

**DETECCION POR PCR DE *Begomovirus* Y *Liberibacter solanacearum* EN TOMATE E INSECTOS VECTORES, EN LA COMARCA LAGUNERA**

Omar G. Alvarado-Gómez<sup>1</sup> Verónica Ávila-Rodríguez<sup>2</sup>, Urbano Nava-Camberos<sup>3</sup> y Florencio Jiménez Díaz<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Carr. Laredo Km. 3, General Escobedo, N. L. México. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Biológicas-UJED, Gómez Palacio, Dgo. vavilar@gmail.com. <sup>3</sup>Facultad de Agricultura y Zootecnia (FAZ), UJED, Ej. Venecia, Durango. nava\_cu@hotmail.com.

**RESUMEN:** El presente estudio se realizó durante el 2013 en la Comarca Lagunera, con el objetivo de detectar *Begomovirus* y *Liberibacter solanacearum* mediante la técnica de PCR punto final en muestras de tomate y de los insectos vectores mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Genn., biotipo B y paratrioza (*Bactericera cockerelli* Sulc). Se colectaron 16 muestras (ocho muestras por híbrido) de tejido vegetal de los híbridos Sahel y TOP 1182 de lotes de tomate trasplantados en primavera (25 de marzo del 2013) y verano (19 de agosto del 2013). También se colectaron nueve muestras compuestas de adultos de mosquitas blancas (50 a 100 insectos por muestra) y paratriozas (10 a 100 insectos por muestra) en los mismos lotes de tomate. Se extrajo el ADN de las muestras de tomate e insectos, posteriormente se amplificó mediante PCR punto final con primers específicos para *Begomovirus* y *L. solanacearum*. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa y se fotografiaron. Los *Begomovirus* y *L. solanacearum* se detectaron en plantas de tomate con síntomas de rizado amarillo del tomate y permanente del tomate, respectivamente. *Liberibacter solanacearum* fue más frecuente en las plantas de tomate de primavera. Ambos patógenos manifestaron una incidencia alta en tomate de verano. Las mosquitas blancas fueron portadoras de *Begomovirus*, principalmente durante el ciclo de producción de tomate de verano. Las paratriozas fueron portadoras de *L. solanacearum* desde mediados del ciclo de producción de tomate de primavera. Existió una asociación estrecha entre la ocurrencia de los patógenos en los insectos vectores y sus niveles de incidencia en el cultivo de tomate.

Palabras clave: tomate, híbridos, mosquita blanca, paratrioza, begomovirus, *L. solanacearum*.

**ABSTRACT:** In the Comarca Lagunera region a study was carried out during 2013 with the objective of detecting *Begomovirus* y *Liberibacter solanacearum* by final point PCR technique on samples of tomato and the vector insects whiteflies, *Bemisia tabaci* Genn., biotype B and tomato psyllids, *Bactericera cockerelli* Sulc. Sixteen samples of tomato plants, hybrids Sahel and TOP 1182, were collected from tomato plots planted in spring (25 march 2013) and summer (19 august 2013). Also, nine composed samples of whitefly adults (50 to 100 insects per sample) and tomato psyllids (10 a 100 insects per sample) were collected in the same tomato plots. DNA of the tomato and insect samples was extracted, then it was amplified by end-point PCR using specific primers for *Begomovirus* and *L. solanacearum*. DNA amplified products were separated by agarose gel electrophoresis and finally they were photographed. *Begomovirus* and *L. solanacearum* were detected in tomato plants with symptoms of tomato yellows leaf curl virus and “permanente del tomate”, respectively. *Liberibacter solanacearum* was more frequent in tomato planted in spring. Both pathogens had a high incidence in tomato planted in summer. *Begomovirus* were detected in whiteflies collected mainly from tomato planted in summer. *Liberibacter solanacearum* were detected in tomato psyllids collected from the middle of season of tomato planted in spring. There was a close relationship between the presence of those pathogens in vector insects and the incidence grade of those pathogens in tomato.

Key words: tomato, hybrids, silverleaf whitefly, *Begomovirus*, *L. solanacearum*.

**Introducción**

El tomate, *Lycopersicon sculentum* Mill., es un cultivo altamente rentable cuya siembra se ha incrementado en la región, particularmente bajo condiciones de agricultura protegida, tanto en invernaderos como casas sombra. Durante el 2013 se estableció una superficie de 490 ha de tomate bajo condiciones protegidas, con una producción de 64,406 toneladas, un rendimiento promedio de 131.4 ton/ha y un valor de la producción de \$412.1 millones de pesos (El Siglo de Torreón, 2014).

