV misma que pudo estar asociada al mayor número de terpenoides totales y los más altos contenidos de Fe, Zn y Mn registrados en estos tratamientos (Figura 1D, Figura 2, Cuadro 1). En este último caso, en un trabajo realizado con dos variedades de jitomate, una susceptible y otra resistente al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), se encontró un mayor contenido de Fe, Zn y Mn en la variedad resistente en comparación con la susceptible, y de éstos, el Fe fue el más relacionado con la resistencia a TSWV (Quintero, 2002). Por su parte, Huber (1980) menciona que plantas de tomate, tabaco y frijol inoculadas con el *Tobacco mosaic virus* presentaron una disminución de la enfermedad al fertilizarlas con Fe. Este último elemento está presente en varias enzimas oxidantes como la catalasa y la peroxidasa, mientras que en el caso del Cu se le atribuyen funciones catalíticas como parte de las enzimas polifenol oxidasa y la ácido ascórbico oxidasa, todas ellas relacionadas con la defensa de las plantas (Bidwell, 1979).

Por otro lado, se observó una correlación negativa significativa entre el peso de biomasa fresca (PBF) con la concentración de terpenos, positiva entre Zn y PBF así como entre Fe y Cu. En el caso del Mn y PBF se encontró una correlación positiva altamente significativa.

#### **1.4. CONCLUSIONES**

1. La aplicación de aminoácidos en plantas de calabacita, incrementó la severidad y concentración de CMV y disminuyó la producción de biomasa fresca al igual que el ácido acetil salicílico.

2. Los contenidos de N, P, K y Ca fueron similares en todos los tratamientos.

3. En plantas inoculadas con CMV y tratadas con miel, *Bacillus subtilis* o ácido acetil salicílico se encontró una disminución en la concentración del virus y un incremento de los niveles de Fe, Cu, Zn y Mn.

4. En las plantas tratadas con miel, *Bacillus subtilis* y ácido acetil salicílico se detectaron 12 terpenoides, en el tratamiento con aminoácidos 11 y en las plantas inoculadas y no inoculadas 10.

5. Las plantas tratadas con miel tuvieron el mayor contenido total de cucurbitacinas.

#### **1.5. LITERATURA CITADA**

AFIFI, M. S.; ROSS, S. A.; SOLY, M. A.; NAEEM, Z. E. AND HALAAWELSH, F. T. 1999. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum*. Journal of Chemical Ecology. 25:847-859.

- BALLIANO, G.; CAPUTO, O.; VIOLA, F.; DELPRINO, L. AND CATTEL, L. 1982. The transformation of 10 $\alpha$ -cucurbita-5,24-dien-3 $\beta$ -ol into cucurbitacin C by seedlings of *Cucumis sativus*. *Biochemistry*. 22: 909-913.
- BIDWELL, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal, Traducido al español por CANO y CANO, G. G; ROJAS GARCIDUEÑAS, M. AGT Editor, S.A. D.F. México. 784 p.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H. Y PITRAT, M. 1996. Enfermedades de las cucurbitáceas, Ed. Mundi-Prensa, España. 301 p.
- CRANE, E. 1985. El libro de la miel. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 384 p.
- COQUOZ, J. L.; BUCHAL, A. J.; MCUWLY, P. H. AND METRAUX, J. P. 1995. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*. 85:1219-1224.
- CHAMBLISS, O. AND JONES, C. M. 1966. Cucurbitacins: specific insect attractants in *Cucurbitaceae*. *Science* 153: 1392-1393.
- FERGUSON, J. E.; METCALF, E. R.; METCALF, R. L. AND RHODES, A. M. 1983. Influence of cucurbitacin content in cotyledons of cucurbitaceae cultivars upon feeding behavior of *Diabroticina* beetles. *Journal of Economical Entomology*. 76:47-50.
- GOZZO, F. 2003 Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4487–4503.
- HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K. AND KOGANEZAWA, H. 2005. Plant virus disease control. 2nd. ed. APS PRESS, U. S. A. 684 p.
- HUBER, D. M. 1980. The role of mineral nutrition in defense, In *Plant disease, an advanced treatise*. Vol. 5. How plants defend themselves. Ed. HORSFALL, J.G. AND COWLING, E. B. Academic Press. New York. pp. 381-406.
- HUBER, D. M. AND WATSON, R.D. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 12:139-165.
- HUBER, D. M., AND ARNY, D. C. 1985. Interactions of potassium with plant disease. In: RD. Monson (ed.) *Potassium in agriculture*. Madison. Wisconsin. USA. pp 467-488.
- MALDONADO-CRUZ, E.; OCHOA-MARTÍNEZ, D. L.; TLAPAL-BOLAÑOS, B. 2008. Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por

*Cucumber mosaic virus* en calabacita. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 14:55-60.

MARTÍNEZ, M. E. E.; GUERRA, H. J.; MONTILLA, G. J. L. AND MOLINA, M. 1993. Physicochemical analysis of spanish comercial eucalyptus honeys. Journal Apiculture Research. 32:121-126.

McKEE, T. AND MACKEE, J. R., 2003. Biochemistry, the molecular basis of life. 3rd. ed. McGraw-Hill Co. Inc. New York, NY. 771 p.

McSPADDEN, G. B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Phytopathology. 94:1252-1258.

QUINTERO, B. J. A. 2002, Resistencia de *Lycopersicon esculentum* Mill. al virus marchitez manchada del tomate (TSWV), Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 119 p.

RAMÍREZ-FLOREZ, J.; OCHOA-MARTÍNEZ, D. L.; RODRÍGUEZ-MENDOZA, M. N. Y MORA-AGUILERA, G. 2006. Efecto de ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. Revista Chapingo, Serie Horticultura. 12:239-243.

SANTIAGO, S. E. 2007. Efecto de aminoácidos y hormonas vegetales en la distribución y concentración del *Cucumber mosaic virus*, y su efectividad biológica en la incidencia y severidad de virosis en jitomate. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 104 p.

