

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) EN ZACATECAS

LUIS ROBERTO REVELES-TORRES, SILVIA SALAS-MUÑOZ, IVÁN CASTAÑEDA-LONGORIA, JORGE ARMANDO MAURICIO-CASTILLO



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

LIC. BALTAZAR HINOJOSA OCHOA
Secretario

MVZ. JORGE LUIS ZERTUCHE RODRÍGUEZ
Subsecretario de Agricultura

LIC. RAÚL ENRIQUE GALINDO FAVELA
Subsecretario de Desarrollo Rural

ING. IGNACIO LASTRA MARÍN
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ
Director General

DR. RAÚL G. OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. ARTURO DANIEL TIJERINA CHÁVEZ
Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

MC. RICARDO ALONSO SÁNCHEZ GUTIERREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) EN ZACATECAS

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F.
Teléfono (55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-1078-7

Primera Edición: Noviembre 2018

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Revelés-Torres L.R., Salas-Muñoz, S., Castañeda-Longoria, I. y Mauricio-Castillo, J.A. 2018. Identificación molecular de la presencia de fitoplasmas en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) en Zacatecas. Folleto Técnico Núm 93. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 45 páginas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Origen e importancia del tomatillo.....	4
Características del cultivo de tomatillo.....	6
Producción de tomatillo.....	7
PROBLEMAS FITOSANITARIOS DEL TOMATILLO	9
Insectos plaga.....	9
Agentes fitopatógenos.....	12
Herramientas para la detección de fitoplasmas	22
Análisis <i>in silico</i> del iPhyClassifier	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Toma de muestras	26
Diagnóstico molecular para fitoplasmas.....	28
Identificación de fitoplasmas	29
RESULTADOS	31
Identificación de plantas de tomatillo con posibles síntomas de fitoplasmosis.	31
Diagnóstico molecular	32
Análisis filogenético.	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA.....	40

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) EN ZACATECAS

Luis Roberto Reveles-Torres¹

Silvia Salas-Muñoz²

Iván Castañeda-Longoria³

Jorge Armando Mauricio-Castillo³

INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara o tomatillo es una especie hortícola de importancia económica en México ampliamente utilizada en la alimentación de la población mexicana. En la actualidad dicha hortaliza se ubica entre las cinco principales especies hortícolas cultivadas en el país, superada por el chile (*Capsicum annuum* L.), la papa (*Solanum tuberosum* L.), el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la cebolla (*Allium cepa* L.). Durante 2017, la superficie nacional dedicada a este cultivo fue de 43 505 hectáreas (ha) con un rendimiento promedio aproximado de 14 ton/ha aunque hay algunas investigaciones que reportan una producción de hasta 40 ton/ha (SIAP, 2017).

¹ Investigador del Programa de Biología Molecular del Campo Experimental Zacatecas. ² Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas. ³ Alumno de la licenciatura de Agronomía de la Universidad Autónoma de Zacatecas ⁴ Docente-Investigador de la Unidad Académica de Agronomía UAZ.

México es conocido como el centro de origen de una amplia diversidad genética de tomate de cáscara o tomatillo, el cual ha sido agrupada en ocho razas: Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla, prácticamente distribuidas en todo el país (Peña-Lomelí *et al.*, 1998).

En México y en el mundo, el tomatillo al igual que cualquier otro cultivo, es afectado por diversos factores abióticos y bióticos que causan grandes pérdidas económicas. Entre estos últimos, destaca el estrés biótico causado por hongos, bacterias, virus, nematodos y fitoplasmas. De esta manera, las enfermedades ocasionadas por dichos patógenos representan uno de los factores de mayor riesgo para la producción de diversos cultivos, por lo cual es importante realizar actividades para su protección del ataque de fitopatógenos, ya que en los últimos años las enfermedades virales y bacterianas han ocasionado grandes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha observado cierta sintomatología típica de fitoplasmosis en este cultivo, entre las que destacan el amarillamiento foliar, las estructuras florales toman el aspecto de hojas, conformaciones conocidas como “yemas grandes”, la proliferación exagerada de brotes y el raquitismo o enanismo en la planta (Figura 1).



Figura 1. Planta de tomatillo donde se aprecia amarillamiento foliar, estructuras convertidas en “yemas grandes”, proliferación exagerada de brotes y el raquitismo o enanismo en la planta.

La aparición de estos síntomas, creó la necesidad de la identificación precisa del agente fitopatógeno, por lo que el personal del Laboratorio de Diagnóstico Molecular en Sanidad Vegetal, del Campo Experimental Zacatecas, se avocó a dicha tarea.

Es así como el objetivo de este folleto técnico, es dar a conocer la sintomatología provocada en el cultivo del tomatillo, así como la información del método de diagnóstico del patógeno para su identificación.

Origen e importancia del tomatillo

El miltomate, tomatillo, tomate verde, tomate de cáscara o simplemente tomate (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem), es una especie originaria de México, perteneciente a la familia de las Solanáceas. La especie es originaria de Mesoamérica, de donde su nombre original en náhuatl es “tomatl” que significa “agua gorda” y pasó al español como “tomate”. También es conocido como tomate de cáscara, el cual, el mismo hombre la ha venido manejando desde su antigüedad. Diversos hallazgos arqueológicos prueban que su uso en la alimentación y de forma medicinal en la

población mexicana se remonta a tiempos precolombinos (Ramírez-Loya y Saray-Meza, 1977; Pérez-Grajales, 1998).

México se encuentra entre los principales países productores y exportadores de hortalizas en el mundo y se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial y el primero en el continente americano. Otros países exportadores de importancia son Países Bajos, España, China, Francia, Bélgica y Canadá; los diez principales países productores de hortalizas contribuyen alrededor del 70% de la producción mundial (Hernández-Deheza, 2013).

En el 2016, la producción de tomate verde en México fue de 679 mil 910 toneladas (ton), lo que refleja un incremento a una tasa anual de 2.3%. Los principales estados productores fueron Sinaloa, Zacatecas, Puebla, Michoacán y Jalisco. Asimismo, los estados que reportaron los mayores crecimientos en la producción de dicha hortaliza en 2016 fueron: Nuevo León 64.3%, Guanajuato 38.7%, Sonora, 36%, Veracruz 27.6%, Baja California Sur 26.5%, Colima 20.5%, Ciudad de México 18.1%; Hidalgo 16.1%; Baja California 16%, Guerrero 8.9% y Chihuahua 7.4%.

También la superficie destinada a este cultivo en el país es alrededor de 42 mil 639 hectáreas, distribuidas en 28 estados del país (SAGARPA, 2017).