Existe un complejo de insectos vectores de virus afectando severamente la productividad de los cultivos hortícolas en México y en particular la productividad del tomate en la Comarca Lagunera,

entre los más importantes se pueden mencionar a los pulgones *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Aphis gossypii*; mosquitas blancas, *Bemisia tabaci*, *B. argentifolii* y *Trialeurodes vaporariorum*; el psílido del tomate o paratrioza, *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli*; las chicharritas, *Empoasca fabae* y *Circulifer tenellus*; y a los trips, *Frankliniella fusca* y *F. occidentalis* (Nava *et al.* 2010).

En el cultivo del tomate se presenta un complejo de fitopatógenos afectando negativamente la producción de este cultivo, entre los cuales los de mayor importancia económica son el complejo de virus, fitoplasmas y organismos tipo bacteria, principalmente el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) transmitido por mosquita blanca, virus del jaspeado de tabaco (TEV) y virus del mosaico del pepino (CMV) transmitidos por pulgones y el permanente del tomate causado por fitoplasmas y *Ca. Liberibacter solanacearum* transmitidos por paratrioza. Las principales enfermedades micóticas son cenicilla, *Leveillula taurica* y tizón temprano, *Alternaria solani*; mientras que de las enfermedades bacterianas, la de mayor relevancia en la actualidad es el cáncer bacteriano, *Clavibacter michiganensis* var. *Michiganensis* (Garzón 2013, Méndez *et al.*, 2006).

Por lo anterior, se realizó el presente estudio durante el ciclo agrícola 2013 en la Comarca Lagunera, con el objetivo de detectar *Begomovirus* y *Liberibacter solanacearum* mediante la técnica de PCR punto final en muestras de tomate y de los insectos vectores mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Genn. biotipo B, y paratrioza, *Bactericera cockerelli* Sulc.

## **Materiales y Métodos**

**Ubicación del área de estudio.** El presente estudio se realizó en los terrenos experimentales de la Unidad Laguna de la UAAAN, ubicada en Torreón, Coahuila, durante el ciclo agrícola primavera-verano 2013. Se establecieron dos lotes de tomate, híbridos Sahel y TOP 1182, durante la primavera y verano del 2013, trasplantados el 25 de marzo y 19 de agosto, respectivamente. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, ubicada en Gómez Palacio, Durango, y en Biociencia, Monterrey, Nuevo León.

**Colecta de material vegetal.** Se colectaron 16 muestras (ocho muestras por híbrido) de tejido vegetal de los híbridos Sahel y TOP 1182 de cada uno de dos lotes de tomate trasplantados en primavera y verano del 2013, las muestras se colectaron el 30 de julio y 18 de diciembre del 2013, respectivamente, al final del ciclo del cultivo. Las muestras de tejido vegetal se tomaron de plantas con síntomas del rizado amarillo del tomate y permanente del tomate, las cuales se colocaron en bolsas de plástico tipo Ziploc. Posteriormente, las muestras se enviaron al laboratorio para su procesamiento y análisis. La mayoría de las plantas de tomate de primavera muestreadas presentaban síntomas de permanente del tomate. En el caso del tomate de verano, la mayoría de las plantas muestreadas presentaban síntomas tanto del rizado amarillo del tomate como de permanente del tomate, siendo más notorios los síntomas del rizado amarillo del tomate en el híbrido Sahel y los del permanente del tomate en el híbrido TOP 1182. Ávila-Rodríguez *et al.* (2013) reportan que los híbridos Sahel y TOP 1182 son susceptibles y resistentes al TYLCV, respectivamente.

**Colecta de insectos vectores.** Se colectaron cinco muestras compuestas de 50 a 100 adultos de mosquitas blancas y de 10 a 100 adultos de paratriozas el 3 y 27 de mayo, 11 de junio, 1 y 30 de julio del 2013 en el lote de tomate trasplantado en primavera y cuatro muestras el 8 y 28 de octubre, 22 de noviembre y 28 de diciembre del 2013 en el lote de tomate trasplantado en verano. Los especímenes de insectos vectores se colectaron de las plantas de tomate mediante un succionador manual y enseguida se colocaron en frascos con alcohol etílico al 100%.