SAS (Statistical Analysis System) Institute. 1999. SAS (STAT User's guide) Ver. 8.1 SAS Institute. Cary, NC.

SIKORA, E. J.; GUDAUSKAS, R.T.; MURPHY, J. F.; PORCH, D. W.; IFAHANANA, A. M.; ZEHNDER, G. W.; BAUSKE, E. M.; KEMBLE, J.M. AND LESTER, D.F. 1998. A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama. Plant Disease. 82: 117-120.

SMITH, A. C. AND WOOD, J. E. 1991. Molecular and cell biochemistry. Molecular biology and biotechnology. Ed. Chapman and Hall. London. 247 p.

STICHER, L. B.; MAUCH-MANI AND ME' TRAU, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology. 35:235-270.

SUTULA, CH. L.; GILLET, J. M.; MORRISSEY, S. M. AND RAMSDELL, D. C. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Disease. 70:722-726.

- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. AND PIETERSE, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.
- VELASCO, V., V. A. 1999. Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas. *Terra*. 17:193-200.
- VILLEGAS, T. O. G.; RODRÍGUEZ, M. N.; TREJO, T. L. Y ALCANZAR, G. G.; 2001, Potencial de la miel de abeja en la nutrición de plántulas de tomate. *Terra*. 19:97-102.
- ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; TUZUN, S.; YAO, C.; WEI G.; CHAMBLISS, O. AND SHELBY, R. 1997. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria induced plant resistance. *Entomology Experimental Et Applicata*. 83: 81-85.

## **CAPÍTULO 2. EFECTO DE TERPENOIDES EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Cucumber mosaic virus* (CMV) EN CALABACITA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ESTOS COMPUESTOS EN UN MATERIAL TOLERANTE Y UNO SUSCEPTIBLE A CMV**

### **RESUMEN**

Se evaluaron tres cantidades de dos extractos totales de terpenoides (Tr), uno obtenido de plantas de calabacita Grey zucchini inoculadas (PI) con *Cucumber mosaic virus* (CMV) y otro de plantas no inoculadas (PNI), se pesaron 0.5, 0.2 y 0.05 g de cada uno, se mezclaron con savia obtenida de un macerado de tejido foliar de plantas de tabaco infectadas con CMV (1:1, vol/vol) y se frotaron sobre plantas de calabacita sanas. Los tratamientos aplicados fueron: a) Testigo negativo (sin inocular, TS), b) Testigo positivo (inoculado sólo con CMV, TI), c) terpenoides de planta no inoculada (TrPNI) 0.5g, d) terpenoides de planta inoculada (TrPI) 0.5g, e) TrPNI 0.2g, f) TrPI 0.2g, g) TrPNI 0.05g y h) TrPI 0.05g. y se inocularon a los 11 dds. Se evaluó la severidad, concentración de CMV (absorbancia a 405nm) y peso de biomasa fresca. En otro ensayo se comparó en plantas inoculadas (I) y no inoculadas (S), el contenido total de terpenos en plantas susceptibles (Grey zucchini, GZ) y tolerantes (Terminator<sup>®</sup>, TR) a CMV; además se evaluaron las variables antes indicadas. La mayor severidad se tuvo en los tratamientos TrPNI 0.2g, TrPI 0.05g, TrPI 0.2g, TrPNI 0.5g y TrPI 0.5g misma que fue en promedio 15.2% superior comparada con la que se registró en los tratamientos TI y TrPNI 0.05g. El mayor

peso de biomasa fresca se obtuvo en los tratamientos TrPI 0.5g, TrPNI 0.2g, TrPI 0.2g y TrPNI 0.5g el cual fue superior en 53.1% a TI que tuvo el menor peso. Los valores más altos de absorbancia se registraron en los tratamientos TrPNI 0.5g, TrPI 0.2g y TI mismos que fueron 12 % mayores a los que se tuvieron en los tratamientos TrPI 0.5g, TrPNI 0.2g, TrPI 0.05g y TrPNI 0.05g. No se encontró asociación entre la concentración del virus con la severidad y peso de biomasa fresca. En el otro ensayo se encontraron 11 terpenoides en plantas de calabacita Grey zucchini y del híbrido Terminator<sup>®</sup>. La severidad y concentración del virus en GZI fue 39.4 y 86.58% mayor a la de TRI, respectivamente, mientras que el valor más alto de peso de biomasa fresca se obtuvo en TRS mismo que fue superior en 28.2, 17.8 y 7.2 g a los registrados en TRI, GZS y GZI, respectivamente.

**Palabras clave:** *Cucurbita pepo*, terpenoides, concentración viral, *Cucumber mosaic virus*.

## ABSTRACT

Three different amounts of two total extracts of terpenoids (Tr) obtained from zucchini plants inoculated (IP) and no inoculated (NIP) with *Cucumber mosaic virus* (CMV) were evaluated. Extracts of IP and NIP (0.5, 0.2 and 0.05 g) were mixed with sap obtained from foliar tissue of tobacco plants inoculated with CMV (1:1, vol/vol) and rubbed on healthy zucchini plants 11 days after seeding. Treatments evaluated were: a) Negative control (no inoculated, NC), b) Positive control (inoculated only with CMV, PC), c) terpenoids from no inoculated plant (TrNIP) 0.5g, d) terpenoids of inoculated plants (TrIP) 0.5g, e) TrNIP 0.2g, f) TrIP 0.2g, g) TrNIP 0.05g and h) TrIP 0.05g. Severity, CMV concentration (absorbance at 405 nm) and fresh plant weight were evaluated. In other assay, total amount of terpenoids, from inoculated (IP) and no inoculated plants (NIP), of susceptible (Grey zucchini, GZ) and tolerant plants (Terminator<sup>®</sup>, TR) to CMV were compared and variables above mentioned were also evaluated. Treatments TrNIP 0.2g, TrIP 0.05g, TrIP 0.2g, TrNIP 0.5g and TrIP 0.5g