Características del cultivo de tomatillo

El tomatillo es una planta herbácea anual, sus flores son hermafroditas y de una tonalidad amarilla; tiene una polinización entomofílica, realizada por abejas. El tallo de la planta es estriado y sus hojas son glabras (sin tricomas). El fruto es pequeño, esférico y verde o violáceo rodeado por una envoltura papirácea, la cual está conformada por el cáliz cuando el fruto madura rompe el envoltorio adyacente, el cual es de color marrón. Aunque estos tomates son de color verde, no deben ser confundidos con tomates rojos que aún no maduran, debido a que estos últimos pueden ser venosos por su contenido de solanina. Otras partes de la planta de tomate diferentes a los frutos no deben ser empleadas en la alimentación por su contenido de toxinas.

El ciclo de vida del cultivo de tomatillo es corto, entre 86 a 96 días aproximadamente, por lo que el terreno permanece poco tiempo ocupado. También es de fácil manejo y alta rentabilidad, que demanda gran cantidad de mano de obra no especializada. Este cultivo se ha incrementado por ser una hortaliza que no requiere muchos cuidados debido a su alto grado de rusticidad y por tener grandes perspectivas en el mercado, algunas veces llega a ser sustituto del jitomate, cotizándose a un buen precio y en ocasiones es mayor al del jitomate.

Producción de tomatillo

El tomate de cáscara se desarrolla en condiciones del medio de germinación con pH de seis a siete, temperaturas de 20 a 30°C para la germinación y de 22 a 25°C para el crecimiento vegetativo. En la etapa de floración requiere de 30 a 32°C. Las etapas críticas en cuanto a requerimientos de humedad corresponden a la germinación y emergencia, así como al trasplante. Durante el resto del ciclo, incluyendo la floración necesita de un 60% de la capacidad hídrica del suelo (Ramírez-Loya y Saray-Meza, 1977). La época de siembra es de acuerdo con la zona productora y

se asocia con el periodo libre de heladas o bien de temperaturas excesivas. El momento óptimo del trasplante se alcanza cuando la plántula tiene de tres a cuatro hojas verdaderas o bien cuando las plántulas tengan de 15 a 29 días (Peña-Lomelí *et al.*, 1991).

En México, para la fertilización en tomate de cáscara, existen diferencias al considerar la dosis de diferentes nutrientes, como nitrógeno, fósforo y potasio a emplear. Castro *et al.* (2004) encontraron que se requieren 3.7 kg de nitrógeno aprovechable para producir una tonelada de fruto fresco en tomate de cáscara, además, mencionan que la etapa de desarrollo del cultivo con mayor demanda de nitrógeno fue la que corresponde al inicio de la cosecha (55 días después del trasplante), ya que en ésta convergen el crecimiento vegetativo, la floración y fructificación. En un estudio realizado por Ramos *et al.* (2002) en tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) bajo un sistema de fertirriego y riego por goteo en invernadero, observaron que la dosis óptima para nitrógeno fue 120 kg ha⁻¹ para lograr un rendimiento de fruto de alrededor de 28 ton ha⁻¹. Arroyo (1999) recomienda fertilizar con 120 kg de nitrógeno y 40 kg de fósforo, para los estados de Guanajuato y Guerrero.

Asimismo, Peña-Lomelí (1991) menciona que la dosis e emplear depende fundamentalmente del tipo de suelo, e indica que el tratamiento 180-90-30 nitrógeno-fósforo-potasio, es adecuado para tomate de cáscara en suelos de tipo migajón limoso, mientras que si los suelos son más pobres se deben aplicar más fertilizantes.

PROBLEMAS FITOSANITARIOS DEL TOMATILLO

Insectos plaga

El tomate verde a igual que otros cultivos es afectado por diversos agentes bióticos, entre las que destacan insectos plaga de coleópteros (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Al respecto, diversos insectos considerados como plaga han sido reportados afectando al tomatillo. Aguilar (1993) menciona ocho especies de insectos actuando como plagas del tomate de cáscara en Villa de Arista y Venado, San Luis Potosí, entre las que se encuentran la pulga saltona (*Epitrix* sp.), el gusano del fruto (*Heliothis subflexa*), el pulgón (*Myzus persicae*), y el picudo del toloache (*Trichobaris* sp.).

Por otro lado, Jiménez *et al.* (1992) en la zona de Chapingo, Méx., encontraron especies plaga asociadas con este cultivo, entre los que están la mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), la catarinita (*Lema trilineata daturaphila*), la pulga saltona (*Epitrix* sp.), el frailecillo (*Macroductylus* sp.), el picudo del toloache (*Trichobaris mucorea* Le Conte) y el picudo del tomate de cáscara (*Trichobaris championi*). Morales-Galván *et al.* (2002) reportan al barrenador del tallo del tomate de cáscara, llamado “arrocillo” en los estados de México y Morelos, identificado como *Melanagromyza tomaterae* Steyskal (Díptera: Agromyzidae). En México este agromicido barrena los tallos del tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) (Jimenez-Gómez *et al.*, 1992) y de algunas solanáceas silvestres tales como *Physalis patula* Mill, *Physalis nicandroides* Schltl y *Jaltomata procumbens* (Cav.) J.L. Gentry. Su distribución abarca localidades de los estados de Hidalgo, México, Morelos, Puebla y Tlaxcala (Bautista y Morales, 2000; Palacios-Torres *et al.*, 2008; Palacios-Torres *et al.*, 2010).

Asimismo, el tomatillo es la cuarta especie hortícola más cultivada en México y además, hospedera de diversas plagas que limitan su capacidad productiva cuando éstas encuentran condiciones favorables para su reproducción; entre ellas destaca *Bactericera cockerelli* (Sulc), que también ataca a otras especies cultivadas como jitomate, chile y papa (Almeyda-León *et al.*, 2008). *Bactericera cockerelli* provoca dos tipos de daño en sus plantas hospedantes: 1) durante sus estados ninfales inyecta una toxina que causa clorosis en la planta y 2) transmite un fitoplasma que origina la enfermedad permanente del tomate, la cual produce hasta 45% de pérdidas en rendimiento en las 30,000 ha cultivadas en México (Almeyda-León *et al.*, 2008). Este insecto se encuentra ampliamente distribuido en las principales regiones productoras de jitomate: Villa de Arista, San Luis Potosí, Yurécuaro, Michoacán, la región de La Laguna en los estados de Durango y Coahuila, San Quintín, Baja California, y en Morelos, Puebla, Guanajuato, Nayarit, Sinaloa y Estado de México (Vega-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Por otro lado, en Sinaloa las principales hortalizas que se producen son: tomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem). Además, se siembran cucurbitáceas como calabacita (*Cucurbita pepo* L.), melón (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y sandía (*Citrillus lanatus* Thumb) (Félix-Gastélum *et al.*, 2005); cultivos regularmente afectados por insectos plaga, dentro de los que destacan: mosquita blanca, paratrioza, minador de las hojas, áfidos y trips, los cuales pueden ser insectos vectores de virus, fitoplasmas y toxinas (Garzón-Tiznado *et al.*, 2009).