**Extracción de ADN.** El DNA genómico fue extraído en forma individual a partir de tejido vegetal y en el caso de los insectos a partir de pools de 10 a 30 especímenes, usando el kit AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep® (Axygen Biociencias®) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se estimó la concentración de DNA obtenida en cada una de las muestras utilizando un espectrofotómetro Nanodrop®.

**Amplificación de ADN.** Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl. El mix de la reacción de PCR para la amplificación de los genes de DNA tanto de tejido vegetal como de insectos fue de acuerdo al procedimiento de Sambrook et al. (1989) en el cual se utilizaron 5 µl de buffer de PCR 5X (Invitrogen®), 0.5 µl de MgCl 50 mM concentración final (Invitrogen®), 0.5 µl de dNTPs 10 µM, concentración final (Invitrogen®), 0.5 µl de cada primer de 10µM concentración final (Invitrogen®), 0.5 µl (1.5 U) Taq DNA polimerasa, 13.5 µl agua de grado MiliQ y 3 µl de DNA, utilizando los siguientes oligonucleótidos para la amplificación del gen de la proteína de la cápside de *Begomovirus* en tejido vegetal y en especímenes de mosquita blanca, para lo cual se empleó el protocolo de Wyatt y Brown (1996) con los iniciadores degenerados prV 324(+) 5'GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG 3' y prC889 (-) 5'GGRTTDGARGCATGHGTACATG 3' (Quiagen®). Para la detección de *Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate, así como en *Bactericera cockerelli* fue el oligo OA2 5'-gcg ctt att ttt aat agg agc ggc a-3', Oi2c 5'-gcc tcg cga ctt cgc aac cca t-3', (IDT®), de acuerdo con Liefting et al. (2009). El programa térmico para *Begomovirus* fue a temperatura de inicio de 92°C a 1 min, seguida por 35 ciclos de 92°C a 60s, 60°C a 20s y 72°C a 30s; con una temperatura de extensión del primer a 72 °C por 4 min. El programa térmico para *Liberibacter* fue de 94°C a 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C a 30s, 55 °C a 30s y 72 °C a 7 min.

Los productos tanto de extracción como los amplificados del gen del DNAr nuclear fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 y 1.5% respectivamente, con amortiguador TBE 0.5% (tris base, ácido bórico, EDTA al 0.5M Ph 8.0). Las muestras fueron cargadas con buffer de corrida 6X y se tiñeron con azul de bromefenol 0.25% (W/V), Xylencyanol 0.25% (W/V), Glicerol en H2O bidestilada 30% (V/V), bromuro de etidio, de acuerdo con el manual de Sambrook (1989). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 a 3,000 pb como referencia. Los geles fueron fotografiados en un fotodocumentador Multidoc-IT UVP®

## Resultados y Discusión

**Detección de *Begomovirus* y *L. solanacearum* en tejido vegetal.** De las 16 muestras de tomate de primavera, 12 resultaron positivas a los patógenos estudiados y 4 resultaron negativas. La mayoría de las muestras (62.5%) de tomate resultaron positivas a la bacteria *L. solanacearum*; mientras que solo una muestra (6.2%) presentó *Begomovirus* y otra (6.2%) presentó ambos patógenos. Sólo muestras del híbrido Sahel, reportado como susceptible al TYLCV (Ávila et al. 2013), resultaron positivas a *Begomovirus*. La incidencia de *L. solanacearum* fue mucho mayor en el híbrido TOP 1182 (87.5%) que en el híbrido Sahel (37.5%) (Cuadro 1).

Todas las muestras de tomate de verano resultaron positivas a los patógenos estudiados. La mayoría de las muestras (81.2%) de tomate resultaron positivas a ambos patógenos; mientras que solo una muestra (6.2%) presentó *L. solanacearum* y dos muestras (12.5%) presentaron *Begomovirus*. La incidencia de los patógenos fue similar para ambos genotipos de tomate (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Número y porcentaje de muestras positivas a *Begomovirus* y *L. solanacearum* en dos épocas de trasplante y dos híbridos de tomate, Comarca Lagunera, 2013.**

Época de trasplante	Híbrido	Total de muestras	<i>Begomovirus</i>	<i>L. solanacearum</i>	<i>Begomovirus</i> + <i>L. solanacearum</i>
---------------------	---------	-------------------	--------------------	------------------------	---