were 15.2% higher than those registered in treatments PC and TrNIP 0.05g. Fresh tissue weight registered in treatments TrIP 0.5g, TrNIP 0.2g, TrIP 0.2g and TrNIP 0.5g was 53.1 % higher than NC which had the lowest value. Absorbance in treatments TrPNI 0.5g, TrPI 0.2g and TI were 12 % higher than TrPI 0.5g, TrPNI 0.2g, TrPI 0.05g and TrPNI 0.05g. No association was founded among virus concentration, severity and fresh tissue weight. By the other hand, in the second assay, there were 11 terpenoids in both materials, Grey zucchini and Terminator<sup>®</sup>. Severity and virus concentration in inoculated plants of GZ were 39.4 and 86.58% higher than in inoculated plants of Terminator<sup>®</sup>, respectively, while weight of no inoculated plants of Terminator<sup>®</sup> were higher in 28.2, 17.8 and 7.2 g than those registered in inoculated Terminator<sup>®</sup>, no inoculated Grey zucchini and inoculated Grey zucchini, respectively.

**Additional key words:** *Cucurbita pepo*, terpenoids, virus concentration, *Cucumber mosaic virus*.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales disponen de numerosos recursos para resistir ataques de agentes fitopatógenos. La ocurrencia de una enfermedad se origina porque la planta es incapaz de reconocer a tiempo un patógeno en potencia, o bien, por una falla en las barreras físicas o químicas previamente formadas para prevenir la infección. Cuando la resistencia procede de la activación de una serie de rutas metabólicas, el mecanismo puede ser altamente específico, involucrando interacciones del tipo gene por gene, entre los genes de virulencia del patógeno y los genes correspondientes de resistencia en la planta (Van Loon *et al.*, 1998, Vallad y Goodman, 2004).

Las cucurbitacinas son terpenos que forman parte del sistema de defensa de las plantas contra algunos insectos, hongos y plantas parásitas (Harborne, 1988). Se ha demostrado que algunas cucurbitacinas contienen compuestos anti-alimentarios

contra insectos (Bar-Nun y Mayer, 1988) y en algunas ocasiones han sido utilizadas, en combinación con kairomonas e insecticidas, para el manejo de ciertas especies de diabroticas (Metcalf *et al.*, 1980).

Existen varios híbridos de calabacita como Huracán<sup>®</sup>, Tala<sup>®</sup>, Clarita<sup>®</sup> y Terminator<sup>®</sup> que se reportan como tolerantes a diferentes virus entre los que se encuentran el *Papaya ringspot virus* (virus de la mancha anular del papayo), *Watermelon mosaic virus* (virus mosaico de la sandía) y *Zucchini yellow mosaic virus* (mosaico amarillo del zucchini). A la fecha se desconoce el mecanismo exacto por el cual las plantas muestran tolerancia a virosis, no obstante, algunos autores sugieren que puede estar involucrado un mecanismo de defensa denominado restricción que, entre otras cosas, reduce la replicación y acumulación de los virus en las plantas (Ponz y Bruening, 1986).

Con base en lo anterior, se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- a) Conocer si la adición de diferentes cantidades de terpenos a savia infectiva con *Cucumber mosaic virus* (CMV) disminuyen la transmisión y severidad del virus en plantas de calabacita.
- b) Determinar si existen diferencias en el contenido de terpenos entre la variedad de calabacita Grey zucchini susceptible a CMV y el híbrido Terminator<sup>®</sup> tolerante a este virus.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Establecimiento del almácigo**

Se sembraron semillas de calabacita variedad Grey zucchini en almácigos de unicel de 200 cavidades con peat moss<sup>®</sup> como sustrato colocando una semilla por cavidad. Durante la germinación y emergencia de las plántulas, los almácigos permanecieron

en cámara bioclimática con una temperatura controlada de aproximadamente  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h y 80 % de humedad relativa. Los riegos se realizaron diariamente con agua.

### **2.2.2. Trasplante**

Seis días después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel de un litro de capacidad que contenían una mezcla de tierra negra y tierra de hoja (1:1 v/v). En esta etapa las plantas se mantuvieron en invernadero y se regaron con la fórmula 12-12-17 + 2 Mg, a razón de 1g·litro cada cuatro días.

### **2.2.3. Fuente de inóculo**

Doce plantas de calabacita Grey zucchini sembradas y trasplantadas como se indicó anteriormente fueron inoculadas con tejido foliar de plantas de tabaco infectadas con CMV dos días después del trasplante. Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara de crecimiento para evitar que insectos vectores entraran y las infectaran con otro virus. Estas plantas fueron utilizadas a los 20 días después de la inoculación, previa confirmación de la presencia del virus por DAS-ELISA una semana antes de su uso.

### **2.2.4. Tratamientos**

#### **Experimento 1**

**Aplicación exógena de extractos de terpenoides totales y su efecto en la infección por CMV.** Se pesaron por separado 0.2, 0.5 y 0.05 g dos extractos de terpenoides totales obtenidos de plantas de calabacita Grey zucchini (uno de plantas sanas y otro de plantas infectadas con CMV) y se diluyeron individualmente en 2.5

mL de dimetil sulfóxido al 0.5%. Las diferentes cantidades de terpenoides así preparadas fueron mezcladas posteriormente con 2.5 mL de savia infectiva obtenida de plantas de calabacita infectadas con CMV. Dicha mezcla fue inoculada mecánicamente sobre hojas cotiledonares de plantas de calabacita Grey zucchini, teniéndose los siguientes tratamientos con 10 repeticiones cada uno: a) Testigo negativo (sin inocular, TS), b) Testigo positivo (inoculado sólo con CMV, TI), c) terpenoides de planta no inoculada (TrPNI) 0.5g, d) terpenoides de planta inoculada (TrPI) 0.5g, e) TrPNI 0.2g, f) TrPI 0.2, g) TrPNI 0.05g y h) TrPI 0.05g.

## **Experimento 2**

**Contenido de terpenoides en una variedad susceptible y un híbrido tolerante a virus.** Con el propósito de conocer si hay diferencias en el contenido de terpenoides totales en plantas de calabacita de la variedad susceptible Grey zucchini (GZ) y el híbrido tolerante Terminator® (TR), semillas de ambos materiales fueron puestas a germinar y trasplantadas de la manera y condiciones antes indicadas. En total se tuvieron 40 plantas de cada material, de las cuales 20 fueron inoculadas con CMV y el resto se mantuvieron como testigos negativos sin inocular. Siete días después de la siembra se hizo la inoculación mecánica del virus teniendo como inóculo plantas de calabacita infectadas con este virus mantenidas en cámara de crecimiento para evitar la llegada de insectos vectores y la potencial infección por otros virus. La presencia del CMV se confirmó por DAS-ELISA una semana antes de su uso. Se pesaron 6.5 g de tejido foliar de plantas de calabacita que mostraban mosaico y se molieron en un macerador (Dayton R-4Z522®) agregando 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos + DIECA pH 7.2. La savia infectiva se mantuvo sobre un gel refrigerante hasta su inoculación en las hojas cotiledonares, sobre las que previamente se espolvoreó carborundum 600 mallas para ser frotadas posteriormente con un isopo perfectamente humedecido en la savia infectiva sobre toda la lámina foliar.

### **2.2.5. Variables evaluadas**

En ambos experimentos se evaluaron las siguientes variables:

**Severidad.** Se evaluó utilizando una escala diagramatizada arbitraria con los siguientes valores: 0, hoja sana; 1, enchinamiento en el área foliar; 2, venas cloróticas y enchinamiento; 3, mosaico, deformación de folíolos y achaparramiento; 4, mosaico severo, deformación foliar y achaparramiento; 5, clorosis, deformación de folíolos y achaparramiento; 6, clorosis severa, deformación foliar y achaparramiento severo.

**Peso de biomasa fresca.** Cada una de las plantas de los diferentes tratamientos fueron cortadas desde su base con unas tijeras de podar y trasladadas en bolsas de plástico al laboratorio para pesarlas en una balanza granataria de manera individual.

**Análisis serológico.** Para conocer la concentración relativa del virus en cada uno de los tratamientos de ambos experimentos, se realizó la prueba DAS-ELISA utilizando antisuero, conjugado positivo y negativo para CMV obtenido en AGDIA Inc., siguiendo el protocolo de Clark y Adams modificado por Sutula *et al.*, 1986. Las lecturas de absorbancia a 405 nm se realizaron con el lector Opsys MR Microplater Reader®. A los 44 ddi.

Adicionalmente, sólo en el caso del segundo experimento se determinó lo siguiente:

**Contenido de terpenoides totales.** A los 44 ddi, se pesaron 135.9 g de tejido vegetal de cada uno de los materiales (Grey zucchini y Terminator®) tanto inoculadas como no inoculadas, para extraer los terpenoides totales y hacer una comparación equitativa del contenido de estos compuestos en ambos casos. Posteriormente, las plantas se cortaron finamente con un cuchillo, el tejido se colocó en un frasco de vidrio de 2.5 L de capacidad y se agregó alcohol metílico hasta cubrir completamente el material vegetal. El alcohol se cambió cada tres días (cuatro veces por muestra) y los pequeños restos de tejido vegetal que quedaron en el alcohol se eliminaron haciéndolo pasar por un papel filtro. En cada cambio de alcohol, éste se

colectó en frascos de vidrio color ámbar los cuales estaban etiquetados con el nombre del tratamiento, fecha y el número de cambio. Posteriormente, el extracto colectado se pasó por un rotovapor (Buchi®) a 60°C hasta obtener dos residuos (líquido y sólido). El residuo acuoso se extrajo en un embudo de separación que contenía 30 mL de éter etílico para obtener un extracto denominado etéreo; el material que quedó adherido al matraz se desprendió con éter etílico y se denominó extracto de éter etílico. Ambos extractos se dejaron secar y se pesaron por separado (Afifi *et al.*, 1999).

**Cromatografía.** Para determinar el contenido de terpenoides de cada tratamiento, se pesaron 20 mg del extracto etéreo y se diluyeron en 2 mL de éter etílico para realizar cromatografía en capa fina. La placa (60 F<sub>254</sub> de 20 X20, Merck®) se desarrolló en el sistema tolueno-acetato de etilo (3:1). Transcurrida la coloración desarrollada en placa y una vez que se evaporó el exceso de disolvente, se asperjó vainillina-ácido fosfórico al 50% (0.2 g de vainillina + 12 mL de H<sub>2</sub>PO<sub>5</sub> al 50% + 8 mL de agua destilada) como revelador cromogénico en toda la placa. La observación de las bandas se hizo con luz UV y luz blanca. La identificación de los metabolitos se realizó comparando su valor de retención (rf) en la placa de cromatografía.

### **2.2.6. Análisis de datos**

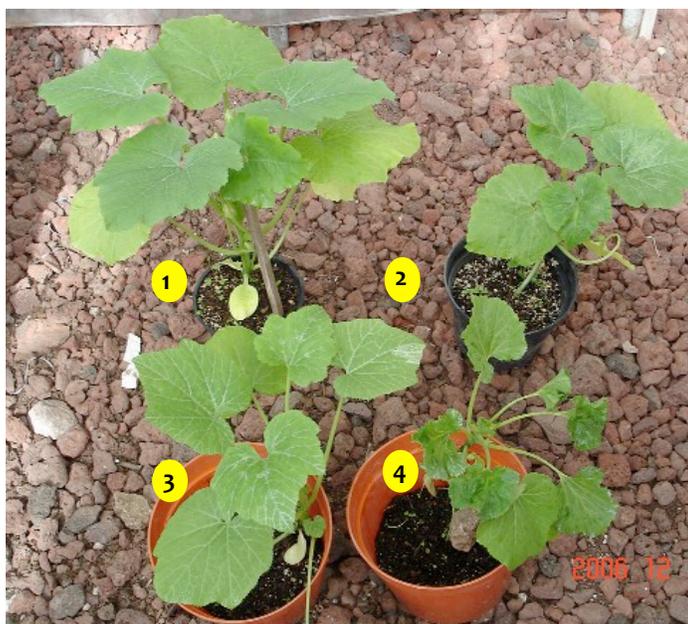
Los datos de severidad, peso de biomasa fresca y absorbancia de ambos experimentos, se sometieron a un análisis de varianza y posterior separación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) ( $\alpha=0.05$ ) utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

## **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1. Severidad**

Se encontraron diferencias significativas, siendo los tratamientos testigo positivo (inoculado solamente con CMV, TI) y 0.05 g de terpenoides obtenidos de plantas no inoculadas (TrPNI0.05g) similares entre sí y menores 15.2 % en promedio del resto de los tratamientos (Figura 2A). Por otro lado, se observó que la adición del extracto de terpenoides incrementó la severidad en la mayoría de los casos. Estos resultados son contrarios a los reportados en un trabajo donde se asperjó un extracto de *Raphanus raphanistrum* a plantas de jitomate para conocer su efecto en la infección ocasionada por el *Chino del tomate virus* (virus “chino” del jitomate, CdTV) donde se observó una reducción de la severidad en las plantas tratadas (Montes *et al.*, 1995). *R. raphanistrum* (rabanillo) es una especie que pertenece a la familia *Cruciferae* caracterizada por su alto contenido de cucurbitacinas (terpenoides) cuyos extractos estuvieron asociados a la menor severidad ocasionada por el CdTV.

En el segundo experimento, las plantas del híbrido Terminator® inoculadas con CMV mostraron 1.5 veces menor severidad comparadas con las plantas de la variedad Grey zucchini, ya que en el primer caso sólo se observó reducción del crecimiento y una ligera clorosis, mientras que en el segundo se tuvo achaparramiento, deformación foliar y mosaico severo (Figura 1).



**FIGURA 7. SEVERIDAD OCASIONADA POR EL *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* EN PLANTAS DE CALABACITA DE LA VARIEDAD SUSCEPTIBLE GREY ZUCCHINI (GZ) Y EL HÍBRIDO TERMINATOR® (TR). 1) PLANTA DE TR SIN INOCULAR, 2) PLANTA DE GZ SIN INOCULAR, 3) PLANTA DE TR INOCULADA Y 4) PLANTA DE GZ INOCULADA.**

Las plantas inoculadas del híbrido Terminator® fueron ligeramente más grandes que las plantas testigo (no inoculadas) de la variedad susceptible Grey Zucchini, además de que en el primer caso los síntomas no fueron muy aparentes a pesar de la presencia del virus, característica típica que corresponde a una planta tolerante a virus de acuerdo con Matthews (1991).

### **2.3.2. Producción de biomasa fresca**

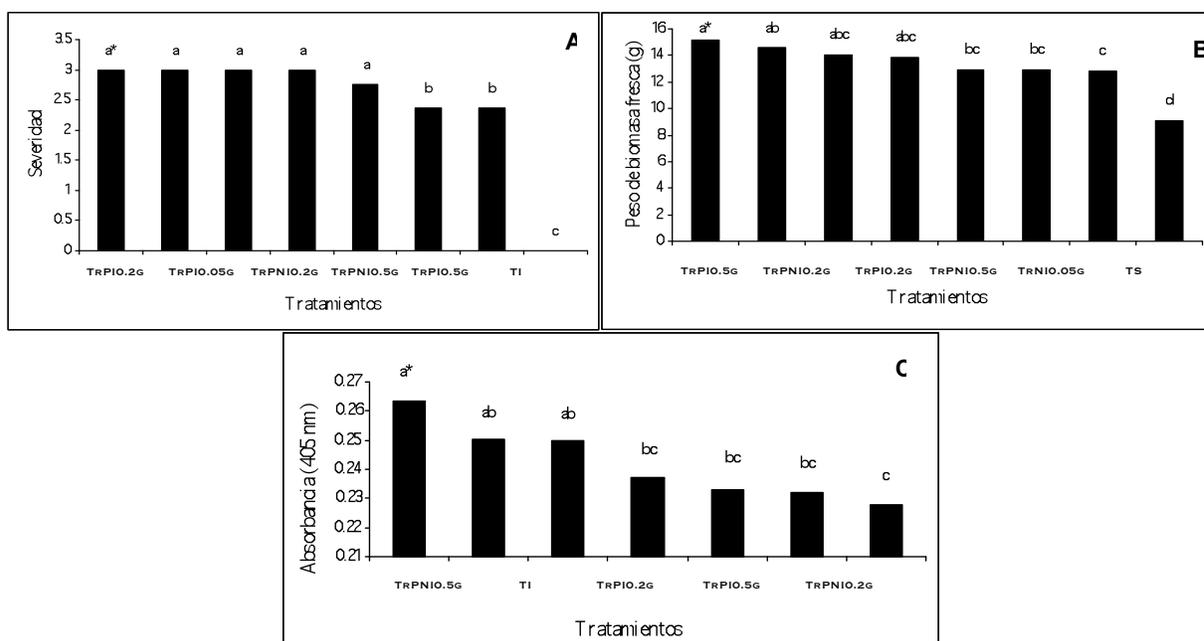
En el experimento 1, el mayor peso de biomasa fresca se registró en el tratamiento TrPI0.5g, mismo que fue 53.1% superior al registrado en el testigo positivo que tuvo el menor valor (Figura 2B). En general, la adición de los extractos de terpenoides incremento el peso de biomasa fresca con respecto del testigo positivo, sin embargo, no se observó alguna relación entre la concentración de éstos o su origen (de planta infectada o no infectada con CMV) con dicho aumento.

En el segundo experimento, se observaron diferencias estadísticas entre el peso de biomasa fresca de las plantas del material susceptible y tolerante, siendo las plantas del híbrido Terminator® sin inocular (TRS) las que tuvieron el mayor valor, el cual fue 33.2% más alto que el registrado en las plantas de la variedad Grey zucchini inoculadas con CMV (GZI) que mostraron el menor peso (Figura 2B). Es importante mencionar que las plantas del híbrido Terminator® inoculadas con CMV tuvieron mayor peso de biomasa fresca que las plantas de la variedad Grey zucchini sin inocular y que las diferencias en tamaño entre estos dos materiales de calabacita se hacen más evidentes conforme aumenta la edad de las plantas.

### **2.3.3. Análisis serológico**

Estadísticamente, en el primer experimento, los mayores valores de absorbancia se tuvieron en los tratamientos TrPNIO.5g, TrPI0.2g y testigo positivo (TI), los cuales fueron 12 % más altos que los obtenidos en los tratamientos TrPI0.5g, TrPNIO.2g, TrPI0.05g y TrPNIO.05g que mostraron los menores valores (Figura 2C). No se observó una relación entre la absorbancia con la severidad y peso de biomasa fresca.

En el segundo experimento, los niveles de absorbancia fueron estadísticamente diferentes. La variedad Grey zucchini inoculada (GZI) registró la mayor concentración misma que fue 86.5% más alta que la del híbrido Terminator® inoculado (TRI) (Figuras 3A, B y C). En este último caso, se observó una relación inversa entre la absorbancia con la severidad y el peso de biomasa fresca.



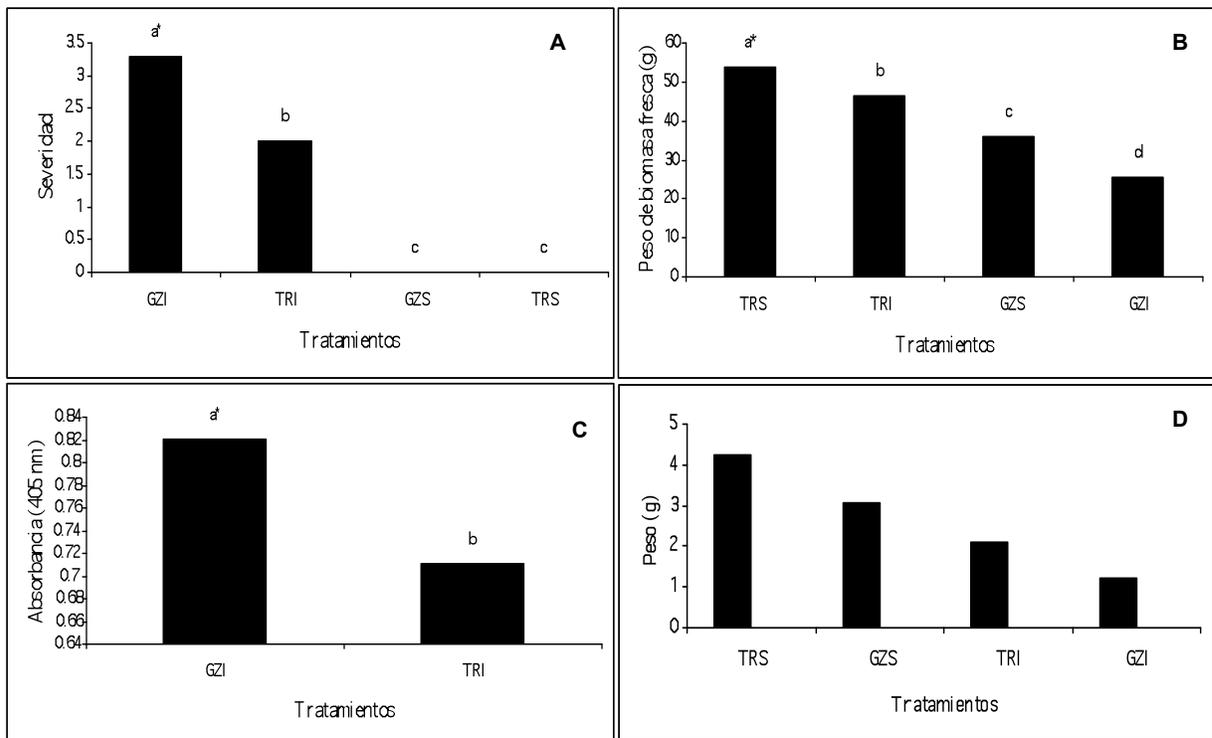
**FIGURA 8.** EFECTO DE EXTRACTOS DE TERPENOIDES (TR) OBTENIDOS DE PLANTAS DE CALABACITA NO INOCULADAS (PNI) Y PLANTAS INOCULADAS (PI) CON CMV A DIFERENTES CONCENTRACIONES (0.05, 0.2 Y 0.5G) MEZCLADOS CON SAVIA INFECTIVA DE ESTE VIRUS. A) SEVERIDAD DE LA VIROSIS, B) PESO DE BIOMASA FRESCA, C) CONCENTRACIÓN DE VIRUS (ABSORBANCIA).

TS: TESTIGO NEGATIVO (SIN INOCULAR), TI: TESTIGO POSITIVO (INOCULADO SÓLO CON CMV), TRPNIO.5G: TERPENOIDES DE PLANTA NO INOCULADA 0.5G, TRPI0.5G: TERPENOIDES DE PLANTA INOCULADA 0.5G, TRPNIO.2G: TERPENOIDES DE PLANTA NO INOCULADA 0.2G, TRPI0.2G: TERPENOIDES DE PLANTA INOCULADA 0.2G, TRPNIO.05G: TERPENOIDES DE PLANTA NO INOCULADA 0.05G Y TRPI0.05G: TERPENOIDES DE PLANTA INOCULADA 0.05G.

\*MEDIAS CON LA MISMA LETRA SON ESTADÍSTICAMENTE SIMILARES, DMS  $\alpha \leq 0.05$

**Contenido de terpenoides totales.** Las plantas del híbrido Terminator® inoculadas con CMV tuvieron mayor peso de terpenoides del extracto étereo y fue tres veces mayor que el de las plantas Grey zucchini inoculadas (GZI) (Figura 3D). Las plantas inoculadas con CMV de TR y GZ tuvieron una menor cantidad de terpenoides totales (50 y 39.73 % respectivamente), comparadas con las plantas no inoculadas, la cual puede asociarse con la infección causada por el virus.

Asimismo, en plantas de calabacita de la variedad susceptible Grey zucchini inoculadas con el virus se observó una relación inversa entre el contenido total de terpenoides con la severidad y absorbancia, y directa en el caso del peso de biomasa fresca (Figuras 3 A, B, C y D).

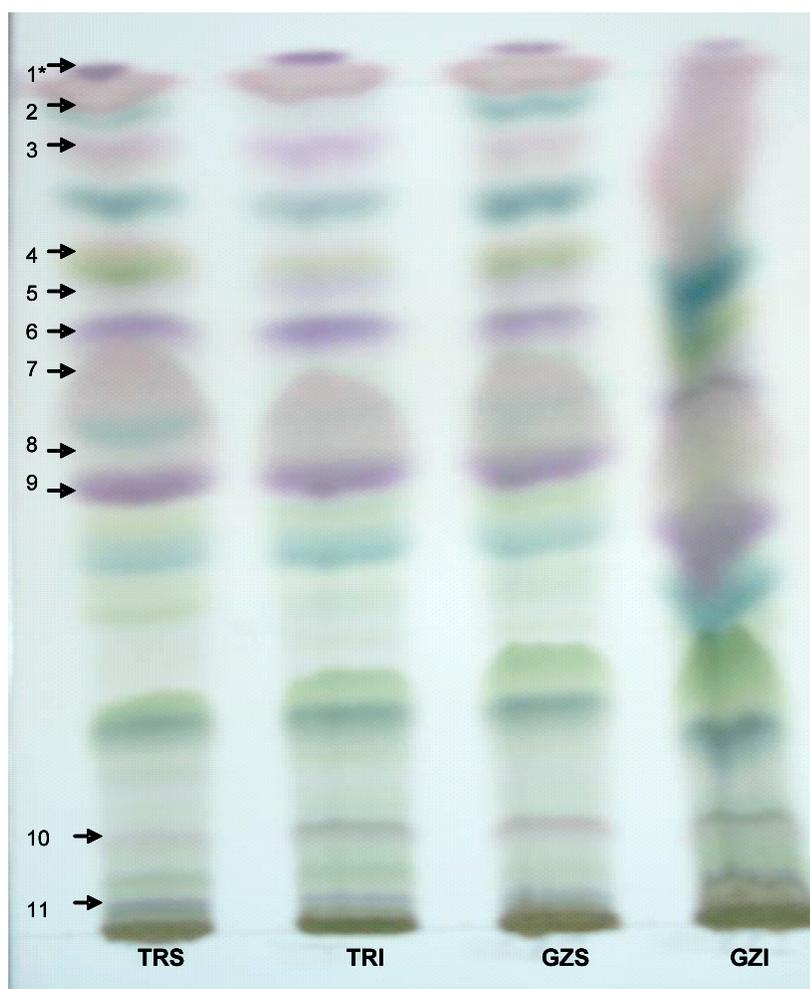


**FIGURA 9.** COMPORTAMIENTO DE LA VARIEDAD DE CALABACITA GREY ZUCCHINI Y EL HÍBRIDO TERMINATOR® INOCULADOS CON EL *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* EN INVERNADERO. A) SEVERIDAD DE LA VIROSIS, B) PESO DE BIOMASA FRESCA, C) CONCENTRACIÓN DE VIRUS (ABSORBANCIA) Y D) CONTENIDO TOTAL DE TERPENOIDES EN EXTRACTO ÉTEREO. TRI: TERMINATOR® INOCULADO; TRS: TERMINATOR® NO INOCULADO; GZI: GREY ZUCCHINI INOCULADO; GZS: GREY ZUCCHINI NO INOCULADO.

\*MEDIAS CON LA MISMA LETRA SON ESTADÍSTICAMENTE SIMILARES, DMS  $\alpha \leq 0.05$ .

**Cromatografía.** En las plantas inoculadas y no inoculadas de ambos materiales de calabacita se observaron 11 diferentes terpenoides (Figura 4). Las plantas de la variedad susceptible a virus Grey zucchini no inoculadas (GZS) tuvieron una mayor concentración de terpenoides comparadas con las plantas del híbrido tolerante Terminator® no inoculadas (TRS).

A pesar de que el número de terpenoides es igual en ambos materiales de calabacita, tanto inoculados como no inoculados, se observa que las concentraciones de algunos de éstos son mayores en las plantas no inoculadas, como es el caso de los terpenoides 5 y 10 del híbrido Terminator®, así como de los terpenoides 1, 5, 6 y 10 de Grey zucchini (Figura 4). En la tolerancia a virus del híbrido Terminator® están involucrados una serie de mecanismos, uno de los cuales pudiera asociarse con una mínima reducción en la concentración de terpenoides comparada con un material susceptible.



**FIGURA 10.** CROMATOPLACA EN CAPA FINA DE EXTRACTO ÉTEREO QUE MUESTRA A LOS TERPENOIDES TOTALES (OBSERVADOS DE COLOR VIOLETA O ROSADO) OBTENIDOS DE PLANTAS DE CALABACITA TOLERANTES (TERMINATOR®) Y SUSCEPTIBLES (GREY ZUCHINNI) INOCULADAS Y NO INOCULADAS CON *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* EN EL SISTEMA TOLUENO: ACETATO DE ETILO 3:1 Y REVELADOR VAINILLINA/ÁCIDO FOSFÓRICO AL 50%. TRS: TERMINATOR® NO INOCULADA, TRI: TERMINATOR® INOCULADA, GZS: GREY ZUCCHINI NO INOCULADA, GZI: GREY ZUCCHINI INOCULADA.  
\*NÚMERO DE TERPENOIDES.

## 2.4. CONCLUSIONES

1. Los extractos de terpenoides totales obtenidos de plantas de calabacita infectadas y no infectadas con el *Cucumber mosaic virus* no disminuyen la severidad ocasionada por este virus en calabacita pero estimulan la producción de biomasa fresca.
2. Plantas tratadas con 0.5 g de extractos totales de terpenoides de calabacita no inoculada, 0.2 g de plantas inoculadas y el testigo positivo tuvieron una concentración del virus 12% mayor a la registrada en el resto de los tratamientos
3. Plantas del híbrido Terminator® no inoculado con *Cucumber mosaic virus* tuvieron 28.2, 17.8 y 7.2 g más de biomasa fresca que las plantas de Terminator® inoculado, Grey zucchini no inoculado y Grey zucchini inoculado, respectivamente.
4. Plantas susceptibles a virus de calabacita Grey zucchini inoculadas con *Cucumber mosaic virus* tuvieron una severidad y concentración viral 39.4 y 86.5% más altas que las registradas en el híbrido tolerante Terminator®.

5. Plantas de calabacita inoculadas y no inoculadas con *Cucumber mosaic virus* del híbrido Terminator® y de la variedad Grey zuchinni tuvieron 11 diferentes terpenoides.
6. Las plantas no inoculadas de ambos materiales de calabacita muestran algunos terpenoides más concentrados en la cromatoplaça con respecto de las plantas inoculadas.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- AFIFI, M. S.; ROSS, S. A.; SOLY, M. A.; NAEEM, Z. E. AND HALAAWELSH, F. T. 1999. Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum*, *Journal of Chemical Ecology*, 25:847-859.
- BAR-NUN, N., AND MAYER A. M. 1988. Cucurbitacins-Repressors of induction of laccase formation. *Phytochemistry*, 28:1369-1371.
- BLANCARD, D.; LECOQ, H. Y PITRAT, M., 1996. Enfermedad de las cucurbitáceas, Ed. Mundi-prensa, España. 301 p.
- CONTI, M.; GALLITELLI, D.; LISA, V., LOVISOLO, G.; MARTELLI, P. G.; RAGOZZINO, A.; LUIGI, R. G. Y VOVLAS, C., 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Ed. Mundi prensa. España. 206 p.
- HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K. AND KOGANEZAWA, H. 2005. Plant virus disease control. 2nd ed. Ed. APS Press, U. S. A. 684 p.
- HARBORNE, J. B., 1988. Phytochemical methods, 2nd ed. Ed. Chapman and Hall, New York, 288 p.
- MATTHEWS, R. E. F. 1991. Plant virology, 3rd ed. Ed. Academic Press. New York. 835 p.
- METCALF, R. L.; METCALF, R. A. AND RHODES, A. M. 1980. Cucurbitacins as kairomones beetles. *Proceedings of the National Academic of Science*. 77: 3769-3772.

- MONTES, B. R., ESPIN, G. S., SOSA, H. A. Y PACHECO, P. R. 1995. Evaluación de extractos vegetales para el control de virosis “Chino del tomate” en dos regiones agroecológicas de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13:111-116.
- PONZ, F. AND BRUENING, G. 1986. Mechanisms of resistance to plant virus. *Annual Review Phytopathology*. 24:355-81.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. 1999. SAS (STAT User’s guide) Ver. 8.1 SAS Institute. Cary, NC.
- SUTIC, D. D., FORD, R. E. AND TOSIC, M. T. 1999. Handbook of plant virus diseases. Ed. CRC Press. New York, NY. 553 p.
- SUTULA, CH. L.; GILLET, J. M.; MORRISEY, S. M. AND RAMSDELL, D. C. 1986. Interpreting ELISA Data and Establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease*. 70:722-726.
- VALLAD, G. E. AND GOODMAN. R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced Systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*. 44:1920–1934.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Y PIETERSE, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

### 1. Conclusiones

1. La producción de biomasa fresca en calabacita se incrementa por la aplicación foliar de miel.
2. La absorbancia de CMV en calabacita disminuye con la aplicación foliar de la miel, ASA y *B. subtilis* además de que incrementan la concentración de terpenoides en la planta.
3. La severidad de CMV se incrementa al aplicar aminoácidos en las plantas de calabacita.
4. La aplicación foliar de terpenoides disminuye la absorbancia de CMV en calabacita.
5. El número de terpenoides se incremento con el crecimiento de la planta de calabacita, dado que tanto las plantas sanas como inoculadas, a los 20 ddi mostraron 10 terpenoides y a los 44 días 11.

6. El híbrido Terminator® es tolerante a CMV, ya que su producción de biomasa fresca, no es afectada por el CMV al causarle una menor severidad y absorbanza, además presenta como característica favorable un mayor peso de terpeno ideas totales, que Grey zucchini.

## 2. Recomendaciones

1. La aplicación de ASA y *B. subtilis* presentaron buenos resultados al ser aplicados al follaje, sin embargo se deberían de hacer aplicaciones a la raíz de las plantas donde posiblemente pudieran dar resultados más contundentes.
2. Sería conveniente evaluar la concentración de terpenoides totales en las diferentes etapas del desarrollo de las plantas de calabacita y el efecto del CMV en cada una de ellas.
3. Además de observar cualitativamente los terpenoides y clorofilas presentes en la cromatografía sería conveniente determinar cuales son estos compuestos.
4. Se podría evaluar el extracto de terpenoides, asperjandolo a las plantas de calabacita, a una baja concentración (0.05g) contra el CMV.
5. La evaluación de los diferentes tratamientos, deben ser llevados a campo para determinar su efecto en el rendimiento y calidad de frutos.

## APÉNDICE 1

### ESCALA DIAGRAMATIZADA ARBITRARIA DE SEVERIDAD DE VIROSIS EN CALABACITA

Valor	Daño observable	Descripción
0		Hoja asintomática
1		Enchinamiento del área foliar.
2		Venas cloróticas y enchinamiento.
3		Mosaico y deformación de folíolos y achaparramiento.

4		Mosaico severo, deformación foliar y achaparramiento.
5		Clorosis, deformación de folíolos y achaparramiento.
6		Clorosis severa, deformación foliar, achaparramiento severo.