Agentes fitopatógenos

Entre los hongos fitopatógenos que afectan a tomatillo, destaca *Fusarium oxysporum* Schlecht por los daños que ocasiona el barrenador de los tallos *M. tomaterae*, el cual favorece la penetración e infección de la planta que en conjunto reducen el rendimiento de esta hortaliza considerablemente (Morales-Galván *et al.*, 2002). Los síntomas característicos de la marchitez del tomate de cáscara son la necrosis de los haces vasculares,

fácilmente apreciable en tallos infectados; en plantas adultas los síntomas son visibles entre la etapa de floración y maduración del fruto (Jones *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 2009). La pérdida de cosecha llega hasta 100 % en las áreas productoras (Mendoza-Zamora, 1996).

Otro de los principales problemas que enfrentan los productores de tomate de cáscara son las patologías que se presentan cada ciclo. Una de ellas se caracteriza por la presencia de plantas que envejecen antes de tiempo cuyos rendimientos disminuyen hasta 60 ton/ha (Rivera-Martínez *et al.*, 2017). En este sentido, Liefting *et al.* (2008) determinaron que dichos síntomas están asociados con la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum*, la cual parece ser la misma bacteria que causa el amarillamiento en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.). Esta nueva bacteria es transmitida por el psílido *Bactericera cockerelli* Sulc., que es un insecto ampliamente distribuido en la mayoría de las zonas agrícolas de México (Rivera-Martínez *et al.*, 2017).

Por otro lado, a nivel mundial se han reportado 32 virus para cucurbitáceas, en los cuales predominan los virus

transmitidos por áfidos, dentro de ellos *Mizus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) es el más importante, por ser el vector de más de 100 tipos de virus en casi 30 familias de plantas (CABI, 2018). También, González-Maldonado y García-Gutiérrez (2012) dan a conocer las principales plagas que por su importancia económica y superficie sembrada, afectan la región hortícola de Sinaloa, entre las que destacan *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) el principal y más eficaz vector del virus del bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV), el virus es un tospovirus de la familia Bunyviridae, el cual ocurre en regiones templadas y subtropicales. Los tospovirus tienen partículas casi esféricas de 85 nm de diámetro con una envuelta lipoprotéica (Adam y Kegler, 1994).

En tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.), el virus se reconoce mejor por los síntomas del fruto. Tanto el fruto verde y como el rojo pueden ser infectados. En el fruto verde (inmaduro), aparecen pequeñas manchas irregulares. Mientras que en los frutos rojos presentan manchas redondas de color amarillo que nunca se vuelven

rojas. Otros síntomas del fruto son manchas cloróticas y necróticas, en ocasiones anillos concéntricos y la deformación. Los síntomas foliares son: anillos cloróticos/necróticos y líneas sinuosas de color más claro sobre el fondo verde. Las plantas infectadas en una etapa temprana se atrofian severamente. Particularmente en sistemas de producción bajo condiciones de invernadero (Vargas y Ubillo, 2005).

También De la Torre-Almaráz *et al.* (2002) aislaron y caracterizaron parcialmente varios virus en plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem.) en los estados de México, Puebla y Morelos. Las pruebas de transmisión mecánica, injerto, por insectos vectores, serología y microscopía electrónica, permitieron detectar la presencia de varios virus cuyo genoma está constituido por ARN de cadena sencilla, como el virus jaspeado del tabaco (TEV), mosaico del pepino (CMV), marchitez manchada del tomate (TSWV), mancha necrótica del impaciente (INSV), mancha anular del tabaco (TRSV) y mosaico del tabaco (TMV). Además, los análisis serológicos (ELISA) indicaron que infecciones en mezcla con varios de estos virus están

ampliamente distribuidos en las zonas productoras de los estados de México, Puebla y Morelos.

En las mismas regiones productoras de tomate de cáscara, mediante PCR y análisis de hibridación tipo Southern, se determinaron infecciones en forma individual o en mezcla, por los geminivirus huasteco del chile (PHV) y mosaico dorado del chile (PGMV), cuyo genoma está constituido por ADN de cadena sencilla. Los análisis serológicos (ELISA) y molecular (hibridación tipo Southern), mostraron que en tomate de cáscara fueron más frecuentes las infecciones por virus del tipo ARN (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha determinado el agente causal de algunas enfermedades de probable origen viral, cuyos síntomas se reprodujeron en plantas sanas de tomate de cáscara por transmisión mecánica o por injerto, en invernadero. Una enfermedad con estas características, común en numerosas plantas de tomate de cáscara de las zonas productoras de los estados de México, Hidalgo, Morelos, Puebla y Tlaxcala, es el moteado amarillo del tomate de cáscara, cuyos síntomas primarios incluyen un moteado y mosaico foliar de color amarillo intenso, que

posteriormente, derivan en deformación de hojas, clorosis, enanismo y marchitez de la planta. Algunos resultados preliminares, que incluyen los síntomas causados en algunas especies de plantas susceptibles y el análisis de ARN viral de doble cadena en plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo, sugieren que esta enfermedad puede ser causada por el virus mosaico de la alfalfa (AMV) (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2002).

La enfermedad conocida como moteado amarillo del tomate de cáscara afecta plantas en parcelas comerciales en los estados de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, en el centro de México. El virus aislado y caracterizado de plantas de tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) con síntomas de tomatillo ocasionó síntomas de moteado y mosaico amarillo, deformación foliar, clorosis y marchitez. El agente causal fue identificado como un virus del tipo ARN, transmitido a una amplia gama de hospedantes en forma mecánica y por su insecto vector *Myzus persicae*.