Alvarado-Gómez *et al.*: **Detección por PCR de *Begomovirus* y *Liberibacter solanacearum* en tomate...**

			Número	%	Número	%	Número	%
Primavera	Sahel	8	1	12.5	3	37.5	1	12.5
	Top 1182	8	0	0	7	87.5	0	0
	Total	16	1	6.2	10	62.5	1	6.2
Verano	Sahel	8	1	12.5	1	12.5	6	75.0
	Top 1182	8	1	12.5	0	0	7	87.5
	Total	16	2	12.5	1	6.2	13	81.2

**Detección de *Begomovirus* y *L. solanacearum* en insectos vectores.** En tomate de primavera, sólo una muestra (25%) de mosquitas blancas resultó positiva a *Begomovirus*, por lo que se infiere que la mayoría de los especímenes no eran portadores del TYLCV. Por el contrario, tres muestras de paratriozas (75%) dieron positivas a *L. solanacearum*, las cuales se colectaron de mediados a fines del ciclo del cultivo (11 de junio a 30 de julio), lo que indica que la mayoría de los especímenes de este vector portaban al patógeno (Cuadro 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las muestras de tejido vegetal de tomate de primavera, ya que la incidencia de *Begomovirus* en las plantas fue baja y la de *L. solanacearum* fue alta (Cuadro 1).

En tomate de verano, todas las muestras de mosquitas blancas y de paratriozas fueron positivas a *Begomovirus* y *L. solanacearum*, respectivamente (Figura 1 y Cuadro 2). Estos resultados explican la alta incidencia de ambos patógenos, inclusive simultáneamente, en las plantas de tomate (Cuadro 1).

El virus TYLCV (*Begomovirus*) se reportó en el cultivo de tomate durante 1999 en Yucatán, México; en Sinaloa este virus causó pérdidas cuantiosas en tomate durante el ciclo agrícola 2005-2006 (Méndez et al. 2006). Nava et al. (2010) reportaron la presencia del TYLCV en tomate desde 1997 en la Comarca Lagunera, el cual alcanzó niveles de incidencia del 100% en plantas de tomate de los híbridos Sahel y El Cid, durante el ciclo agrícola 2008. Estos reportes son similares a los niveles de incidencia de *Begomovirus* en tomate, híbrido Sahel, observados en el presente estudio.

El “Permanente del tomate” fue reportado y descrito por primera vez en el cultivo de tomate en Guanajuato, donde causó pérdidas del 60% en la producción del cultivo (Garzón 1984). Recientemente esta enfermedad ha sido asociada a la bacteria no cultivable *Candidatus Liberibacter solanacearum*, cuyo vector es *Bactericera cockerelli* (Munyaneza et al. 2009). Los resultados del presente estudio confirman la presencia de esta bacteria tanto en el tomate como en *B. cockerelli*, en la Comarca Lagunera.