Asimismo, De la Torre *et al.* (2003) detectaron y caracterizaron biológicamente a un geminivirus en plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) cultivadas en parcelas comerciales en los estados de México, Puebla y Morelos. La separación electroforética de ADN procedente de plantas con síntomas de origen viral, el análisis por hibridación molecular con una sonda del gen de la proteína de la cápside del virus huasteco del chile (Pepper Huasteco virus (PHV)), la amplificación de ADN viral por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), así como la clonación y secuenciación de fragmentos genómicos amplificados, que incluían un fragmento que va desde la estructura de horquilla de la región intergénica, a una región conservada del gene de la cápside, indicaron que los geminivirus que se encontraron infectando a varias muestras de tomate de cáscara, son genéticamente semejantes al virus PHV. Sin embargo, la incidencia de esta clase de virus fue baja, aunque no se descarta la posibilidad que otras especies de geminivirus desconocidos infecten al cultivo en México. Por el contrario, la mayoría de las plantas de tomate de cáscara con síntomas de probable origen viral se encontraron

infectadas, en forma individual o en mezcla, con los virus Mosaico del pepino (CMV), Mosaico del tabaco (TMV), Jaspeado del tabaco (TEV), Mancha anular del tabaco (TRSV) y Marchitez manchada del tomate (TSWV). Además, el análisis de ARN-dc permitió detectar además infecciones por virus no descritos aún en tomate de cáscara. La sintomatología observada en las plantas fue proliferación de hojas, mosaicos y moteados amarillos, cálico, enanismos y marchitez de hojas y tallos, presentes a lo largo del ciclo del cultivo, en algunos de ellos registraron incidencias de 60 a 100%, y pérdidas en el rendimiento de frutos del 30 a 100%.

Por otra parte, *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (= *Paratrioza cockerelli*) es un insecto que ocasiona daños directos por las toxinas que provoca que las hojas se tornen amarillas o con un aspecto raquíptico. Mientras que los indirectos son originados por el fitoplasma que transmite, el cual es un organismo infeccioso, submicroscópico que causa la enfermedad “permanente del tomate”, lo que ocasiona aborto de la flor, hojas quebradizas y enrolladas hacia arriba. Actualmente también se reporta en los estados de

Morelos, Nayarit y Sinaloa, regiones con climas cálidos. Además, puede transmitir *Candidatus Liberibacter solanacearum* a papa, lo cual está asociado con la enfermedad “Zebra chip” (Butler *et al.*, 2011).

De igual forma, un estudio realizado en Sinaloa, plantas de tomatillo presentaron síntomas similares a los asociados con enfermedades de fitoplasmas, tales como hojas pequeñas, amarillamiento y deformaciones de las yemas florales (Figura 2).



Figura 2. Estructuras florales de tomatillo que toman el aspecto de conformaciones conocidas como “yemas grandes”.

El ADN total de plantas con síntomas fue extraído y utilizado como modelo en un ensayo de PCR anidado para amplificar el gen del ADN 16S rDNA del fitoplasma utilizando los pares de oligonucleótidos R16mF2/R16mR1 y R16F2n/R16R2. Casi dos tercios de las muestras produjeron el fragmento de PCR esperado (1.25 kb) y todas las muestras analizadas dieron el mismo perfil después de la digestión de restricción con AluI, KpnI, MseI, HaeIII y RsaI. El producto de PCR se clonó en el vector lento pGEM-T (Promega) y se secuenció. La secuencia 16S rDNA amplificada de los fitoplasmas (1246 pb; GenBank Acc. No. DQ987871) se comparó con secuencias de ADN de otros fitoplasmas tomadas de la base de datos GenBank, usando el método de alineación Clustal V (MegAlign). La similitud de secuencia más alta (99%) se obtuvo con fitoplasmas de escoba, jitomate de hoja, ceniza de tomate y pimiento (GenBank Acc. Nos. DQ375238, DQ168882 y AY566302, respectivamente), que son aislados de 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16SrI Aster yellows grupo). Este es el primer informe de un fitoplasma asociado con una enfermedad del cultivo de tomate en México (Santos-Cervantes *et al.*, 2007).

Por otro lado, Rivera-Martínez *et al.* (2017) reportan que en el estado de México la producción de tomate de cáscara ha sufrido pérdidas económicas del 70 al 80% por la presencia de amarillamiento y aborto floral, atribuidos a la presencia de fitoplasmas. Un vector de estos fitoplasmas es el insecto *Bactericera cockerrelli* Sulc.

Herramientas para la detección de fitoplasmas

Las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de fitoplasmas se clasifican en biológicas, inmunológicas y genéticas. Las técnicas biológicas utilizan la descripción de la sintomatología dependiendo el patógeno y el cultivo al cual está afectando. Sin embargo, solo sirve como una guía para establecer la posible presencia de un patógeno determinado ya que las sintomatologías pueden ser muy similares a las causadas por otros fitopatógenos. Entre las inmunológicas la principal es ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), entre las génicas la PCR (polymerase chain reaction). Estos métodos tienen la ventaja de ser seguros, sensibles y aceptados en numerosos protocolos oficiales mundiales. La prueba

ELISA involucra la unión de la membrana plasmática y/o proteínas de los fitoplasmas con un anticuerpo específico. Debido a la capacidad de la molécula del anticuerpo para reconocer con precisión y unirse a determinadas formas en otras moléculas, la actividad de acoplamiento del anticuerpo es usada para identificar patógenos vegetales (Dickinson y Hodgetts, 2012).

El método ELISA, se considera como la prueba de rutina y el primer acercamiento al conocimiento del estado sanitario de las plantas. Los extractos del tejido vegetal, se colocan en un plato de prueba que ha sido recubierto con anticuerpos específicos. Si el fitoplasma está presente en la muestra se unirá a los anticuerpos específicos del plato, los que serán detectados por una reacción enzima-sustrato que produce un color de reacción. Una de las ventajas de ELISA es que se pueden procesar muchas muestras simultáneamente; además es de relativamente bajo costo y es un método rápido (los resultados pueden obtenerse aproximadamente en tres días). Sin embargo, sólo debe usarse como un método filtro porque podría no detectar infecciones si el fitoplasma se encuentra en bajas concentraciones o en infecciones mixtas. Para asegurar la

ausencia de infección, un resultado negativo con ELISA debería ser siempre confirmado mediante PCR (Dickinson y Hodgetts, 2012).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación (es decir, producir múltiples copias) del ADN ribosomal de fitoplasma que podrían estar presentes en bajas concentraciones.

Los iniciadores o “primers” son segmentos cortos de DNA que activan el proceso de copiado genético. La ayuda de ADN polimerasa (molécula que facilita el proceso de copiado del ADN) produce duplicados del ADN de fitoplasma. La duplicación se repite varias veces con cada copia haciendo más copias, así, luego de 40 ciclos, se ha producido más de 1 millón de millones de copias, y el fitoplasma puede ser detectado. Para el diagnóstico de fitoplasmas la técnica más utilizada es la PCR. Para aumentar su sensibilidad se utiliza un método definido como “anidado”, que consiste en una primera amplificación por medio de PCR con iniciadores universales, cuyo producto se somete a un segundo ciclo de PCR. En esta segunda etapa se utiliza otra pareja de partidores universales o específicos capaces de amplificar una zona

interna del producto de la primera amplificación, lo que permite mejorar la sensibilidad de la técnica (Dickinson *et al.*, 2012).

Análisis *in silico* del iPhyClassifier

El iPhyClassifier es una herramienta de investigación, que fue creada para expandir la eficacia y la capacidad del actual sistema de clasificación de fitoplasmas basado en secuencias de 16S rRNA. El iPhyClassifier realiza análisis de similitud de secuencias, simula digestiones de 17 enzimas de restricción de laboratorio y electroforesis en gel, y posteriormente genera patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción virtual [RFLP] (Zhao *et al.*, 2013).

Basado en coeficientes de similitud de patrón de RFLP calculado y puntuaciones de similitud de secuencia global, el iPhyClassifier proporciona sugerencias instantáneas sobre el estado de clasificación de grupos y subgrupos y asignación de especies de “*Candidatus Phytoplasma*” de las cepas de fitoplasma estudiadas. Las funciones adicionales del iPhyClassifier incluyen la delineación de grupos y subgrupos de fitoplasmas potencialmente

nuevos, así como nuevas especies de “*Candidatus Phytoplasma*” (Dickinson *et al.*, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

La colecta de las plantas de tomatillo se realizó en el municipio de Morelos, Zac., las cuales presentaron sintomatología de amarillamiento, enanismo, deformación foliar y conversión de las estructuras florales en foliares (Figuras 3 y 4). Además, se tomaron plantas asintomáticas como control. Las plantas de tomatillo colectadas se trasladaron al Laboratorio Diagnóstico Molecular en Sanidad Vegetal del Campo Experimental Zacatecas (INIFAP-CEZAC), con la finalidad de realizar el procedimiento de identificación del fitopatógeno.



Figura 3. Plantas de tomatillo con síntomas de amarillamiento, enanismo y estructuras florales modificadas.



Figura 4. Planta de tomatillo con síntomas de amarillamiento, enanismo y estructuras florales modificadas

Para la detección de cualquier agente fitopatológico, lo primero que se debe de realizar es la extracción del ADN total del tejido vegetal enfermo. De doce plantas de tomatillo con la sintomatología observada, se tomaron aproximadamente 5 gramos de cada una, los cuales se maceraron en nitrógeno líquido en un mortero frío, y posteriormente se colocó la muestra pulverizada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se procedió a la extracción de ADN con el método de Dellaporta y colaboradores (1983).

Diagnóstico molecular para fitoplasmas

Después de la extracción del ADN total del tejido las plantas de tomatillo se realizó el diagnóstico molecular de fitoplasmas bajo PCR con oligonucleótidos P1 (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3' y Tint (5'-TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C-3') (Smart *et al.*, 1996), y después una reamplificación anidada a partir de un fragmento de 1,250 pb aproximadamente con los oligonucleótidos R16F2n (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' y 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') (Gundersen y Lee, 1996).

Los programas del termociclador fueron 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 56°C/1minuto,72°C/2 minutos), y de extensión final a 72°C /5 minutos. El programa para la reamplificación fue a 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 55°C/1minuto, 72°C/2 minutos), y extensión final a 72°C /5 minutos.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizan por tinción con bromuro de etidio e iluminación UV, y fueron fotodocumentados.

Identificación de fitoplasmas

Los productos de PCR de las muestras de las plantas de tomatillo que resultaron positivas para el ADN de fitoplasmas, se clonaron (ligaron) en el vector pGEM®-T Easy (Promega Corporation), y se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* mediante choque térmico. Después, las clonas positivas se sometieron a digestión con la enzima EcoRI, con la finalidad de liberar el fragmento clonado que corresponde al gen 16S ribosomal de fitoplasma. Posteriormente, las clonas positivas fueron

sometidas a un análisis de RFLP con las enzimas de restricción HinfI y EcoRI (New England BioLabs™), para identificar bandas polimórficas que indicaran si se trataba de una infección simple o mixta. Las clonas seleccionadas fueron secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México.

Con las secuencias obtenidas, se realizó análisis *in silico* donde éstas, se exportaron a los programas virtuales de análisis de RFLP de la web iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) para la restricción de la digestión simulada por ordenador y el trazado de gel virtuales (Zhao *et al.*, 2009). Cada fragmento de ADN fue digerido y alineado *in silico* con 17 enzimas de restricción diferentes que han sido utilizadas de forma rutinaria para el análisis de los RFPLs del gen ADNr 16s (Lee *et al.*, 1998). Después de la digestión de restricción *in silico*, una imagen de electroforesis en gel de agarosa al 3% virtual fue trazada y capturado como un archivo PDF. Las secuencias de análisis RFLP de los aislamientos de fitoplasmas se

compararon de forma automática para el reconocimiento de grupo y subgrupo de fitoplasmas 16s.

RESULTADOS

Identificación de plantas de tomatillo con posibles síntomas de fitoplasmosis.

Las plantas recolectadas de tomatillo en el municipio de Morelos, Zacatecas, presentaron síntomas de amarillamiento, enanismo, defomación foliar y conversión de las estructuras florales en foliares los cuales se relacionan con la presencia de fitoplasma (Figura 5). Se recolectaron un total de 10 plantas con dicha sintomatología y cuatro aparentemente sanas del mismo cultivo, las cuales se usaron como control negativo para fitoplasmas.



Figura 5. Sintomatología de plantas de tomatillo identificadas en parcelas comerciales del municipio de Zacatecas, Zac.

Dichas plantas fueron trasladadas al laboratorio de Diagnóstico molecular en Sanidad Vegetal del CEZAC, con la finalidad de llevar a cabo el proceso de identificación del patógeno a nivel molecular.

Diagnóstico molecular

Para la detección de fitoplasmas mediante PCR, los resultados obtenidos indicaron que cinco muestras de las 10 analizadas resultaron positivas para la presencia de fitoplasma. En la Figura 6, se muestra la amplificación de

un fragmento de 1 250 pb, en las muestras 1, 2, 3, 4 y 9, el cual corresponde a la presencia de fitoplasmas.