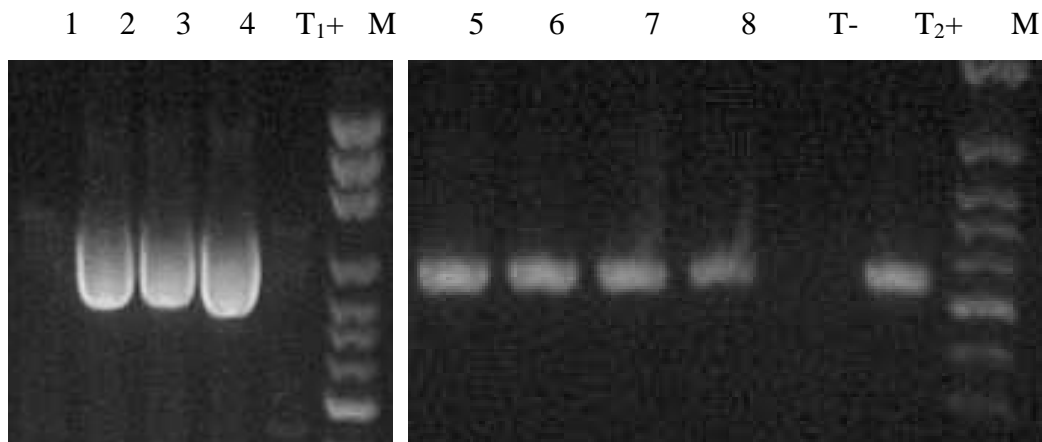


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR punto final de muestras de insectos vectores colectados en tomate trasplantado en verano; carriles 1, 2, 3 y 4 son muestras de adultos de paratriozas colectadas el 30 de julio, 28 de octubre, 22 de noviembre y 28 de diciembre del 2013, respectivamente; carriles 5, 6, 7 y 8 son muestras de adultos de mosquitas blancas colectadas el 8 de octubre, 28 de octubre, 22 de noviembre y 28 de diciembre del 2013; carril T- es el testigo negativo; carril T<sub>1</sub>+ es el testigo positivo a *L. solanacearum*; carril T<sub>2</sub>+ es el testigo positivo para *Begomovirus* y carriles M son los marcadores de peso molecular.

Cuadro 2. Detección de *Begomovirus* en mosquitas blancas y *L. solanacearum* en paratriozas colectadas en tomate, Comarca Lagunera, 2013.

Epoca de trasplante	Fecha de colecta	<i>Begomovirus</i> en mosquitas blancas	<i>L. solanacearum</i> en paratriozas
Primavera	3 mayo	-*	-
	27 mayo	+	-
	11 junio	-	+
	1 julio	-	+
	30 julio	-	+
Verano	8 octubre	+	+
	28 octubre	+	+
	22 noviembre	+	+
	28 diciembre	+	+

\*Indica muestras de insectos negativa ( - ) o positiva ( + ).

### Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se concluye que los *Begomovirus* y *L. solanacearum* se encuentran presentes en plantas de tomate con síntomas de rizado amarillo del tomate y permanente del tomate, respectivamente. *Liberibacter solanacearum* fue más prevalente en las plantas de tomate de primavera. Ambos patógenos manifestaron una incidencia alta en tomate de verano. Las mosquitas blancas fueron portadoras de *Begomovirus*, principalmente durante el ciclo de producción de tomate de verano. Las paratriozas fueron portadoras de *L. solanacearum* desde mediados del ciclo de producción de tomate de primavera. Existió una asociación estrecha entre la ocurrencia de los patógenos en los insectos vectores y sus niveles de incidencia en el cultivo de tomate.



### **Literatura Citada**

- Ávila-Rodríguez, V., U. Nava-Camberos, O. G. Alvarado-Gómez, J. L. García-Hernández y L. A. García-Perales. 2013. Densidades de la mosquita blanca e incidencia del TYLCV en diferentes híbridos de tomate cultivado en casas sombras, en la Comarca Lagunera. *Entomología Mexicana* 12: 1087-1092.
- El Siglo de Torreón. 2014. Resumen económico Comarca Lagunera 2013. Suplemento Especial. Torreón, Coahuila, 1 enero de 2014. p. 26.
- Garzón T., A. 2013. Enfermedades (por virus y organismos tipo bacteria) del chile y tomate en México. Bayer de México, S. A. de C. V. México, D. F. 49 p.
- Méndez L., J., P. Valenzuela G., J. Saturnino D., L. Perea A., E. Quintero Z., R. D. Ruelas A., P. Alvarez R. y N. E. Leyva L. 2006. Malezas como hospedantes alternos de *Begomovirus* en Sinaloa. Fundación Produce Sinaloa. CIIDIR-IPN-Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. 21 p.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., y Clover, G. R. G. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93:208-214.
- Munyaneza J. E, Sengoda V. G., Garzón-Tiznado J. A., Cárdenas-Valenzuela O. G. 2009. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in Mexico. *Plant Disease* 93:10:1076.
- Nava C., U., H. Galván S. y V. Ávila R. 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades del tomate, pp. 10-60. In: Benavides-Mendoza, A., V. Robledo-Torres, H. Ramírez y A. Sandoval-Rangel (compiladores), Sexto Simposio Nacional de Horticultura, Producción de Tomate en el Norte de México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.
- Sambrook, Joseph y Russell, David William. 2001. Spectrophotometry of DNA or RNA. In *Molecular Cloning. A laboratory manual. Volume 3. (3rd. ed.)*. (pp. A8.20- A8.21). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wyatt, S, D y Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III Geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1289.
- Garzón T., J. A. 1984. Enfermedad del "permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Gto. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, SLP. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 138. **Garzón TJA. 1984.** Enfermedad del "permanente" del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Celaya, Gto. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, SLP. Resúmenes Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. p 138.