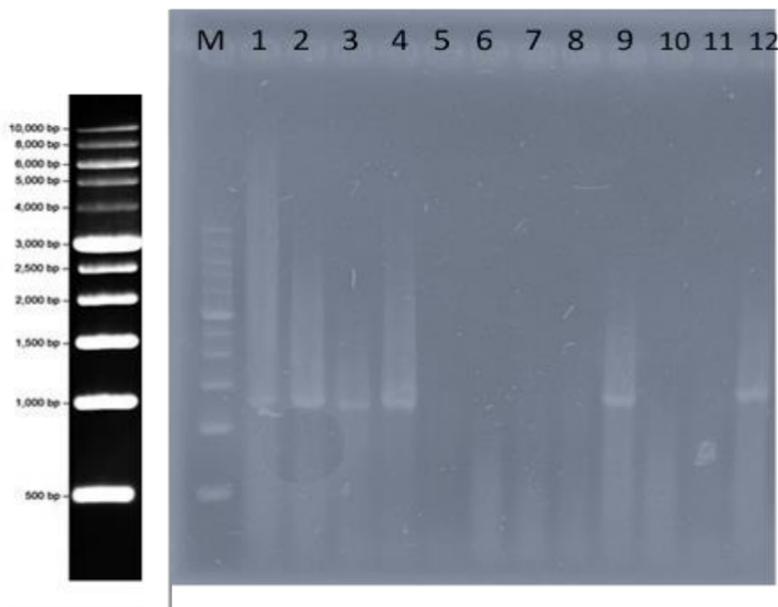


Figura 6. Identificación de fitoplasmas mediante la PCR anidada en plantas de tomatillo. Carril M: Marcador de peso Molecular 1 kb, Carriles 1-10: muestras de plantas de tomatillo, Carril 11: Control negativo y Carril 12: Control positivo.

Los productos de la PCR anidada de las cinco muestras que dieron positivo para fitoplasmas de las plantas de tomatillo fueron ligados. En la Figura 7, se puede observar un gel de 12 clonas de una ligación, donde se aprecia la liberación de tres fragmentos, uno de 3 000 pb, el cual

corresponde al tamaño del vector y dos entre 1,000 y 500 pb, los cuales la suma del tamaño de las dos bandas correspondiente a los 1 250 pb.

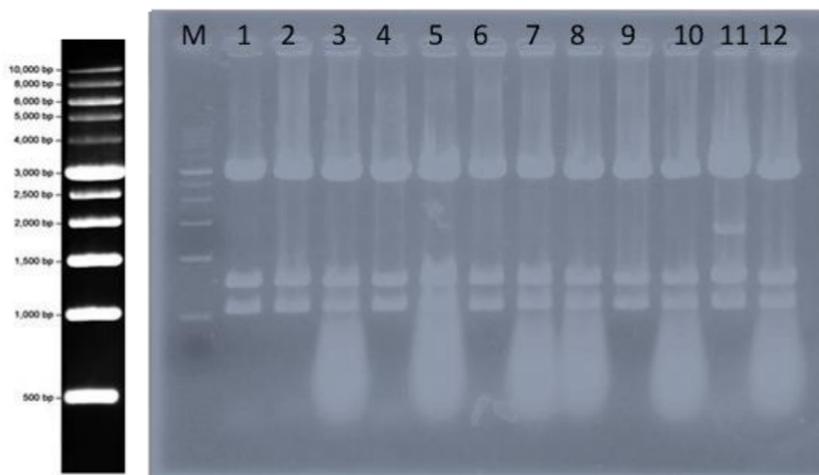


Figura 7. Digestión de las clonas con la enzima *EcoRI* de la ligación 6. Las 12 clonas liberaron el fragmento de 1,250 pb. Carril M: marcador de peso molecular 1kb. Carriles 1-12: ADN plasmidico.

Todas las clonas que se obtuvieron de las ligaciones de las muestras 1, 2, 3 y 9 positivas, mostraron el mismo patrón de digestión con la enzima *EcoRI*.

Para el análisis de los RFLPs *in vivo*, se realizó el corte con las enzimas *EcoRI* y *HinfI*, con la finalidad de observar el patrón de bandeado, para identificar infecciones sencillas o

mixtas. En la Figura 8, se muestran 20 clonas de la ligación las cuales presentan el mismo patrón de bandeo.

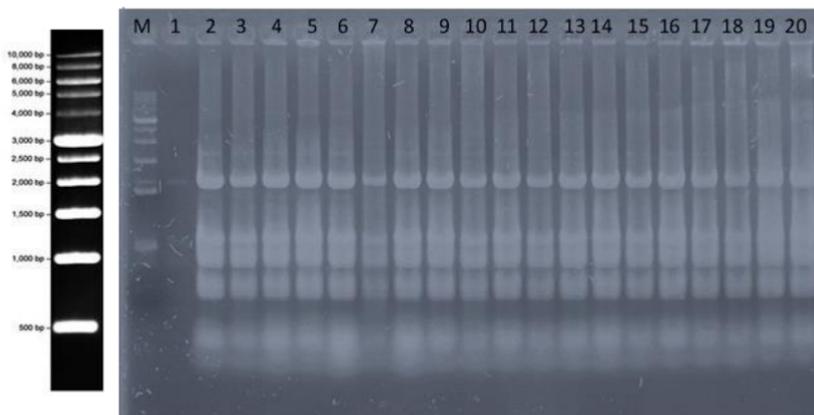


Figura 8. RFLP's con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HinI*. Digestión de las clonas que liberan el fragmento de 1,250pb de la muestra 4. Carril M: marcador de peso molecular 1 kb y Carriles 1-20: Clonas 1-20, respectivamente.

Cabe mencionar, que se realizaron los RFLPs de todas las clonas que liberaron el fragmento de 1 250 pb y, todas presentaron el mismo patrón de bandeo confirmando que es una infección simple causada por el mismo fitoplasma.

[Análisis filogenético.](#)

Las secuencias de cada una de las clonas, se compararon con las propias depositadas en el GenBank National Center for National Center for Biotechnology Information

(NCBI), mediante la opción Blastn, dando como resultado que todas estas son secuencias del gen 16s ribosomal de fitoplasmas.

Para la identificación de la cepa de fitoplasmas, se llevó el análisis de las secuencias de las muestras de plantas de tomatillo en la base de datos de iPhyClassifier (Zhao, 2013) dando como resultado la máxima identidad a nivel de secuencia fue obtenida con la cepa de referencia para “*Candidatus Phytoplasma trifolii*” con un 99.0% de similitud (GenBank accession: AY390261).

DISCUSIÓN

La presencia de una nueva sintomatología (amarillamiento, enanismo, deformación foliar y conversión de las estructuras florales en foliares), afectando parcelas de tomatillo en el municipio de Zacatecas, Zac., ha despertado la preocupación de los productores debido a que las plantas afectadas no producen frutos y eso puede en un futuro, mermar considerablemente el rendimiento. Uno de

los primeros pasos para controlar una enfermedad es el establecer la identidad del agente causal y a partir de ahí, diseñar estrategias que permitan evitar su dispersión a otros cultivos y/o zonas geográficas.

Una vez que los extractos provenientes de plantas enfermas fueron analizados por PCR anidado se confirmó la presencia de fitoplasmas en 5 de las 10 muestras, además con base a los análisis basados en los RFLPs se confirmó que el ADN identificado en cada una de las muestras corresponde al mismo fitopatógeno.

Respecto a la identificación a nivel de secuencia de ADN de "*Candidatus Phytoplasma trifolii*" como posible agente causal establece la necesidad de emitir una alerta fitosanitaria ya que algunos de los síntomas observados durante el presente trabajo en tomatillo (deformación foliar y conversión de estructuras florales en foliares), ya han sido reportados en la misma zona geográfica en el cultivo de chile (Mauricio-Castillo *et al.*, 2015) indicando que este fitopatógeno se está propagando no solo a nivel geográfico si no a nuevos hospederos de importancia económica.

Los reportes sobre la presencia de fitoplasmas relacionados con afectaciones en tomatillo se limitan solo a dos: el primero en Sinaloa, México en donde “*Candidatus Phytoplasma asteris*” generó una sintomatología caracterizada por deformación foliar, hoja pequeña y amarillamientos (Santos-Cervantes *et al.*, 2007), mientras que el segundo caso reportó la presencia de “*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*” asociado con deformación arrugamientos y enrollamientos foliares en plantas de tomatillo silvestres en Bolivia (Arocha *et al.*, 2007).

Cabe resaltar que la transmisión de los fitoplasmas se realiza mediante insectos chupadores que sirven como vectores que al alimentarse de plantas enfermas adquieren y posteriormente transmiten los patógenos a plantas sanas. A diferencia de otros microorganismos como los virus en los que un solo vector transmite a los miembros de un mismo género para el caso de los fitoplasmas existe una gran cantidad de vectores los cuales son específicos para cada grupo (Dickinson *et al.*, 2012) y es por eso que se tiene que identificar a nivel de grupo al fitoplasmas en cuestión para posteriormente relacionarlo con su vector y

así enfocar el control de la enfermedad en el manejo del insecto.

CONCLUSIONES

En el municipio de Morelos Zacatecas, se logró diagnosticar por técnicas moleculares, la presencia de fitoplasmas en el cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) en Zacatecas, identificando a nivel de secuencia de ADN a ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ como el posible agente causal de la sintomatología (amarillamiento, enanismo, deformación foliar y conversión de las estructuras florales en foliares) observada en esta hortaliza.

Con base en los resultados, se presenta el primer reporte sobre la presencia de “*Candidatus Phytoplasma trifolii*” afectando al cultivo de tomatillo en Zacatecas, México.

LITERATURA CITADA

- Adam, G., Kegler, H., 1994. Tomato spotted wilt virus and related tospoviruses. Archives of Phytopathology & Plant Protection 28, 483-504.
- Aguilar, C.L., 1993. Identificación de insectos plaga en el cultivo de tomate de cáscara *Physalis ixocarpa* Brot. en los municipios de Villa de Arista y Venado, SLP.
- Almeyda-León, I.H., Sánchez-Salas, J.A., Garzón-Tiznado, J.A., 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. Agricultura Técnica en México 34, 141-150.
- Arocha, Y., Antesana, O., Montellano, E., Franco, P., Plata, G., Jones, P., 2007. 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil'disease in Bolivia. International journal of systematic and evolutionary microbiology 57, 1704-1710.
- Arroyo Pozos, J., 1999. Fertilización en cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) con base en análisis de suelos.
- Bautista, N., Morales, O., 2000. Melanagromyza tomaterae Steyskal (Diptera: Agromyzidae) plaga del tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. Folia Entomol. Mex 110, 129-130.
- Butler, C.D., Gonzalez, B., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Novy, R.G., Miller, J.C., Trumble, J.T., 2011. Behavioral responses of adult potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioziidae), to potato germplasm and transmission of *Candidatus Liberibacter psyllae*. Crop Protection 30, 1233-1238.
- CABI. 2018, Cucurbit yellow stunting disorder virus. from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/17070>. consultado 18 de septiembre 2018.

- De la Torre-Almaráz, R., Valverde, R., Méndez-Lozano, J., Ascencio-Ibañez, J.T., Rivera-Bustamante, R.F., 2002. Caracterización preliminar de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en la región centro de México. *Agrociencia* 36.
- De la Torre-Almaráz, R., Salazar-Segura, M., Valverde, R.A., 2003. Etiología del moteado amarillo del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. *Agrociencia* 37.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter* 1, 19-21.
- Dickinson, M., Hodgetts, J., 2012. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Félix-Gastélum, R., Apodaca-Sánchez, M.Á., Martínez-Valenzuela, M.d.C., Espinosa-Matias, S., 2005. *Podosphaera* (Sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castagne) U. Brawn y N. Shishkoff en cucurbitáceas en el norte de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23.
- Garzón-Tiznado, J.A., Cárdenas-Valenzuela, O.G., Bujanos-Muñiz, R., Marín-Jarillo, A., Becerra-Flora, A., Velarde-Felix, S., Reyes-Moreno, C., González-Chavira, M., Martínez-Carrillo, J.L., 2009. Asociación de Hemiptera: Triozidae con la enfermedad permanente del tomate en México. *Agricultura técnica en México* 35, 61-72.
- González-Maldonado, M.B., García-Gutiérrez, C., 2012. Uso de biorracionales para el Control de Plagas de Hortalizas en el Norte de Sinaloa. *Universidad Autónoma Indígena de México*.
- Gundersen, D., Lee, I., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia mediterranea* 35, 144-151.

- Hernández-Deheza, M.G., 2013. Etiología del variegado del chile (*Capsicum annuum* L.) en Yurécuaro, Michoacán, Fitosanidad. Colegio de postgraduados, p. 86.
- Jimenez-Gómez, R., Dominguez-Rivero, R., Peña-Lomeli, A., 1992. Plagas insectiles del tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, Mexico. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo (Mexico).
- Jones, J., Jones, J., Miller, W., 1982. Fusarium wilt on tomato. Department Agriculture & Consumer Service, Division of plant Industry. Plant Pathology Circular.
- Lee, I., Gundersen, D., Davis, R., Bartoszyk, I., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International journal of systematic bacteriology 48, 1153–1169.
- Liefting, L., Perez-Egusquiza, Z., Clover, G., Anderson, J., 2008. A new 'Candidatus Liberibacter' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. Plant Disease 92, 1474-1474.
- Mauricio-Castillo, J.A., Salas-Muñoz, S., Velásquez-Valle, R., Ambríz-Granados, S., Reveles-Torres, L.R., 2015. 'Candidatus Phytoplasma trifolii'(16SrVI) en chile mirasol (*Capsicum annuum* L.) cultivado en Zacatecas, México. Revista Fitotecnia Mexicana 38, 389-396.
- Mendoza-Zamora, C., 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas.
- Morales-Galván, O., Bautista-Martínez, N., Valdez-Carrasco, J., Carrillo-Sánchez, J.L., 2002. Identificación, biología y descripción de *Melanagromyza tomaterae* Steyskal (Diptera: Agromyzidae), barrenador del tomate *Physalis ixocarpa* Brot. Acta zoológica mexicana, 145-153.
- Palacios-Torres, R.E., Romero-Napoles, J., Étienne, J., Carrillo-Sánchez, J.L., Valdez-Carrasco, J.M., Bravo-Mojica, H., Koch, S.D., López-Martínez, V., Terán-Vargas, A.P., 2008.

Identificación, distribución y plantas hospederas de diez especies de Agromyzidae (Insecta: Diptera), de interés agronómico en México. *Acta zoológica mexicana* 24, 07-32.

Palacios-Torres, R.E., Valdez-Carrasco, J.M., Etienne, J., Vega-Muñoz, R., Marin-Sanchez, J., Castañeda-Vildozola, Á., Nava-Díaz, C., 2010. Nuevos registros de plantas hospederas y distribución geográfica de *Melanagromyza floris* Spencer, *M. tomaterae* Steyskal, *M. viridis* (Frost) y *Ophiomyia lantanae* (Froggatt)(Diptera: Agromyzidae) en México. *Acta zoológica mexicana* 26, 59-71.

Peña-Lomelí, A., Ramirez-Perez, F., Cruz-Garza, R., 1991. Edad al trasplante de tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Chapingo, Mexico. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo (Mexico).

Peña-Lomelí, A., Molina-Galán, J., Cervantes-Santana, T., Márquez-Sánchez, F., Sahagún-Castellanos, J., Ortiz-Cereceres, J., 1998. Heterosis intervarietal en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 4, 31-37.

Pérez-Grajales, M., 1998. Mejoramiento genético de hortalizas. Mundi Prensa.

Pérez-Moreno, L., Rico-Jaramillo, E., Sánchez-Pale, J.R., Ascencio-Ibáñez, J.T., Díaz-Plaza, R., Rivera-Bustamante, R.F., 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22.

Ramírez-Loya, J., Saray-Meza, C., 1977. El Cultivo del Tomate de Cáscara en el Estado de Morelos.

Ramos, C., Alcántar, G., Galvis, A., Peña, A., Martínez, A., 2002. Eficiencia de uso del nitrógeno en tomate de cáscara en fertirriego. *Terra Latinoamericana* 20.

- Rivera-Martínez, R., Acosta-Guadarrama, A.D., Ramírez-Dávila, J.F., Figueroa-Figueroa, D.K., Maldonado-Zamora, F.I., Lara-Díaz, y.A.V., 2017. Distribución Espacial de las Poblaciones de Adultos de *Bactericera cockerelli* Sulc. en el Cultivo de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Southwestern Entomologist* 42, 1057-1068.
- SAGARPA. 2017, Crecen exportaciones internacionales de tomate verde "Hecho en México". from <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/crecen-exportaciones-internacionales-de-tomate-verde-hecho-en-mexico>. consultado 09/03/2018.
- Santos-Cervantes, M.E., Chávez-Medina, J., Fierro-Coronado, J., Ruelas-Ayala, R., Barreras-Soto, M., Méndez-Lozano, J., Leyva-López, N.E., 2007. First report of *Candidatus* 'Phytoplasma asteris' infecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) in Sinaloa, México. *Plant pathology* 56, 721-721.
- SIAP. 2017, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. from <https://www.gob.mx/siap>. consultado 22 de julio.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemuller, E., Kirkpatrick, C., 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and environmental microbiology* 62, 2988-2993.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D., Lelliott, R., Archer, S., 2009. *European handbook of plant diseases*. John Wiley & Sons.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra-Flora, A., Rivera-Bustamante, R.F., 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86, 1186-1192.
- Vargas, R., Ubillo, A., 2005. Susceptibilidad de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) a insecticidas en la zona central de Chile. *Agricultura técnica* 65, 437-441.

- Vega-Gutiérrez, M.T., Rodríguez-Maciel, J.C., Díaz-Gómez, O., Bujanos-Muñiz, R., Mota-Sánchez, D., Martínez-Carrillo, J.L., Lagunes-Tejeda, Á., Garzón-Tiznado, J.A., 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc)(Hemiptera: Triozidae). *Agrociencia* 42, 463-471.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E., 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59, 2582-2593.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E., 2013. The iPhyClassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in molecular biology* 938, 329-338.

REVISIÓN TÉCNICA

Dr. Rodolfo Velásquez Valle
INIFAP Zacatecas

Dr. Juan Manuel Pichardo González
Centro Nacional de Recursos Genéticos - INIFAP

Dr. Miguel Ángel Salas Luévano
Unidad Académica de Agronomía - UAZ

DISEÑO DE PORTADA

Dr. Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-11-02-11-09-92

COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Presidente: Dra. Raquel K. Cruz Bravo
Secretario: MC. Ricardo A. Sánchez Gutiérrez
Vocal: Dr. Luis R. Reveles Torres
Vocal: Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en noviembre de 2018 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.
Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

Este documento se encuentra en formato digital, mediante página internet en descargas ilimitadas

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
Dra.	Nadiezhdá Y. Ramírez Cabral	Agrometeorología y Modelaje
Ing.	José Israel Casas Flores	Agrometeorología y Modelaje
Dr.	Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Ing.	José Ángel Cid Ríos	Frijol y Garbanzo
MC.	Juan José Figueroa González*	Frijol y Garbanzo
MC.	Mayra Denise Herrera	Frijol y Garbanzo
Dr.	Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC	Valentín Melero Meraz	Frutales
Ing.	Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
MC.	Miguel Servin Palestina*	Ingeniería de Riego
Dra.	Raquel Cruz Bravo	Inocuidad de Alimentos
MC	Enrique Medina Martínez	Maíz
MC.	Francisco A. Rubio Aguirre	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Ramón Gutiérrez Luna	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Ing.	Ricardo A. Sánchez Gutiérrez	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Luis Roberto Reveles Torres	Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos
Dr.	Jaime Mena Covarrubias	Sanidad Forestal y Agrícola
Dr.	Rodolfo Velásquez Valle	Sanidad Forestal y Agrícola
Dra.	Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía

* Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias