



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



TERMOTERAPIA Y PRIMING PARA INACTIVAR VIRUS TRANSMITIDOS POR
SEMILLA EN TOMATE DE CÁSCARA

Por:

Elías Tovar Zamora

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero
Agrónomo Fitotecnista

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Mayo 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



TERMOTERAPIA Y PRIMING PARA INACTIVAR VIRUS TRANSMITIDOS POR
SEMILLA EN TOMATE DE CÁSCARA

Por:

Elías Tovar Zamora

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero
Agrónomo Fitotecnista

Dr. José Marín Sánchez

Asesor

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías

Co-Asesor

Dr. Pablo Delgado Sánchez

Co-Asesor

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Mayo, 2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

El trabajo titulado "**Termoterapia y priming para inactivar virus transmitidos por semilla en tomate de cáscara**" fue realizado por: "**Elías Tovar Zamora**" como requisito parcial para obtener el título de "**Ingeniero Agrónomo Fitotecnista**" y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Dr. José Marín Sánchez
Asesor

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías
Co-Asesor

Dr. Pablo Delgado Sánchez
Co-Asesor

Ejido de la Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez Romo
S.L.P. a 23 de mayo, 2013.

DEDICATORIA

A mi madre, Lucia Zamora Lugo y a mi padre, Bernabé Tovar Reyes: por darme la vida, sus cuidados, por la educación, por sus consejos y el apoyo.

A mi abuelos Maurilia Reyes Moreno, Juan Tovar Trigueros, Juana Lugo Soto, Benjamín Zamora López.

A mis hermanos: Cándido, Benjamín, Martina, Isaac, Silvestre, Víctor, María Guadalupe y Maura María de los Ángeles, a ellos, por sus consejos, por su compañía a lo largo de la vida, por el apoyo moral y económico necesario.

A mis cuñadas, Juana, Annel y Linda por su apoyo.

A mis primos: Nohemí, Ana, Cecilia, Ruth, Samuel, Rafael, Miriam, Gerardo, Susan, Berenice, por sus buenos consejos para conocer más sobre el ambiente académico y las puertas que el estudio abre.

A mis tíos y tías: Felipa, Petra, Juana, Anastasia, Seniorina, Joaquín, Celestino, Juan, Tomas, Gerardo, Benigno, Fidel, Idelfonso en San Luis Potosí, México, Veracruz e Hidalgo por el apoyo moral y económico a lo largo de la carrera.

A las personas: que en algún momento me han dado una lección vida ya sea compartiendo lo que tienen y lo que saben o permitiéndote un minuto de su tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero otorgado por el PROMEP (Clave del proyecto: PROMEP/103.5/11/3671), Denominado APOYO A LA INCORPORACIÓN DE NPTC.

A mi alma mater la Universidad Autónoma de San Luis Potosí especialmente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

Dr. José Marín Sánchez. Por el apoyo moral, la confianza que me otorgo, la buena disposición de su tiempo para atender mis dudas, el esfuerzo para realizar este trabajo y su atinado sentido para compartir sus conocimientos.

Dr. Pablo Delgado Sánchez. Por la buena disposición de su tiempo y el apoyo académico para realizar este trabajo.

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías. Por la buena disposición de su tiempo, por el apoyo académico para realizar este trabajo y sus buenos consejos como mi tutor durante la carrera.

Dr. Federico Villarreal Guerrero, por su valiosa contribución en la culminación de este trabajo de investigación.

Físico. José Correa Fabela. Por el apoyo académico, moral, por las técnicas de estudio y la buena disposición que ha tenido para escuchar.

Dr. Rabindranath Manuel Thompson Farfán por su apoyo académico durante la carrera.

Ing. Eliseo Alonso Zamora, por su apoyo laboral y sus buenos consejos.

MC. Miguel Ángel Tiscareño Iracheta. Por su apoyo moral y académico durante la carrera.

MC. Carlos Villar Morales. Por el apoyo moral y académico durante la carrera.

MC. Fabiola Villegas Rodríguez. Por el apoyo para realizar este trabajo.

MC. Rapucel Tonatzin Quetzalli Heinz Castro. Por el apoyo para realizar este trabajo.

Ing. Pedro Pérez, por el apoyo moral y sus buenos consejos durante la carrera.

Ing. Abnner Altamira Santiago. Por el apoyo durante la carrera.

A todos los compañeros de carrera y de facultad por el apoyo y permitirme compartir una etapa de la vida con ellos.

Al personal administrativo y de transporte.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Importancia del Tomate de Cáscara.....	3
Virus Fitopatógenos.....	3
Estructura de virus fitopatógenos.....	4
Mecanismos de transmisión de virus fitopatógenos.....	6
Transmisión mediante injerto.....	7
Transmisión por ácaros.....	7
Transmisión por nematodos.....	8
Transmisión por insectos.....	8
Transmisión por polen.....	10
Transmisión por semilla.....	10
Virus fitopatógenos en tomate de cáscara.....	11
Insectos vectores y diseminación de virus.....	14
Virus transmitidos por polen en tomate de cascara.....	15
Virus transmitidos por semilla en tomate de cascara.....	15
Alternativas para la eliminación de virus.....	15
Cultivo de meristemos.....	16
Tratamiento químico mediante antivirales.....	16

Termoterapia.....	18
Priming.....	19
Factores que afectan el priming.....	20
Duración del proceso de priming.....	20
Temperatura.....	20
Aireación.....	20
Luz.....	20
Potencial osmótico.....	20
Calidad de Semilla.....	21
Calidad genética.....	21
Calidad física.....	21
Calidad fisiológica.....	21
Calidad sanitaria.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Ubicación del Experimento.....	24
Material Genético.....	24
Desarrollo del Experimento.....	24
Primera fase: Termoterapia.....	24
Segunda fase: Priming.....	25
Tercer fase: Pruebas de calidad fisiológica y sanitaria.....	27
Pruebas de calidad sanitaria.....	28
Diseño Experimental.....	29
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cuadrados medios de las variables evaluadas en las pruebas de calidad fisiológica.....	30
2	Efecto promedio de los diferentes tratamientos relativos a la calidad fisiológica de la semilla de tomate de cáscara.....	31
3	Valores de absorbancia obtenidos mediante la prueba de detección de los virus AMV y CMV en plántulas de tomate de cáscara.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de las semillas de tomate sometidas a termoterapia.....	25
2	Priming en frascos.....	26
3	Secado de semillas después del priming.....	27
4	Pruebas de germinación.....	28
5	Semillas coloreadas después de la prueba del tetrazolio.....	28
6	Siembra de semillas en charolas para las pruebas sanitarias.....	29
7	Porcentaje de germinación.....	32
8	Porcentaje de plántulas anormales.....	33
9	Porcentaje de semillas latentes.....	34
10	Porcentaje de semillas muertas.....	35
11	Peso seco de plántula.....	35
12	Medias de absorbancia de CMV respecto al umbral calculado.....	37
13	Medias de absorbancia de AMV respecto al umbral calculado.....	38

RESUMEN

En el cultivo de tomate de cáscara las enfermedades virales representan el mayor problema a nivel nacional, tanto por el daño que causan, como por la dificultad que implica su control, cuyos daños son tan severos que llegan a causar pérdidas en la producción de hasta el 100%. Por lo cual, en esta investigación se aplicó termoterapia y priming sobre semillas de tomate de cáscara con los objetivos de inactivar los virus AMV y CMV transmitidos por esta vía y mejorar la calidad sanitaria y fisiológica. La termoterapia consistió en someter las semillas a 4 temperaturas: 50, 70, 90 y 120 °C durante dos períodos de tiempo: 45 y 60 minutos. Una vez concluida esta fase se procedió a la aplicación del priming, con el propósito de restaurar las semillas dañadas por las temperaturas a las cuales fueron sometidas. Esta técnica se realizó sumergiendo las semillas en una solución de nitrato de potasio a -20 atm durante 48 horas. Además se estableció un testigo absoluto, mismo que no recibió termoterapia y priming. Se evaluó la calidad fisiológica de acuerdo con las reglas de la ISTA y la calidad sanitaria por medio de la prueba DAS-ELISA. Los resultados obtenidos indican que la mejor calidad fisiológica con un porcentaje de germinación de 63.6667, se obtuvo al aplicar termoterapia a 50°C durante 45 minutos y priming a -20 atm durante 48 horas, el cual resultó libre del virus AMV, y positivo al CMV, mientras el testigo resultó positivo para ambos virus y con la menor calidad fisiológica.

SUMMARY

In the tomatillo crop, viral diseases represent the largest nationwide problem due to the damage they cause and the difficulty of control. Their damage is so severe to cause yield losses of up to 100% in some cases. In this research, priming thermotherapy was applied on seed of tomatillo with the objective of inactivating AMV and CMV virus transmitted and to improve the health and physiological quality of seeds. Thermotherapy consisted on treating the seeds to four temperatures: 50, 70, 90 and 120 °C, for two periods of time: 45 to 60 minutes. This stage was followed by the application of priming, with the purpose of restoring damaged seeds by the temperatures to which they were treated. This technique was carried out by immersing the seeds in a solution of potassium nitrate at -20 atm during 48 hours. An absolute control, which did not receive priming thermotherapy, was also established. Physiological quality of seeds was evaluated according to ISTA rules and sanitary quality through DAS-ELISA test. The results indicate that the best physiological quality with 63.6667 germination percentage, was obtained with thermotherapy at 50 °C, for 45 minutes and primed at -20 atm for 48 hours, which resulted AMV virus free, and positive CMV, while the witness was positive for both viruses and the lower physiological quality.

INTRODUCCIÓN

En México se siembran 512 000 ha con hortalizas, de las cuales 152 742 ha fueron sembradas con chile, 48 813 ha con tomate de cáscara y 53 780 ha con tomate rojo en el año 2012 (SIAP, 2012). En cultivos hortícolas, las enfermedades constituyen uno de los factores de mayor riesgo para su producción, de éstas, en los últimos años, las causadas por virus han ocasionado fuertes pérdidas económicas (Pérez *et al.*, 2004), mismas que varían año con año, en función de las condiciones climáticas, manejo del cultivo, control químico y cultural de insectos y malezas, lo cual ha alcanzado hasta el 100% de pérdidas en la producción (Vidales y Alcantar, 1989; INIFAP, 2004).

Las enfermedades virales en tomate de cáscara representan el mayor problema a nivel nacional en este cultivo tanto por el daño que causan, como por la dificultad que implica su control (PRODUCE, 2005; INIFAP, 2004, De la Torre *et al.*, 2002). Los síntomas más comunes son mosaicos de ligeros a severos, deformación o reducción de la lámina foliar, moteados amarillo y cálico, sobre brotación foliar, con reducción del tamaño de hojas y entrenudos, que ocasiona enanismo en la planta, epinastía media de hojas y diversos tipos de amarillamiento (De la Torre, 1996). Los virus que se han detectado en este cultivo son Cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV), Tobacco mosaic tobamovirus (virus mosaico del tabaco, TMV), Tobacco etch potyvirus (virus jaspeado del tabaco, TEV), Tomato spotted wilt tospovirus (virus de la marchitez manchada del tomate, TSWV), Tobacco ringspot nepovirus (virus de la mancha anular del tabaco, TRSV) y Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico del alfalfa, AMV) (De la Torre *et al.*, 2002). De estos virus el AMV y CMV se constituyen como los más importantes, debido a su transmisión por semilla (Marín, 2010).

El Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV), se transmite de manera mecánica (Hull, 2002), por áfidos y semilla en alfalfa (Zadjali *et al.*, 2002) y en chile habanero (Tun, 2006). Las plantas de tomate de cáscara infectadas con este patógeno muestran hojas con manchas cloróticas de color amarillo, por lo cual se le llama también mosaico cálico, además se observa aclaramiento de nervaduras, moteados cloróticos y acortamiento de entrenudos; en infecciones tempranas puede causar pérdida total (INIFAP, 2004).

En el caso del Cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV); transmitido por áfidos (Hull, 2002) y por semilla en frijol de cuerno (*Vigna unguiculata* L.) Guillaspie *et al.* (1998). En tomate de cáscara provoca achaparramiento, disminuye la producción en cantidad y calidad. Hojas jóvenes en proceso de desarrollo muestran moteado, se deforman, arrugan y sus bordes comienzan a enrollarse y se agrupan a manera de roseta. Las plantas se quedan enanas debido a que los entrenudos y pecíolos del tallo se acortan, forman pocas flores y frutos (INIFAP, 2004). Las enfermedades virales en plantas constituyen una de las principales causas de pérdidas en la agricultura, sobre todo cuando son transmitidos por semilla, cuyas pérdidas alcanzan valores de hasta el 100% en tomate de cáscara. La magnitud que alcanzan dichas pérdidas se debe en gran medida a la carencia de métodos eficaces para el control de virus fitopatógenos, (Flores, 2004). Dada la demanda de semilla de estos cultivos, es importante conocer los problemas inherentes a su producción; de manera general, se tiene el problema de emplear semilla de baja calidad sanitaria, incluso fisiológica.

Por lo anterior, es necesario inactivar los virus transmitidos por semilla en tomate de cáscara sin perder su calidad fisiológica; debido a que se constituye como la fuente primaria de diseminación y perpetuación de estos patógenos, que en combinación con la presencia de insectos vectores puede causar pérdida total de los cultivos, sobre todo porque en la actualidad ninguna empresa ofrece semilla libre de virus, aunado a que no se cuenta con variedades resistentes.

Objetivos

- 1.- Inactivar los virus AMV y CMV transmitidos por semilla en tomate de cáscara
- 2.- Mantener la calidad fisiológica de la semilla sometida a termoterapia

Hipótesis

- 1.- Mediante la termoterapia se inactivan los virus AMV y CMV transmitidos por semilla en tomate de cáscara.
- 2.- La termoterapia disminuye la calidad fisiológica de la semilla.
- 3.- Aplicar priming a semillas sometidas a termoterapia incrementa su calidad fisiológica.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del Tomate de Cáscara

En México, el tomate de cáscara se cultiva en 30 estados, entre los cuales destaca Sinaloa con una producción de 218,784.34 ton en un área de 11,052.71 ha y un rendimiento de 20.89 ton.ha⁻¹, seguido por, Jalisco y Zacatecas con 64,645.71 y 61,044.92 ton respectivamente. Durante el año 2010, el valor de la producción nacional de tomate de cáscara fue de 2, 532,464.29 pesos en una superficie sembrada de 48,475.17 ha con un rendimiento promedio de 15.58 ton.ha⁻¹ a nivel nacional (SIAP 2010).

Según estadísticas del SIAP (2010), San Luis Potosí está en el lugar número 20 de 30 estados de la república, que destacan por su producción de tomate de cáscara con una superficie sembrada de 539 ha y un rendimiento de 11.37 ton.ha⁻¹.

Virus Fitopatógenos

Los virus de las plantas difieren ampliamente de todos los demás fitopatógenos no solo en tamaño y forma, sino también en la sencillez de su constitución química y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y los síntomas que producen sobre el hospedero. Debido a su tamaño pequeño y a la transparencia de su partícula, los virus no pueden observarse ni detectarse mediante los métodos utilizados para otros patógenos (Agrios, 1996). Los virus no son celulares ni se encuentran constituidos por ellas, pero se propagan induciendo a la célula hospedera a que los multiplique utilizando su energía y su maquinaria biosintética. Debido a esto, el metabolismo de los organismos infectados se altera a tal grado que enferman. Los virus no matan a sus hospederos de forma directa. Sin embargo, desvían el metabolismo generando sustancias extrañas y alterando diversas funciones vitales e induciendo el desarrollo de síntomas. En las plantas, los síntomas pueden variar desde simples cambios de color hasta necrosis severa o muerte súbita de las plantas. En algunos otros casos los síntomas son casi imperceptibles como en el caso de los hospedantes asintomáticos (Sepúlveda, 2011).

En su novena versión la nómina oficial del Comité Internacional de Taxonomía de Virus - ICTV - alcanza a 2.285 especies virales, de las cuales 736 afectan plantas vasculares distribuyéndose en 75 géneros y 16 familias (Sepúlveda, 2011). La relación de los posibles patógenos virales de las hortícolas es bastante más amplia e incluyen representantes de más de 50 unidades taxonómicas (familias y géneros) (Conti *et al.*, 2000).

Estructura de virus fitopatógenos

Actualmente se tienen determinadas varias formas de virus fitopatógenos: (Conti *et al.*, 2000).

- a) Varillas rígidas, como el virus mosaico del tabaco y el virus Cascabeleo (Rattle) del Tabaco.
- b) Varilla (filiforme) flexible, como el virus X de la papa, virus de la tristeza de los cítricos, virus de la mancha anular de la papaya, virus del mosaico de la sandía y el virus jaspeado del tabaco.
- c) Baciliforme como el virus del mosaico de la Alfalfa.
- d) Baliforme, como el virus del mosaico del maíz.
- e) Poliédricos, como el virus del mosaico de la calabaza, Mosaico del Pepino entre otros.
- f) Gemelos (Geminivirus), como el virus del mosaico dorado del frijol, virus del mosaico estriado del maíz.

En su forma más simple, los virus constan de ácido nucleico y proteína, esta última forma una cubierta protectora llamada cápside en torno al primero. Aunque los virus pueden tener diferentes formas, tienen principalmente forma poliédrica o de varilla, o variantes de estas dos estructuras básicas. Hay siempre sólo RNA o sólo ADN y, en la mayoría un solo tipo de proteínas; sin embargo, algunos virus más grandes pueden tener varias, cada una de las cuales quizá con una función distinta. Aunque es evidente que cada virus produce su propia cubierta proteínica, la única función conocida de la proteína es servir como cubierta protectora del ácido nucleico, que por sí misma carece de infectividad, aunque su presencia en general aumenta la infectividad del ácido

nucleico (Agrios, 1996). El ácido nucleico de la mayoría de los virus que infectan a las plantas es RNA, pero se ha demostrado que existen cuando menos 25 virus cuyo ácido nucleico es DNA. Tanto el DNA como el RNA son largas moléculas en forma de cadena que constan de centenares o, con mayor frecuencia, de miles de unidades denominadas nucleótidos (Conti *et al.*, 2000).

El genoma es la parte infectante del virus, convencionalmente los ácidos nucleicos genómicos son considerados de sentido positivo (+) si están constituidos por moléculas infectantes, es decir pueden interactuar inmediatamente con los sistemas sintetizadores de la célula para ser replicados, o de sentido negativo (-), si están constituidos por moléculas complementarias no directamente infectantes, los cuales, para poder expresarse en la célula del huésped, deben ser antes transcritos a moléculas (+). En ambos casos, los ácidos nucleicos virales poseen en un extremo una molécula de azúcar (ribosa o desoxirribosa) con una grupo de -OH potencialmente libre sobre el átomo de carbono en posición «5» (terminación 5´) y una molécula análoga de azúcar en el otro extremo, con un grupo -OH potencialmente libre sobre el átomo de carbono en posición «3» (terminación 3´). Por lo tanto, las terminaciones 5´ y 3´ constituyen la extremidad inicial y terminal de la molécula genómica. Sobre ellas están frecuentemente insertas grupos particulares [proteína genómica (VPg), cofia metilguanósica (Cap), secuencia poliadenilica (Poly A), estructura tRNA-semejante] que completan y estabilizan la estructura. Entre las terminación 5´ y 3´ están comprendidas las «rejillas de lectura» [open Reading frames (ORF)] asimilables con los genes, cada una de las cuales codifica una proteína específica, a cuya producción esta está y cuyo número varia en relación con las dimensiones del genoma. Los genomas compuestos por una sola ORF se denominan monocistrónicos. Bicistrónicos o policistrónicos son, respectivamente, los genomas con más de dos ORF. Cuando todas las ORF están contenidas en una sola molécula de ácido nucleico, el genoma es monopartido y por el contrario se encuentran divididas entre dos o tres moléculas diferentes, el genoma se denomina respectivamente, bi o tripartido. (Conti *et al.*, 2000).

En los virus con genoma fraccionado, para que se produzca la infección, es necesaria la presencia simultánea en el interior de la célula del huésped de todos los fragmentos en los que esta subdividido. Las proteínas de origen viral tienen las funciones diferenciadas.

Algunas, llamadas estructurales, entran en la constitución de las partículas virales o viriones, de los que forman el involucro externo [proteína capsídica (CP)], otras denominadas proteínas no estructurales, desarrollan funciones importantes en la replicación [polimerasas o replicasas virales (POL), helicasas (HEL)], en la escisión proteolítica de los polipéptidos [varios tipos de proteasas (PRO)], en la difusión de virus en el interior del huésped [proteínas del movimiento (MP)] y en determinar la transmisibilidad de parte de los vectores [factores coadyuvantes (HF)] (Conti *et al.*, 2000).

Conti *et al.* (2000) mencionan que los taxones virales se pueden hacer en base a las principales características que les diferencian, como el ácido nucleico, presencia o ausencia de envoltente lipoproteína, fragmentación del genoma, morfología y dimensiones de las partículas.

Mecanismos de transmisión de virus fitopatógenos

Los virus que infectan a las plantas penetran en las células a través de heridas producidas mecánicamente o por ciertos vectores, o bien cuando un grano de polen infectado se deposita en un óvulo. Para que un virus infecte a una planta, primero debe pasar de una célula a otra y propagarse por la mayoría de las células (si no es que en todas) en las que se mueve (Agrios, 1996). Conti y colaboradores (2000), mencionan que los medios de difusión de los virus de los vegetales son los vectores, semillas, multiplicación de plantas infectadas y la transmisión por contacto.

Varios de los métodos de transmisión de los virus (como la propagación vegetativa y a través de las semillas) revisten gran importancia, principalmente por el hecho de que permiten que el virus sea transmitido de una generación de plantas a otra, pero carecen de importancia en la propagación del virus de las plantas enfermas a las plantas sanas de una misma generación (Agrios, 1996). Los virus son biotróficos – parásitos obligados – por lo que no se pueden desarrollar en materia orgánica muerta, requieren de tejido vivo para su multiplicación activa o simplemente para estar en reposo. Sin embargo, el Virus del mosaico del tabaco (TMV) corresponde a una de las pocas excepciones de la regla antes mencionada, debido a que puede sobrevivir en restos de tejidos infectados que

quedan en el campo, sirviendo de inóculo primario en el siguiente ciclo (Sepúlveda, 2011).

Al tratarse de parásitos obligados de plantas, los virus vegetales en condiciones naturales, se ven forzados cada cierto tiempo a pasar de una especie vegetal susceptible a otra para poder sobrevivir. Cuando hablamos de virus que infectan plantas anuales como el tomate, la frecuencia con que se ven forzados a transmitirse, aumenta si la comparamos con la de otros virus que infectan especies leñosas de larga vida. Varios son los mecanismos o formas de transmisión que utilizan estos agentes patógenos para lograr perpetuarse en los cultivos (Córdoba 2010).

Transmisión mediante injerto

Siempre que las plantas se propaguen vegetativamente mediante gemación o injerto, mediante esquejes o por el uso de tubérculos, connos, bulbos o rizomas, cualquier tipo de virus que haya en la planta madre, a partir de la cual dichos órganos de propagación que se obtienen casi siempre será transmitido a la progenie. La transmisión de los virus mediante propagación vegetativa no sólo hace que las nuevas plantas se enfermen, sino que en los casos de propagación mediante gemación o injerto, la presencia de un virus en la yema o el injerto puede resultar en una disminución apreciable en el éxito de las uniones del injerto o yema con el patrón (Agrios, 1996). El PepMV se transmite mediante propagación vegetativa a partir de tubérculos de patata infectados con el virus (Van der Vlugt, 2009).

Transmisión por ácaros

Se ha demostrado que los ácaros de la familia Eriophyidae transmiten nueve virus, incluyendo mosaico rayado del trigo, mosaico del durazno y a los virus del mosaico del higo. Estos ácaros tienen partes bucales perforadoras y succionadoras. La transmisión de los virus mediante ácaros de dicha familia parece ser bastante específica, debido a que cada uno de esos ácaros tiene un rango de hospederos limitado y a que es el único vector conocido del o los virus que transmiten. Algunos de los virus transmitidos por ácaros van en el estilete de estos últimos, mientras que otros son circulativos y, de estos últimos, por lo menos uno persiste a través de las mudas (Agrios 1996). La especie

Arceria tulipae de la familia Eriophyidae. es de los más dañinos, ya que no solo producen daños por su alimentación, sino que es capaz de transmitir virus y toxinas a las plantas (Anaya *et al.*, 1992).

Transmisión por nematodos

Aproximadamente veinte de los virus que infectan a las plantas son transmitidos por una o más especies de cuatro géneros de nematodos ectoparásitos que habitan en el suelo. Los nematodos de los géneros *Longidorus* y *Xiphinema* son los vectores de virus de forma poliédrica como los que producen las enfermedades de la mancha anular del tabaco, mancha anular del tomate, mancha anular de la frambuesa, anillo negro del tomate, enrollamiento foliar del cerezo, mosaico del bromo, hoja en abanico de la vid y otros, mientras que los nematodos del género *Trichodorus* y *Paratrichodorus* transmiten dos virus en forma de varilla, los virus sonajero del tabaco y del empardecimiento temprano del chícharo. Los nematodos vectores transmiten los virus cuando alimentan de las raíces de plantas infectadas y más tarde se desplazan hacia las raíces de plantas sanas. Tanto las larvas como los nematodos adultos pueden adquirir y transmitir los virus, pero éstos no pasan a través de las mudas de las larvas o los huevecillos y después de la muda, las larvas o los adultos resultantes deben alimentarse de una fuente del virus antes de que puedan transmitirlo (Agrios, 1996).

Transmisión por insectos

Los insectos son el grupo de vectores de virus vegetales más importantes. De las 381 especies de organismos con capacidad vectora, aproximadamente el 94% pertenece al Phylum Arthropoda, de los cuales el 99% son insectos y solo el 1% son ácaros (Harris, 1981).

Sin duda alguna, el método de transmisión de los virus más común y económicamente más importante en el campo es a través de insectos vectores. Sin embargo, los miembros de unos pocos grupos de insectos, pueden transmitir los virus que infectan a las plantas. El orden Homoptera, que incluye tanto a los áfidos (Aphidae) como a las chicharritas (Cicadellidae), moscas blancas (Aleuroididae), los piojos harinosos y las escamas (Coccoidae) y los periquitos (Membracidae). Contiene los

insectos vectores de virus más importantes. Unos cuantos de los insectos vectores de los virus que infectan a las plantas pertenecen a otros órdenes, tales como las chinches (Hemiptera), trips (Thysanoptera), escarabajos (Coleóptera) y saltamontes (Orthoptera) (Agrios 1996).

Los insectos con partes bucales succionadoras llevan los virus dentro de sus estiletes (virus no persistentes o portados por el estilete) o los acumulan dentro de su soma y, una vez que el virus ha pasado a través de los tejidos del insecto, introducen nuevamente al virus en las plantas a través de sus partes bucales (virus persistentes o circulativos). Algunos virus circulativos se propagan en sus vectores correspondientes y se les denomina virus propagativos. Los virus transmitidos por insectos con partes bucales masticadoras pueden también ser circulativos o viajar en las partes bucales del insecto (Agrios 1996).

Los áfidos son los vectores de virus fitopatógenos más importantes, y transmiten a la gran mayoría (alrededor de 170) de todos los virus portados en estilete. Como regla general, varias especies de áfidos transmiten al mismo virus portado en el estilete, de ahí que esas mismas especies transmitan a varios virus, pero en muchos casos la relación que se establece entre el virus y su vector es bastante específica. En general, los áfidos adquieren al virus portado en el estilete una vez que se alimentan de una planta enferma durante sólo unos cuantos segundos (30 o menos) y los transmiten cuando se desplazan hacia una planta sana y se alimentan de ella en un lapso de tiempo similar. El período en que los áfidos son virulíferos después de haber adquirido un virus portado en el estilete varía desde unos cuantos minutos hasta varias horas, después de lo cual ya no pueden transmitir al virus. Se dice que los virus portados en el estilete son transmitidos en forma no persistente ya que el fitopatógeno se localiza sobre la punta de esta estructura, de ahí que el insecto lo pierda cuando fricciona sus partes bucales en las células hospedantes; cabe mencionar que el virus no persiste a través de la muda o los huevecillos del insecto vector (Agrios, 1996).

Dentro de los insectos vectores de virus que, que normalmente afectan al tomate, se encuentran los áfidos [*Myzus persicae* (Sulzer)] y las mosquitas blancas blancas [*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)] (Loomans *et al.*, 2000). Varias especies de abejorros utilizados como polinizadores [*Bombus terrestris* L., *B. canariensis* y *B.*

impatiens (Cresson)] han mostrado ser dispersores del virus en el cultivo de tomate establecido en invernadero (Lacasa *et al.*, 2003; Shipp *et al.*, 2008).

Transmisión por polen

Los virus transmitidos por polen pueden infectar no sólo a las semillas, sino que pueden propagarse a través de la flor fecundada y descender hasta la planta madre, a la cual infectan cuando una planta está infectada, el virus tiene la capacidad de llegar a infectar el polen y cuando este es acarreado por el viento o por insectos, se transmite de una planta enferma a una sana. La transmisión por medio del polen está muy relacionada con la transmisión de virus por semilla (Sepúlveda, 2011).

Transmisión por semilla

Se han reportado casi un centenar de virus transmitidos por semillas; sin embargo, sólo una pequeña cantidad (del 1 al 30%) de las semillas que provienen de plantas infectadas por virus que lo transmiten, de ahí que la frecuencia de transmisión varíe según la relación que se establezca entre el virus y su hospedero. En unos cuantos casos, como en la soya, el virus puede ser transmitido por casi el 100% de las semillas de plantas infectadas, mientras que en otros cultivos, como el melón el virus mosaico de la calabaza puede ser transmitido por semilla en porcentajes que varían de un 28 hasta el 94% y el virus del mosaico de la calabaza del 50 al 100% en el virus del mosaico estriado de la cebada en esta misma planta (Agrios, 1996).

La transmisión por semilla constituye uno de los factores más importantes en el desarrollo epidémico de algunos virus, y dan origen a plántulas que representarán una fuente de inóculo inicial temprana, que además se encuentra uniformemente distribuido. De esta forma, las plántulas infectadas constituyen reservorios a partir de los cuales ocurre la dispersión secundaria del virus, lo cual sucede por transmisión mecánica o mediante vectores. Los virus asociados con las semillas son acarreados de dos formas: como una infección o como una infestación; la infección implica que el virus es llevado internamente, inmerso en los tejidos de la semilla y cuando el virus es llevado pasivamente se le conoce como infestación o contaminación. Esta forma de transmisión se conoce como transmisión vertical de virus (Sepúlveda, 2011).

La infección de las semillas juega un papel fundamental tanto en la transmisión como en la supervivencia de un importante número de enfermedades virales. La transmisión por semilla es un punto de partida idóneo para el establecimiento de una enfermedad en campo. Primero, permite que la infección se produzca en las etapas iniciales del desarrollo de la plántula, factor que será decisivo en la severidad que alcanzará la infección viral, y en segundo lugar, la infección de la semilla permitirá la aparición en campo, de plántulas infectadas distribuidas al azar, que constituirán reservorios del virus y focos de dispersión secundaria de la enfermedad bien sea de manera mecánica o por vectores (Córdoba, 2010).

Los virus pueden ser transmitidos hacia algunas plantas mediante inoculación mecánica, pero no todos pueden infectar y establecer una infección. En teoría, las partículas virales pueden ser introducidas a células vivas por este método, sin embargo, para que el virus llegue a ser funcional depende de una gran variedad de condiciones como: el grado de susceptibilidad de la célula receptora, funcionamiento del genoma viral dentro de la célula, condiciones necesarias para la maduración del virus, factores ambientales, etc. En general, la transmisión mecánica puede ocurrir de manera natural (campo) y de forma artificial (laboratorio); en campo, dicha transmisión puede efectuarse entre plantas próximas al rozarse con el viento, cuando las plantas son dañadas por el hombre en las labores de cultivo, como el caso del virus mosaico del tabaco (Sepúlveda, 2011).

Virus fitopatógenos en tomate de cáscara

La virosis constituye el principal factor que limita la producción del tomatillo, en la mayoría de las zonas productoras de México. La importancia de esta enfermedad se ha magnificado, porque los materiales de este cultivo son altamente susceptibles al complejo viral predominante (Apodaca *et al.*, 2008).

La enfermedad puede ser causada por diferentes virus, como lo son: tobacco etch potyvirus (virus jaspeado del tabaco, TEV), alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico del alfalfa, AMV), cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV), tobacco mosaic potyvirus (virus mosaico del tabaco, TMV) y tomato spotted Wilt tospovirus (virus de la marchitez manchada del tomate, TSWV), entre otros (De la Torre

et al., 2003). Estos agentes causales, también pueden afectar en mayor o menor grado, a otros cultivos importantes como lo son tomate, papa, chile, calabacita, pepino y sandía, entre otros. Las enfermedades causadas por virus constituyen un factor que limita la producción de tomate de cáscara, con pérdidas frecuentes hasta de 100%. Las plantas enfermas presentan mosaico, moteado, palidez, amarillamiento, achaparramiento y enchinamiento; también bronceado, quemaduras en las punta de las ramas, deformación de hojas y tallos; mientras los frutos pueden ser escasos y de menor tamaño, lo que depende de la etapa del cultivo al momento de la infección (Apodaca *et al.*, 2008).

De la Torre *et al.* (1998) aislaron y caracterizaron varios virus en plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) 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).

De los virus mencionados anteriormente, los más importantes en tomate de cascara son los siguientes:

Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV). Pertenece al género Alfamovirus, familia Bromoviridae, posee partículas basiliformes, multipartito. Se transmite de manera mecánica (Hull, 2002) y también de manera no persistente por más de 15 especies de áfidos, así como por semilla en alfalfa (Zadjali *et al.*, 2002) y chile habanero (Tun, 2006). Las plantas de tomate de cáscara infectadas con este patógeno muestran hojas con manchas cloróticas de color amarillo, por lo cual se le llama también mosaico cálico, además se observa aclaramiento de nervaduras, moteados cloróticos y acortamiento de entrenudos. En infecciones tempranas puede causar pérdida total (INIFAP, 2004).

Cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV). De la familia Bromoviridae, género Cucumovirus, son virus de partículas isométricas de alrededor de 30 nm de diámetro, transmitidos por áfidos de manera no persistente (Hull, 2002) y según Guillaspie *et al.* (1998) por semilla en frijol de cuerno (*Vigna unguiculata* L.). En tomate de cáscara se transmite a través de semilla (Marín, 2010), provoca

achaparramiento, disminuye la producción en cantidad y calidad. Cuatro o cinco días después de haberse producido la inoculación, las hojas jóvenes en proceso de desarrollo muestran moteado, se deforman, arrugan y sus bordes comienzan a enrollarse. Todo crecimiento posterior disminuye drásticamente y las plantas se quedan enanas debido a que los entrenudos y pecíolos del tallo se acortan. Estas plantas forman pocas flores y frutos, su aspecto es de racimo o arbusto y sus hojas se agrupan a manera de roseta (INIFAP, 2004).

Tobacco mosaic tobamovirus (virus mosaico del tabaco, TMV). Perteneció al género Tobamovirus, la partícula viral tiene forma de varilla rígida de 300-310 nm de longitud y 18 nm de diámetro (Hull, 2002), se transmite por medios mecánicos (Agrios, 1989). Los síntomas inducidos en tomate de cáscara consisten en un moteado clorótico en las hojas senescentes y un moteado con o sin malformación de los folíolos. Las infecciones de las plantas jóvenes inhiben la formación de los frutos y en ocasiones se producen manchas cloróticas (INIFAP, 2004).

Tobacco etch potyvirus (virus jaspeado del tabaco, TEV). Perteneció al género Potyvirus, familia Potyviridae. Las partículas virales tienen forma de varilla flexible con 680-900 nm de longitud y 11-13 nm de diámetro. Es un virus que se transmite mecánicamente y por áfidos de manera no persistente (Hull, 2002), pero no por semilla (Fauquet *et al.*, 2005). Los síntomas aparecen en tomate de cáscara como un moteado clorótico y rugosidad de las hojas. Las plántulas infectadas tienen muy poco crecimiento y el fruto no alcanza el tamaño comercial. Hay una alta correlación entre la edad de la planta en que es infectada y el número y tamaño de los frutos producidos; a infecciones tempranas, menor rendimiento (INIFAP, 2004).

Tomato spotted wilt tospovirus (virus de la marchitez manchada del tomate, TSWV). Este virus, del género Tospovirus, se clasifica dentro de la familia Bunyaviridae, la partícula viral es de forma esférica con envoltura y es transmitido por medio de trips de manera circulativa propagativa (Hull, 2002). En las hojas de tomate de cáscara causan bronceado y crecimiento unilateral; posteriormente el follaje se torna clorótico, aparece una atrofia y severa necrosis (INIFAP, 2004).

Insectos vectores y diseminación de virus

La mayoría de los virus fitopatógenos son transmitidos de planta en planta por agentes vectores: insectos (pulgones, mosquitas blancas, trips), nematodos, ácaros y hongos. Estos agentes vectores son capaces de provocar heridas que hacen posible la diseminación horizontal de los virus fitopatógenos (Sepúlveda, 2011). Los áfidos se consideran como el grupo de insectos fitófagos más importantes de las hortalizas de las zonas templadas. Ocasionan daños de manera directa cuando succionan la savia e indirecta cuando transmiten enfermedades de origen viral. De este grupo, *M. persicae* es la más eficiente y polífaga en la transmisión de virus (Peña y Bujanos, 1992).

Los Begomovirus, también conocidos como geminivirus, comprenden una numerosa y diversa familia (Geminiviridae) de virus fitopatógenos considerados como emergentes, pues su incidencia y distribución mundial ha aumentado considerablemente en la última década. Su vector natural corresponde a, *Bemisia tabaci*; la cual, debido a su polifagia y elevadas potencialidades multiplicativas, hacen que se le considere como el principal agente de dispersión de Begomovirus (Sepúlveda *et al.*, 2011).

En un estudio llevado a cabo en México, se identificó al agente causal de los síntomas de la enfermedad (moteado y mosaico amarillo, deformación foliar, clorosis y marchitez) en el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*): un virus del tipo ARN (*Bromoviridae*), transmitido a una amplia gama de hospedantes en forma mecánica y por su insecto vector, el áfido *Myzus persicae*. Análisis con microscopio electrónico de extractos de tejidos de plantas infectadas mostraron partículas virales de tipo baciliforme de diferente tamaño y una del tipo icosaédrico y pruebas serológicas indicaron que el agente causal de la enfermedad es una variante del virus mosaico de la alfalfa (Alfamovirus, AMV). La colecta e identificación de las especies de áfidos asociados con las plantas de *Physalis ixocarpa* y malezas adyacentes, indicaron el predominio de poblaciones de *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. Así, estas especies de pulgones pudieran también ser vectores naturales del virus mosaico de la alfalfa en tomate de cáscara (De la Torre *et al.*, 2003).

Virus transmitidos por polen en tomate de cáscara

Alfalfa mosaic Alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV). Se transmite por polen, (Kado y Agrawal, 1972 y Johansen *et al.*, 1994) y puede causar pérdida total de la cosecha en tomate de cáscara (INIFAP, 2004; PRODUCE, 2005).

Virus transmitidos por semilla en tomate de cáscara

El Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) presenta varias cepas, las más conocidos son: A-CMV, E-CMV, L-CMV, N-CMV, P-CMV, Z-CMV y WAI / Waii. Es transmitido por semilla en tomate de cáscara y en otras en 19 especies (Marín, 2010; Brunt *et al.*, 1996). Otro virus que afecta tomate de cáscara y se transmite por semilla es el Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV) (Marín, 2010) y ha causado en numerosas ocasiones pérdida total de la cosecha en tomate de cáscara (INIFAP, 2004; PRODUCE, 2005).

Tobacco mosaic tobamovirus (TMV). Se transmite por injerto; por contacto entre las plantas; por semilla (ocasionalmente transmitida a través de la testa, pero no a través del embrión); no por polen (Brunt *et al.*, 1996).

Alternativas para la Eliminación de Virus

El tratamiento de semillas es la aplicación de técnicas y agentes biológicos, físicos y químicos que proveen a la semilla y a la planta protección frente al ataque de insectos y enfermedades transmitidas por esta vía. De acuerdo con la FIS (Federación Internacional de Semillas), un buen tratamiento debe de considerar los siguientes aspectos (IFS, 2007): Seguridad, amplio espectro, eficacia y ser económico (IFIS, 2007).

La producción de plántulas mediante cultivo in vitro de diversas especies se ha incrementado; como la malanga (*Xanthosoma sagittifolia* Schott). Estas plantas son utilizadas en programas de fomento de semillas, por tanto son caracterizadas genética y fitosanitariamente para evitar la diseminación de patógenos mediante la micropropagación. Uno de los problemas fitosanitarios más importantes de la malanga es el virus Dasheen mosaic virus (DMV), el cual puede tener una incidencia de hasta 95% en plantaciones, y disminuye drásticamente la producción esta arácea. Igarza *et al.* (2001) evaluaron la electroterapia como una alternativa para la desinfección del virus en

plantas de malanga del clon México 8; Los tratamientos fueron 5, 10 y 20 V durante 5 min. El mejor tratamiento fue aplicar 5 V durante 5 min, al lograr desinfección del 100% de las plantas, siendo diferente significativamente a los demás tratamientos. Además este tratamiento aceleró el crecimiento del material vegetativo.

Cultivo de meristemas

El meristema es el punto activo de crecimiento del ápice de la planta, una zona pequeña compuesta de células (meristemáticas) dividiéndose rápidamente. Patógenos vegetales como los virus, pueden ser transmitidos a partir de plantas enfermas. Sin embargo, no todas las células resultan infectadas; los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de patógenos por lo que es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo de meristemas *in vitro*, y lograr su crecimiento como plantas sanas. Aunque los meristemas apicales son a menudo libres de virus, algunos de estos fitopatógenos invaden la región meristemática de los ápices en crecimiento, como ocurre con el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la papa (PXV) (Mori, 1977 citado por Panta y Golmirzaie, S/F) y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Walkey y Cooper, 1972 citado por Panta y Golmirzaie, S/F).

Tratamiento químico mediante antivirales

Livingston y Toussaint *et al.* citados por Parmessur y Saumtally (2001) y (Parmessur, *et al.*, 2002), afirman que se ha reportado el uso de agentes antivirales para la eliminación de algunos virus; estos compuestos fueron inicialmente utilizados en humanos y animales pero dado su amplio espectro se emplearon también para eliminar virus en plantas. Estos dos últimos autores realizaron ensayos en busca de la eliminación de virus mediante el uso del viricida ribavirin en dosis de 10 – 75 mg/l en las variedades de caña de azúcar D 1135, M 13/18, M 168/33 y MB 09/72. El agente antiviral puede ser incluido en el medio de cultivo para la obtención de vitroplantas, aunque los resultados no fueron del todo efectivos.

Ribavirín es un nucleósido sintético estructuralmente relacionado con pyrazofurina (pyrazomycycin) guanosina y xantosina que tiene actividad antiviral contra virus tanto de ADN como de ARN y aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente

elucidado, parece inhibir la síntesis de ADN y ARN y consecuentemente la síntesis de proteínas y la replicación viral. Comercialmente es vendido con los nombres de Virazole, Rebetol y Copegus (AIDSinfo, 2004).

En la actualidad, una alternativa ante la falta de fuentes de resistencia genética puede ser la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR), el cual es un mecanismo que activa la expresión de proteínas de resistencia (PR protein) mediante el uso de moléculas elicitoras que generan este tipo de respuestas en las células vegetales (Gozzo, 2004; Momol *et al.*, 2004). Recientemente se han registrado trabajos en banano, tomate y arroz, en los que han empleado agentes inductores de SAR, entre los que se encuentra el ácido salicílico, Acibenzolar-S-Methyl (Pradhanang *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2001), β -aminobutyric acid (BABA), sacarina; entre otras moléculas (Gozzo, 2004; Momol *et al.*, 2004).

Para el efecto se planteó la extracción de meristemos, la inducción de callos embriogénicos y la utilización de Ribavirín (Virazole) (30 mg.l⁻¹), el cual tiene actividad antiviral; así como el uso del ácido salicílico, AS (100 μ M), que actúa como elicitor en las respuestas de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Adicionalmente a los tratamientos in vitro, se utilizaron los controles de termoterapia (41°C, 15 días) y agua caliente (51°C, 1 hora). Se registraron las variables de número de brotes por explante, fenolización y presencia o ausencia del virus. El diagnóstico viral se lo efectuó mediante la técnica inmunoenzimática Tissue Blot Immunoassay (TBIA). Los explantes sometidos a la inducción de callos embriogénicos mostró el menor grado de fenolización (0.32) comparado a los obtenidos en los meristemos (1.93); mientras que no hubo diferencias significativas en cuanto al número de brotes por explante. La menor incidencia del virus fue observada en las plantas tratadas con el inductor AS y en los explantes sometidos a la inducción de callos embriogénicos (5.0%); no obstante, presentaron el mismo nivel de significancia con la extracción de meristemos y la aplicación de Virazole, (6.7%); mientras que los tratamientos sometidos a termoterapia y agua caliente mostraron los niveles más altos de incidencia (86.7 y 90.0%) (Burbano y Garcés, 2007).

El funcionamiento del ácido salicílico (AS) como activador de las defensas de plantas contra hongos, virus, bacterias, nematodos e insectos es relativamente sencillo

Cuando una planta es atacada por una enfermedad o plaga, ella genera AS para advertirle al resto de la planta que está siendo afectada y que incremente sus defensas. La desventaja del AS se debe a que su persistencia dentro de la planta es muy corta, siendo inmovilizada en las paredes celulares, por lo cual se vuelve necesaria la aplicación rutinaria durante toda la vida del cultivo para poder mantener altos niveles de resistencia. La ventaja de su fijación rápida es que si se sobre dosifica, el daño no es permanente y se repone rápidamente en 7 a 10 días máximo (EDA., 2008).

Termoterapia

La aplicación de calor suele presentar más problemas que la de los productos químicos, ya que se basa en someter a las semillas a temperaturas capaces de matar al patógeno sin dañar la viabilidad de aquéllas, lo que suele ser bastante problemático. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, el calor seco tiene una amplia y satisfactoria aplicación práctica en el manejo de virus; por ejemplo la transmisión por semilla del virus mosaico del tomate (TMV), se puede inactivar manteniendo éstas durante 24 horas en estufa a 80°C; si las semillas son de buena calidad, la reducción en el poder germinativo no sobrepasa el 10% (Ortega, 1991).

Otra de las alternativas para inactivar virus fitopatógenos es aplicar temperaturas elevadas sobre las plantas, por ejemplo, para iniciar un tratamiento de termoterapia en caña de azúcar se requiere inicialmente obtener yemas de tallos de plantas con una edad de 8 a 10 meses de edad. Se corta una porción de aproximadamente 3.5 cm de largo con poca cantidad de tejido del tallo, que protege a la yema. Posteriormente, las yemas se someten a un pre-tratamiento colocándolas en agua caliente a una temperatura de 50° C por diez minutos, se dejan reposar durante un lapso de 8 – 12 horas y finalmente son tratadas en agua caliente a 51° C por una hora (Castillo *et al.*, 2003). La termoterapia aplicada en plantas, al igual que en tubérculos brotados, seguida por cultivo de meristemas, ha sido exitosamente utilizada para la eliminación de muchos virus de y papa (Stace-Smith y Mellor, 1970; Pennazio y Redolfi, 1973, Citados por Panta y Golmirzaie, S/F).

Otra de las alternativas para la obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas es la aplicación de calor (termoterapia) (Castillo *et al.*, 2003). En este sistema la semilla

es sometida a una incubadora que le proporciona una temperatura que supera el punto de inactivación térmica de los virus en mención (Diplomado en Protección de plantas (2003, Guayaquil, Ec. citado por Castillo 2003).

Priming

El priming es un método que consiste en la inmersión de la semilla en una solución de concentración determinada por un período dado; hidratada la semilla, se activa su metabolismo en forma controlada, de tal manera que durante el tratamiento la germinación no ocurre (Bradford *et al.*, 1990). Ésta técnica se ha reportado como un método eficaz para mejorar la calidad fisiológica de la semilla a través de la uniformidad y porcentaje de germinación. El grado de hidratación de la semilla se controla por medio del equilibrio osmótico que se presenta entre el potencial hídrico de la solución y el interior de la semilla (Akers y Kevin, 1986), en esta condición, la semilla se mantiene en un estado germinativo avanzado durante el período de osmoacondicionamiento. Como resultado, las semillas con germinación “lenta” tienden a alcanzar a las “rápidas”, por lo que cuando las semillas osmoacondicionadas se siembran en campo germinan con mayor rapidez y uniformidad que las no tratadas. Este efecto es más evidente cuando se presentan condiciones adversas (Bradford, 1986).

El priming, acondicionamiento osmótico de semillas u osmoacondicionamiento, es considerado una técnica promisoriosa para mejorar la germinación porque promueve un rápido y sincronizado establecimiento de plántulas (Marín *et al.*, 2007a). Tetepa (1997) acondicionó semillas de tomate de cáscara con polietilen glicol 200 a cinco potenciales osmóticos: 0, -5, -10, -15 y -20 atm durante cinco períodos: 0, 8, 16, 24 y 32 h. En los tratamientos de 0 y -5 atm durante 24 y 32 h observó 81% de germinación, lo que superó significativamente al testigo.

Marín *et al.* (2007) Utilizaron la técnica de priming en semilla de tomate de cáscara con el objetivo de incrementar su calidad fisiológica, así como conocer el efecto y la persistencia del acondicionamiento osmótico con tres agentes (PEG 8000, KCl y KNO₃) en tres concentraciones (-5, -15 y -20 atm) durante cuatro períodos de tratamiento (24, 48, 72 y 96 h) y cinco de almacenamiento posterior (0, 7, 90 y 180 días). Los resultados obtenidos indican que el priming con KCl a -15 atm durante 48 h o con KNO₃ a -20 atm

durante 48 h, mejoraron la calidad fisiológica de la semilla de tomate de cáscara cv. Rendidora, efecto que persistió hasta por 180 días después del tratamiento (Marín *et al.*, 2007).

Factores que afectan el priming

Duración del proceso de priming.- Los efectos benéficos del priming dependen del soluto, potencial osmótico, temperatura y duración del proceso (Bittencourt *et al.*, 2004). El tiempo ideal del proceso varía de acuerdo al agente acondicionante, potencial osmótico de la solución, temperatura durante el tratamiento y el material genético. Si la protusión de la radícula ocurre durante el priming, el daño al embrión es irreversible y puede suponerse que es durante la deshidratación después del tratamiento (Cantliffe, 1981). Algunas especies pueden necesitar de solo unas cuantas horas de priming para obtener resultados benéficos, tal es el caso de semillas de lechuga (Parera y Cantliffe, 1994).

Temperatura.- La temperatura durante el tratamiento y el potencial osmótico de la solución afecta la duración del periodo de absorción. Si la temperatura se mantiene por debajo del rango óptimo para mejorar la germinación, el crecimiento de la radícula durante el priming puede afectarse (Parera y Cantliffe, 1994).

Aireación.- La aireación apropiada en la solución permite mantener viva a la semilla y ayuda a sincronizar la germinación, respuesta que varía de acuerdo a la especie (Welbaum *et al.*, 1998). Semillas tratadas con soluciones salinas aireadas promueven una germinación rápida en melón y mejora el desarrollo posterior de las plántulas. (Parera y Cantliffe, 1994).

Luz.- Los efectos benéficos de semilla sometida a priming pueden ser modificados debido a la calidad de la luz durante el tratamiento. Parera y Cantliffe (1994) indican que bajos niveles de luz de lámparas incandescentes y fluorescentes durante el priming, no afectaron la germinación de semilla de lechuga.

Potencial osmótico.- El potencial de la solución utilizada durante el tratamiento es un factor que influye sobre los resultados obtenidos (Trigo *et al.*, 1999). El priming con soluciones de altos potenciales puede permitir una rápida germinación de las semillas debido a que esta condición causa una diferencia de potenciales entre el exterior y el

interior, necesaria para que se favorezca la entrada de agua a la semilla y por lo tanto este gradiente afecta la cinética de imbibición (Parera y Cantliffe, 1994).

Calidad de Semilla

Son todas las características inherentes sobresalientes que determinan la variedad (Hampton, 2002).

Calidad genética: Es el resultado del trabajo de fitomejoramiento y le confiere un valor agronómico a la variedad que se expresa en mayor rendimiento, mayor resistencia a plagas y enfermedades, mayor uniformidad, mayor rango de adaptación, calidad específica en sus productos, etc., los atributos rescatados o incorporados a una variedad a través de su mejoramiento genético representan características codificadas por sus genes y, por lo tanto, transmisibles de una generación a otra. El componente genético en semillas se evalúa mediante pruebas de crecimiento en invernadero y campo, y mediante examen de características físicas y químicas (Flores, 2004).

Calidad física.- Se refiere a las características físicas de las semillas que son consideradas como factores de calidad, tales como: contenido de humedad, su peso por volumen, pureza y peso de mil semillas (Basra, 1995).

Calidad fisiológica.- Se refiere a la viabilidad de las semillas o al potencial que éstas tienen para la germinación, incluyendo el vigor; como resultado de la expresión de factores propios del genoma de la variedad (Basra, 1995). Durante la formación de la semilla el contenido de humedad se reduce y la germinabilidad aumenta, comportamiento denominado como adquisición de tolerancia al secado. Según Kermode (1995), el secado de semillas durante su desarrollo actúa como una señal que activa su capacidad germinativa. Corbineau *et al.* (2000) señalan que las semillas inmaduras pueden tolerar mejor la deshidratación con aire del ambiente porque la pérdida de agua es más lenta que con aire caliente, de modo que ocurre menor daño a la integridad celular, o porque favorece los mecanismos de reparación de los daños estructurales asociados con la desecación.

En tomate de cáscara el secado eleva la capacidad germinativa de las semillas, tanto inmaduras como maduras, cualquiera que sea su etapa de desarrollo. Por lo tanto, es posible realizar la cosecha de las semillas de tomate de cáscara, a partir de los 42 d

después de la floración y con secado alcanza una germinación $> 90 \%$ y los contenidos de sacarosa y rafinosa aumentan con la edad de la semilla. Sin embargo, el secado afecta negativamente el vigor de la semilla (Pérez *et al.*, 2008). De hecho, en la mayoría de las semillas ortodoxas, la acumulación inicial de sacarosa y rafinosa coincide con la fase en la cual el embrión adquiere tolerancia a la desecación, razón por la cual Cochrane (2000) postuló que estos azúcares hacen posible que el embrión sea viable a muy bajos potenciales hídricos.

A nivel molecular, la cristalización de sacarosa durante el secado permite la formación de un estado vítreo que contribuye a proteger la integridad de la membrana, porque los grupos hidroxilos de los azúcares sustituyen al agua y estabilizan los lípidos de la membrana (Koster *et al.*, 1994; Cochrane, 2000). Además, la sacarosa y la rafinosa se hallan en concentraciones altas en los tejidos seminales involucrados en el proceso de germinación, por lo que se considera que contribuyen a la germinación de las semillas como combustibles del metabolismo inicial que induce la respiración y el alargamiento del eje embrionario (Kigel y Galili, 1995; Yordanov *et al.*, 2003). Se puede inferir entonces, que la acumulación paulatina de estos dos azúcares solubles durante el desarrollo de la semilla de tomate de cáscara, estabiliza los lípidos de membrana y mejora el desarrollo del embrión durante la germinación (Pérez *et al.*, 2008).

Indudablemente, las condiciones de producción en el campo referidas principalmente al medio ambiente y factores agronómicos utilizados afectan directamente al proceso de formación y desarrollo de la semilla, y por consecuencia su potencialidad fisiológica cuando es sembrada. De aquí la importancia de considerar un cultivo destinado a la producción de semillas con requisitos y cuidados diferentes a un cultivo destinado a la producción de fruto, raíz, tallo, grano, etc. (Flores, 2004).

Las pruebas utilizadas para evaluar al componente fisiológico en semillas son:

- a) Germinación estándar: es el porcentaje de plántulas normales en el laboratorio e indica al potencial de un lote de semillas para establecer plántulas en condiciones favorables de campo (Flores, 2004).
- b) Viabilidad: capacidad de la semilla para germinar y producir plantas normales. Se utiliza normalmente para su determinación las sales de tetrazolium, que tienen la

característica de reaccionar con el tejido vivo (metabolismo activo) de la semilla (Flores, 2004).

- c) Vigor: emergencia y establecimiento en campo bajo condiciones desfavorables. Se pretende, mediante pruebas de vigor, medir el potencial de desarrollo y crecimiento de lotes de semillas en condiciones estándar de estrés recomendadas al cultivo; entre estas pruebas se tiene la prueba fría, de envejecimiento acelerado y otras, las que en ciertos casos estiman también el potencial de almacenamiento de semillas (Flores, 2004).

Calidad sanitaria.- Condición de la semilla con relación a la presencia de microorganismos patógenos (hongos, bacterias, nematodos, virus), los cuales pueden acompañar a la semilla (masas de esporas, cornezuelo en cereales), asociados a la superficie de la misma o portados internamente. Las condiciones de producción en campo influyen en la sanidad de la semilla, por lo cual el control sobre la elección de la región de producción y medidas preventivas contra el ataque de plagas y enfermedades debe verificarse desde el inicio de la producción (Flores, 2004).

La calidad sanitaria se refiere a la ausencia de microorganismos patógenos que se transmiten por la propia semilla (Basra, 1995). Además, la semilla de buena calidad tiene las siguientes características: es genéticamente fiel a la especie o cultivar; capaz de un porcentaje elevado de germinación; está libre de insectos, patógenos y de mezclas con semillas de otros cultivos, semillas de malezas y de material inerte y extraño (Hartmann y Kester, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Parasitología e invernaderos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ubicada en el Ejido de la Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P., en el Km. 14.5 de la carretera San Luis Potosí – Matehuala a 100°56' de longitud oeste y 22°11' de latitud norte, con una altura de 1,850 metros sobre el nivel del mar.

Material Genético

Para el desarrollo del experimento, se empleó semilla de tomate de cáscara variedad CHF₃, infectada con los virus AMV y CMV, producida en invernadero e hidroponía y cosechada en el año 2007, misma que se mantuvo conservada en refrigeración a -4°C.

Desarrollo del Experimento

Esta investigación se realizó en tres fases; la primera consistió en aplicar termoterapia a las semillas de tomate de cáscara con el propósito de inactivar los virus AMV y CMV; en la segunda, se utilizó la técnica priming para regenerar las estructuras que fueron dañadas por las elevadas temperaturas utilizadas durante la primer fase. Al finalizar éstas, se procedió a realizar las pruebas de calidad fisiológica y sanitaria para determinar los porcentajes de germinación y detección de virus en plántula, lo cual constituyó la tercera fase.

Primer fase: Termoterapia

La termoterapia consistió en someter las semillas de tomate de cáscara a cuatro temperaturas (50°C, 70°C, 90°C y 120°C) durante dos períodos (45 y 60 min) en un horno de secado Felisa®, para conformar 8 tratamientos de 400 semillas cada uno (ISTA, 2004). Los grupos de semillas fueron colocados en el interior de sobres e introducidos a la estufa para recibir los tratamientos correspondientes durante los períodos señalados (Figura 1).

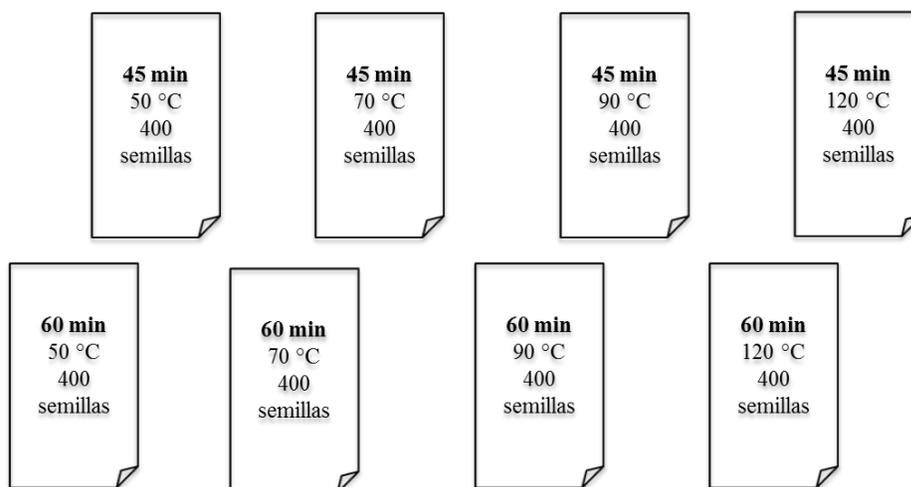


Figura: 1. Esquema de las semillas de tomate sometidas a termoterapia.

Una vez finalizada la termoterapia, las semillas así tratadas se conservaron durante 96 horas en refrigeración a -2 °C, para continuar con la segunda fase.

Segunda fase: Priming

Posterior a la termoterapia, se aplicó priming, el cual consistió en sumergir 200 semillas de cada uno de los 8 tratamientos anteriores en soluciones de KNO_3 a -20 atm de presión durante 48 horas y las otras 200 semillas en agua destilada (Marín *et al.*, 2007), en frascos de 25 ml, empleando una bomba de aire para oxigenar las semillas y mantenerlas vivas (Welbaum *et al.*, 1998). Al término del tiempo, se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos del agente utilizados durante el tratamiento. Al conjuntar las dos primeras fases, se conformaron 16 tratamientos, al considerar cuatro temperaturas de termoterapia durante dos períodos, más priming con KNO_3 y Agua destilada ($4 \times 2 \times 2 = 16$). Además se incluyó un testigo absoluto, el cual no recibió termoterapia y priming.

Para preparar las soluciones de priming se utilizó agua destilada para disolver el KNO_3 requerido para obtener el potencial osmótico de -20 atm; el cual fue calculado de acuerdo con la ecuación propuesta por Wiggans y Gardner (1959):

$$G = (P V m) / (R T)$$

Donde:

G= Gramos de soluto a utilizar

P= Presión osmótica deseada (atm)

V= Volumen en litros

m= Peso molecular del soluto

R= Constante igual a $0.0825 \text{ atm } 1 \text{ mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$

T= Temperatura a la que se prepara la solución ($^\circ\text{K}$).

En esta investigación fueron requeridos 28.6 gramos de KNO_3 , pesados en una balanza analítica y disueltos en un matraz que contenía con 0.5 L de agua destilada, posteriormente con una pipeta se vaciaron 25 ml de esta solución en cada uno de los ocho frascos que contenían 200 semillas (Figura 2). Cabe señalar, que la solución se estuvo oxigenando con intervalos de 1 hora durante 5 segundos.

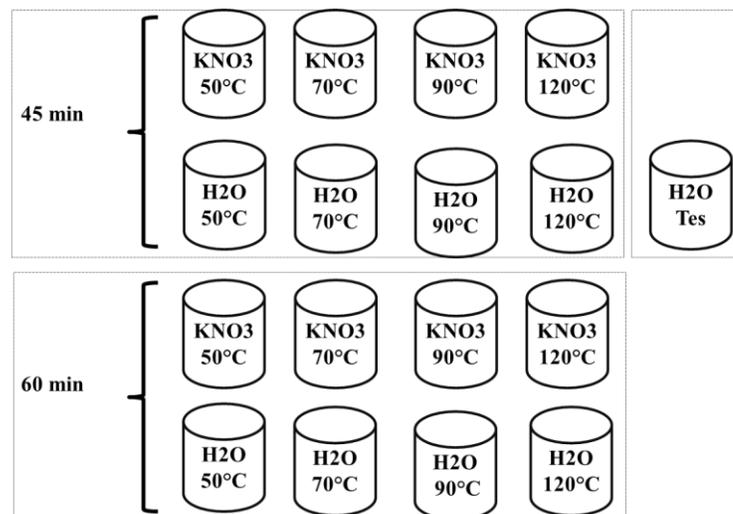


Figura 2. Priming en frascos.

Después de las 48 horas de tratamiento osmótico, las semillas se extrajeron de los frasco y lavadas en agua corriente para eliminar los residuos del a KNO_3 y se colocaron

en charolas de unicel etiquetadas durante 48 horas para lograr su secado (Figura 3) y posterior almacenamiento a -2°C durante seis días y pasar a la tercer fase.

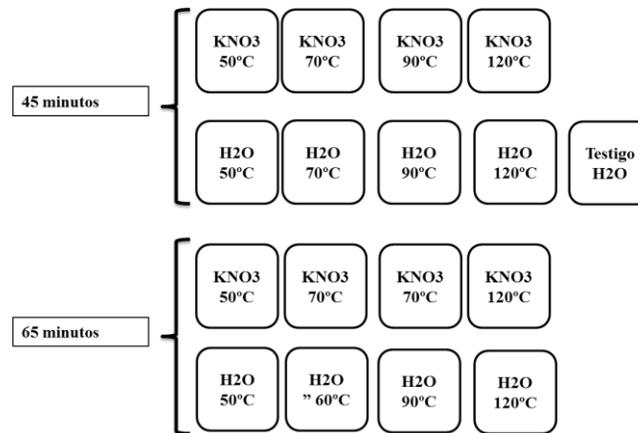


Figura 3. Secado de semillas después del priming.

Tercera fase: Pruebas de calidad fisiológica y sanitaria

Al término de la termoterapia y priming se realizaron las pruebas de calidad fisiológica y sanitaria. Para realizar las pruebas de calidad fisiológica se emplearon 100 semillas de cada uno de los 16 tratamientos generados de la combinación termoterapia + priming, además del testigo absoluto. Con éstas 100 semillas se conformaron cuatro submuestras (repeticiones) de 25 semillas y se colocaron en cajas de Petri que contenían papel filtro como sustrato y se regaron con agua destilada para ser introducidas en una germinadora Seedburo® calibrada a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 4). Durante esta prueba de germinación se realizaron dos conteos; el primero se tomó al 7° día y el segundo al día 28 (ISTA, 2004).

Las variables evaluadas fueron peso seco por plántula, porcentaje de plántulas normales y anormales, y sobre aquellas semillas que no emitieron radícula al finalizar este lapso, se realizó la prueba de viabilidad con tetrazolio para determinar el porcentaje de semillas muertas y latentes; proceso que consistió en realizar un corte transversal en cada semilla y se colocaron en cajas Petri, en una solución de tetrazolio a una concentración de 0.1% con agua destilada, las cuales se mantuvieron en oscuridad durante 12 horas. Las semillas cuyos embriones y cotiledones colorearon por completo

se consideraron latentes, y las no teñidas se consideraron muertas (ISTA, 2004) (figura 5).

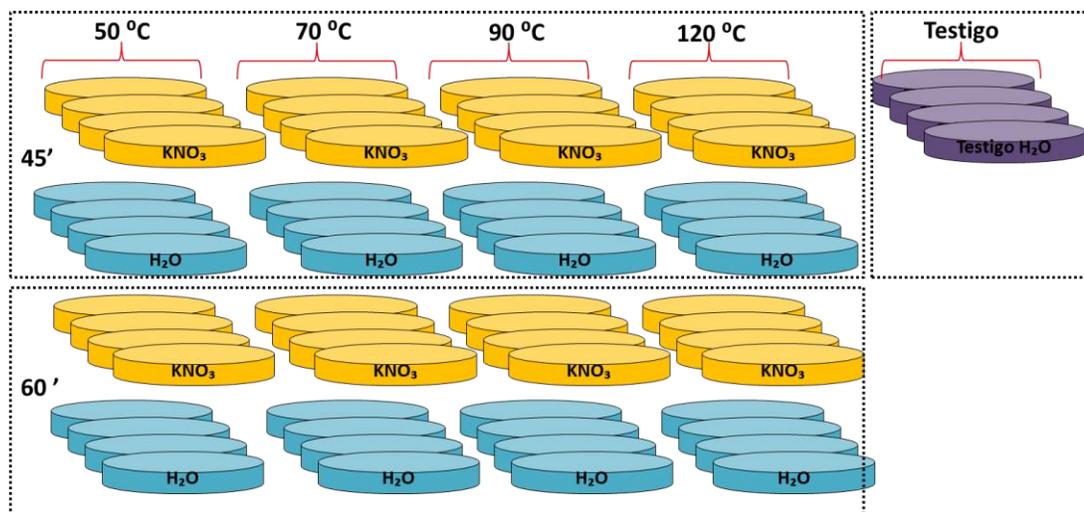


Figura 4. Pruebas de germinación.



Figura 5. Semillas coloreadas después de la prueba del tetrazolio.

El porcentaje de germinación se obtuvo al sumar el total de las plántulas normales del primer y segundo conteo. De igual manera, el porcentaje de plántulas anormales se obtuvo del total de aquellas con malformaciones en sus estructuras esenciales como radícula y plúmula, lo que impide su desarrollo normal. El peso seco se determinó sobre las plántulas normales de cada tratamiento, mismas que fueron secadas en estufa hasta alcanzar peso constante y se registró su peso (ISTA, 2004).

Pruebas de calidad sanitaria

Una vez aplicada la termoterapia y priming, y paralelo a las pruebas de germinación, se sembraron cinco semillas de cada tratamiento en charolas de poliestireno que contenían peat moss® como sustrato (Figura 6). La siembra en las charolas se realizó depositando una semilla cada dos cavidades para evitar posible transmisión de virus por contacto entre plantas sanas e infectadas, y fueron introducidas en jaulas construídas con alambrcn cubiertas con organza para impedir el acceso de insectos vectores (áfidos). Las jaulas permanecieron en condiciones protegidas en invernadero durante 60 días, periodo en el cual las plantas mostraban síntomas de infección viral como distorsión foliar y amarillamiento; momento en el cual se tomaron 3 gramos de las plántulas de cada tratamiento y se enviaron al laboratorio Fumaplant S.A. de C.V., del estado de Morelos para la detección de los virus AMV y CMV.

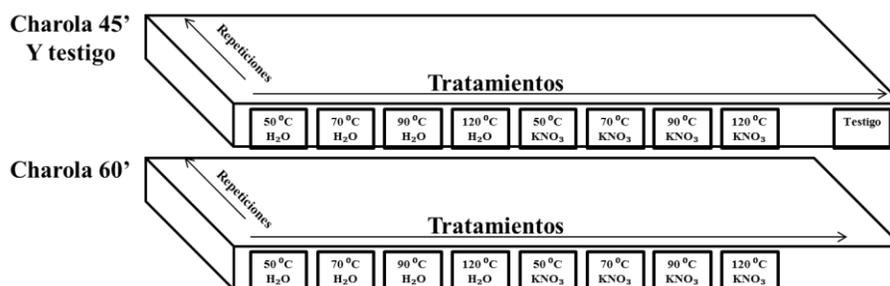


Figura 6. Siembra de semillas en charolas para producción de plántulas y detección de los virus AMV y CMV.

Diseño Experimental

Se aplicaron 16 tratamientos más un testigo absoluto y cuatro repeticiones en un diseño completamente al azar.

Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y posterior comparación de medias mediante Tuckey ($\alpha = 0.05$) con el paquete estadístico SAS 2004 (Statistical Analysis System).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis de varianza mostraron que los tratamientos de termoterapia y priming tuvieron efectos sobre la calidad fisiológica de la semilla de tomate de cáscara (Cuadro 1), al presentarse diferencias estadísticas en las variables porcentaje de germinación, plántulas anormales, semillas latentes y semillas muertas, así como en la variable peso seco por plántula. Los coeficientes de variación en todas las variables evaluadas fueron bajos (< 15%), lo cual denota homogeneidad de datos y confiabilidad en los resultados.

Cuadro 1. Cuadrados medios de las variables evaluadas en las pruebas de calidad fisiológica en semilla de tomate de cáscara posterior a termoterapia y priming.

Fuentes de variación	de G.L	Variables					
		PG	PA	SL	SM	PS	
Modelo	16	1203.088 *	568.588*	18.794*	2238.088*	3.8552*	
Error	34	0.3333	0.3333	0.3333	0.3333	9.45	
Total	50						
C.V.		1.89	2.493	14.946	1.326	4.843	
Media		30.49	23.156	3.862	43.509	0.0006	

(G.L) grados libertad; (C.V.) coeficiente de variación; (PG) porcentaje de germinación; (PA) porcentaje de plántulas anormales; (SL) porcentaje de semillas latentes; (SM) porcentaje de semillas muertas; (PS) peso seco de plántulas.

*Significativo al 0.05 %

La calidad de la semilla comprende varios atributos deseables como su capacidad de establecerse en campo, su poder de germinación y vigor apropiado (Basra, 1995). Las semillas de tomate de cáscara sometidas a calor (70°C) durante 45 minutos y priming con nitrato de potasio a -20 atm de presión osmótica durante 48 horas, presentaron el porcentaje de germinación más alto y libre del Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV) (Cuadro 2). Kmetz-Gonzalez y Struve (2000) mencionan que el acondicionamiento osmótico o priming de las semillas generalmente incrementa el porcentaje final de germinación, lo cual ocurrió en este trabajo de investigación, ya que la semilla así tratada supera estadísticamente al porcentaje de germinación del

testigo absoluto, cuyo valor promedio fué del 27%, mientras que semillas sometidas a la temperatura y priming señalado anteriormente, alcanzaron el 63% de germinación.

Cuadro 2. Efecto promedio de los diferentes tratamientos relativos a la calidad fisiológica de la semilla de tomate de cáscara.

Tratamientos de termoterapia y priming	Variables					CMV	AMV
	Ger	Anorm	Laten	Muer	PS		
45° 70°C (KNO ₃)	63.67 a	14.33 h	2.33 d	20.33 m	0.00077279 a	positivo	Libre de virus
60° 50°C (Agua)	57.67 b	24.33 f	0.33 e	18.33 n	0.00077939 a		
45° 50°C (Agua)	55.67 c	10.33 i	2.33 d	32.33 i	0.00073405 abc	Libre de virus	Positivo
60° 90°C (KNO ₃)	47.67 d	24.33 f	2.33 d	20.33 m	0.00053083 fg		
60° 70°C (Agua)	45.67 e	48.33 a	0.33 e	6.333 o	0.00066681 bcd	positivo	Positivo
45° 70°C (Agua)	41.67 f	28.33 d	2.33 d	28.33 j	0.00073529 ab	positivo	Libre de virus
60° 50°C (KNO ₃)	37.67 g	36.33 c	4.33 c	22.33 l	0.00064965 cde	positivo	Positivo
45° 50°C (KNO ₃)	35.67 h	18.33 g	6.33 b	40.33 h	0.00065633 bcde	positivo	Positivo
60° 70°C (KNO ₃)	27.67 i	44.33 b	4.33 c	24.33 k	0.00058014 ef	positivo	Positivo
Testigo	27.67 i	28.33 d	2.33 d	42.33 g	0.00060938 def	positivo	Positivo
60° 120°C (Agua)	25.67 j	26.33 e	2.33 d	46.33 f	0.00058487 def		
45° 90°C (Agua)	19.67 k	18.33 g	6.33 b	56.33 c	0.00049333 g	positivo	Libre de virus
45° 90°C (KNO ₃)	13.67 l	36.33 c	2.33 d	48.33 e	0.00070905 abc	Libre de virus	Positivo
60° 90°C (Agua)	13.67 l	26.33 e	6.33 b	54.33 d	0.00038381 h	positivo	Positivo
45° 120°C (KNO ₃)	1.667 m	2.333 k	4.33 c	94.33 a	0.000001 i		
45° 120°C (Agua)	1.667 m	0.333 l	8.33 a	92.33 b	0.00000133 i		
60° 120°C (KNO ₃)	1.667 m	6.333 j	8.33 a	92.33 b	0.00000133 i		
DMS.	1.7583	1.7583	1.7583	1.7583	0.0001		

Medias con la misma letra en sentido vertical son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha=0.05$); DMS = Diferencia mínima significativa. Ger: porcentaje de germinación; Anor: porcentaje de plántulas anormales; Laten: porcentaje de semillas latentes; Muer: porcentaje de semillas latentes; PS: Peso seco de plántulas; CMV: Cucumber mosaic cucumovirus (Virus mosaico del pepino, CMV); AMV: Alfalfa mosaic alfamovirus (Virus mosaico de la alfalfa, AMV).

En las semillas tratadas con termoterapia a 50 y 70°C más priming con KNO₃ a -20 atm de presión osmótica durante 48 horas superaron estadísticamente al resto de los tratamientos aplicados, así como al testigo absoluto, al incrementar la calidad fisiológica, en porcentaje de germinación (Figura 7). Pill (1995) señala que al aplicar priming se logra un buen control sobre la hidratación de la semilla, alcanzándose la segunda fase de la imbibición, en la cual varios procesos metabólicos son activados, pero sin permitir la emergencia de la radícula, lográndose con esta técnica rapidez, sincronización e incremento en la germinación. De acuerdo con Szafirowska *et al.* (1981), uno de los efectos benéficos del priming sobre semillas deterioradas o

envejecidas consiste en un decremento en la conductividad de lixiviados, indicativo de reparación y arreglo de la estructura en la membrana celular. Se ha sugerido además, que durante el secado de las semillas, las membranas celulares pierden su integridad, de tal manera, que cuando éstas son puestas a embeber, grandes cantidades de soluto salen de las células y se presenta mayor deterioro de las membranas cuanto más sean éstos. El mecanismo en el que se basa el priming para la reparación de las membranas, implica la absorción inicial de humedad por la semilla a una velocidad muy lenta, que permite a las membranas celulares volver a la condición normal de una manera ordenada, sin los daños consecuentes (Knypl y Khan, 1981).

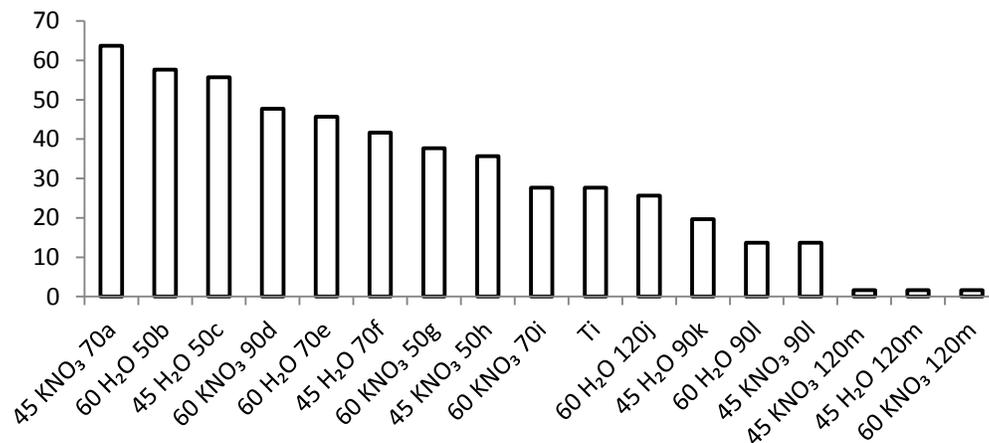


Figura 7. Porcentajes de germinación de semilla de tomate de cáscara sometida a termoterapia y priming.

El Testigo y el tratamiento 60'KNO₃70°C fueron estadísticamente iguales con un 27.6667% y 27.6667% de germinación respectivamente. Asimismo, los tratamientos 45'KNO₃120°C, 45'H₂O120°C y 60'KNO₃120°C fueron estadísticamente iguales, cuyas condiciones de estrés fueron las más extremas, sin embargo se esperaba que mediante el priming habría incremento en la calidad fisiológica, lo cual no ocurrió de manera satisfactoria, ya que de manera general se obtuvieron los porcentajes de germinación más bajos, con valores promedio inferiores al 2%. Por otra parte, el tratamiento 60'H₂O 70°C generó el mayor porcentaje de plántulas anormales (Figura 8), al superar estadísticamente al resto de los tratamientos, incluyendo al testigo absoluto.

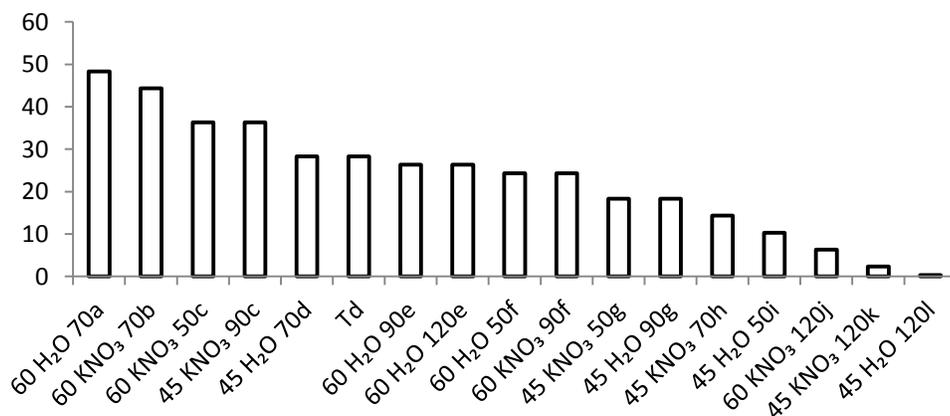


Figura 8. Porcentaje de plántulas anormales de semilla de tomate de cáscara sometida a termoterapia y priming.

El tratamiento 60' H₂O 70°C tiene el mayor porcentaje de plántulas anormales, tres de los 4 tratamientos que presentan mayor porcentaje de plántulas anormales estuvieron osmoacondicionadas con KNO₃ lo que hace suponer que el daño en la semilla por efecto de las altas temperaturas y el máximo período de exposición (60 min) fue muy drástico, de tal manera que al aplicar priming con nitrato de potasio, los iones de este compuesto penetraron la semilla hasta llegar al embrión y dañarlo. Es evidente que los efectos benéficos del priming dependen del soluto, potencial osmótico, temperatura y duración del proceso (Bittencourt *et al.*, 2004), en el sentido de que al aumentar la duración del tratamiento se reduce el porcentaje de germinación (Haigh y Barlow, 1986). Los tratamientos con menor cantidad de plántulas anormales fueron 45' H₂O 120°C, 45' KNO₃ 120°C y 60' KNO₃ 120°C, esto debido a los bajos porcentajes de semillas que lograron emitir radícula. Los porcentajes más altos de semillas latentes se presentaron con los tratamientos 60' KNO₃ 120°C y 45' H₂O 120°C, con un valor de 8.333% para ambos tratamientos (Figura 9).

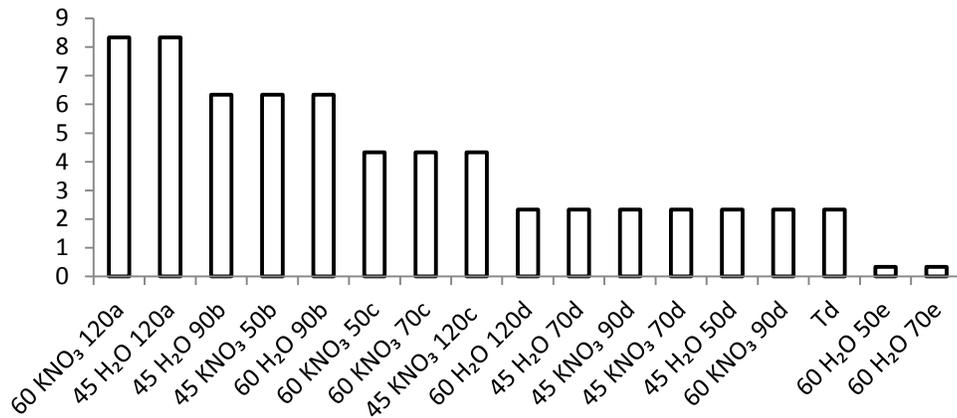


Figura 9. Porcentaje de semillas latentes en tomate de cáscara sometidas a termoterapia y priming.

Acorde a los resultados obtenidos, los mayores porcentajes de semillas muertas con corresponden al tratamiento 45'KNO₃120°C, seguido del tratamiento aplicado con 60'KNO₃120°C y 45'H₂O 120°C (Figura 10). Dearman *et al.* (1986) mencionan que la pérdida de viabilidad durante el envejecimiento de semillas no se puede restaurar por medio del priming; sin embargo, a pesar de haber empleado semilla cosechada hace 7 años para esta investigación, algunos tratamientos aplicados sí lograron restaurar la viabilidad de las semillas, como fue el caso de aplicar hidroacondicionamiento posterior a la termoterapia 60' 70°C (Agua), al obtener el menor porcentaje de semillas muertas cuyo valor fue del 6.3%, mientras en el testigo absoluto se presentó un 42.3 % (Cuadro 2).

Hubo cinco tratamientos estadísticamente iguales con el mayor peso seco, los cuales fueron 60'H₂O 50°C, 45' KNO₃ 70° C, 45' H₂O 70°C, 45' H₂O 50°C y 45' KNO₃ 90°C. Estos tratamientos superaron estadísticamente al resto de los tratamientos aplicados (Cuadro 2 y Figura 11). Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los obtenidos por Tetepa (1997), quien incrementó el peso seco de plántulas de tomate de cáscara después de acondicionar osmóticamente las semillas en una solución de PEG-200 a -5 atmósferas.

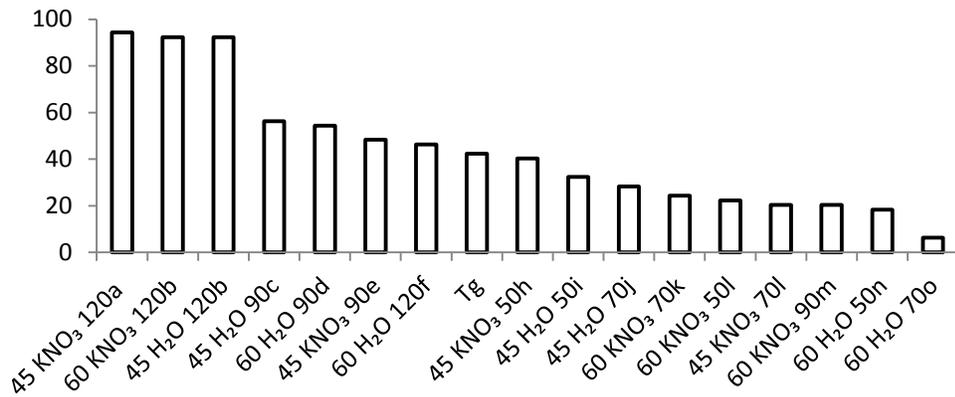


Figura 10. Porcentaje de semillas muertas en tomate de cáscara sometidas a termoterapia y priming.

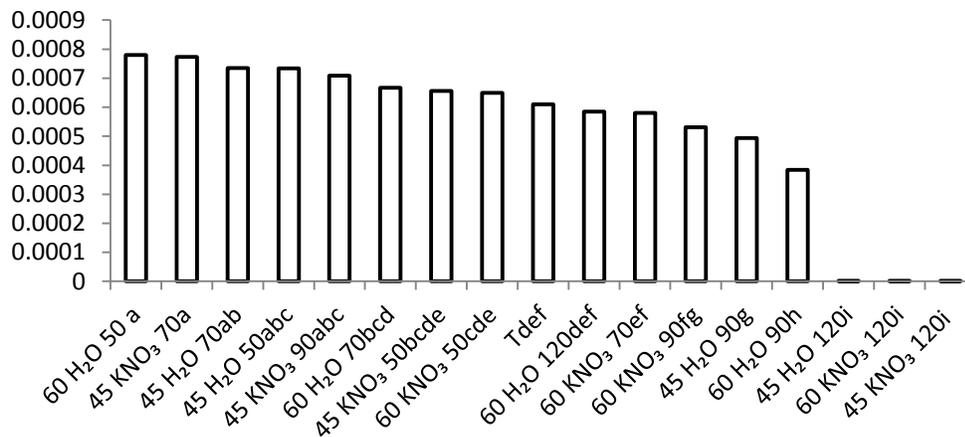


Figura 11. Peso seco de plántulas de tomate de cáscara.

Pruebas de Calidad Sanitaria

La incidencia de semillas infectadas con virus es un factor importante para su dispersión de una región a otra (Johansen *et al.*, 1994), ya que pueden permanecer activos de uno a cinco años (Kado y Agrawal, 1972), lo que es una estrategia perfecta para perpetuarse, incluso provocar pérdida total en la producción de tomate de cáscara (De la Torre *et al.*, 2002). Sobre todo, al considerar que los sistemas de producción de semilla en esta especie se basan en eliminar de los lotes sólo aquellas plantas que muestran síntomas de virosis (Martínez *et al.*, 2004), sin tomar en cuenta la existencia de

plantas asintomáticas en alto porcentaje; de ahí que no se garantiza su sanidad, por el contrario se sigue contribuyendo a la dispersión de los virus CMV y AMV en forma incontrolada ciclo tras ciclo en las regiones productoras.

Cuadro 3. Valores de absorbancia obtenidos mediante la prueba de detección de los virus AMV y CMV en plántulas de tomate de cáscara

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	B 0.112000	B -0.012000	(T7) -0.014000	(T7) -0.015898	N 0.000000	N -0.004000	T10 0.011000	(T10) 0.021199
B	P 1.127000	P 0.998000	(T9) 0.005000	(T9) 0.006999	(T1) 0.007000	(T1) 0.008999	(T14) 0.011000	(T14) 0.028999
C	N -0.022000	N -0.020000	(T10) -0.002000	(T10) -0.001999	*(T2) -0.002000	*(T2) -0.002599	(T15) 0.004000	(T15) 0.003999
D	(T1) -0.003000	(T1) -0.002991	(T14) -0.001000	(T14) -0.002999	(T3) 0.013000	(T3) 0.014889	(T17) 0.007000	(T17) 0.007899
E	(T2) -0.012000	(T2) -0.013999	(T15) -0.011000	(T15) -0.013999	(T5) 0.013000	(T5) 0.013999		
F	*(T3) -0.020000	*(T3) -0.019999	(T17) -0.008000	(T17) -0.00799	*(T6) 0.002000	*(T6) 0.001599		
G	*(T5) -0.020000	*(T5) -0.029999	B 0.065000	B -0.001	*(T7) 0.002000	*(T7) 0.001859		
H	(T6) -0.009000	(T6) -0.008999	P 1.175000	P 1.083	(T9) 0.011000	(T9) 0.025555		

Muestras positivas; **B**: Blanco; **P**: Testigo positivo; **N** : Testigo negativo.

*Los valores de absorbancia inferiores al umbral son negativos a la presencia de virus.

Para establecer de los umbrales e interpretar las lecturas de absorbancia de la placa de ELISA se calculó la media de los controles negativos más dos veces su la desviación estándar ($\bar{X}+2s$) (Sutula, 1986).

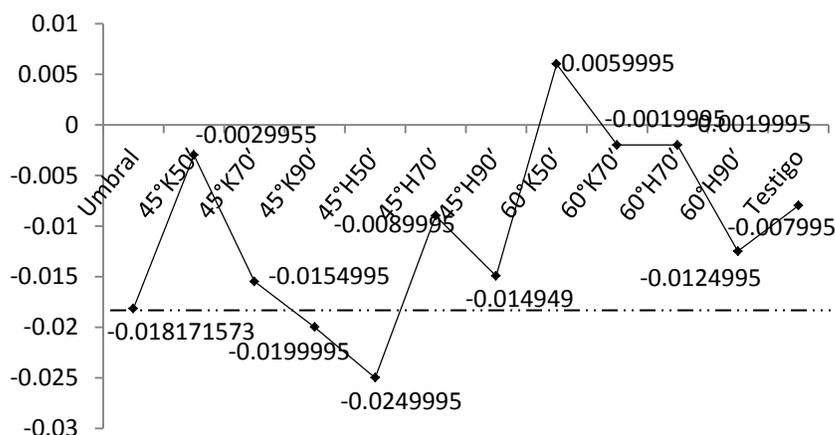


Figura 12. Medias de CMV respecto al umbral calculado.

Los valores menores al -0.018171573, son negativos a infección por virus, y los que están por encima de este valor son positivos (Cuadro 3). Los tratamientos 45' H₂O 50°C y 45' KNO₃ 90°C tuvieron un valor por debajo del umbral y por lo tanto libres del Cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV) (Figura 12).

La presencia de los virus encontrados coincide con la detección realizada por De la Torre *et al.*, (2002) en una colecta de muestras de tomate de cáscara en parcelas comerciales ubicadas en los Estados de México, Puebla y Morelos, que mostraron síntomas de origen viral como: mosaico, moteado, deformación y proliferación foliar, con reducción del tamaño de hojas, acompañado de amarillamiento intervenal severo, detectando en laboratorio los virus AMV, TEV, CMV, TMV y TSWV.

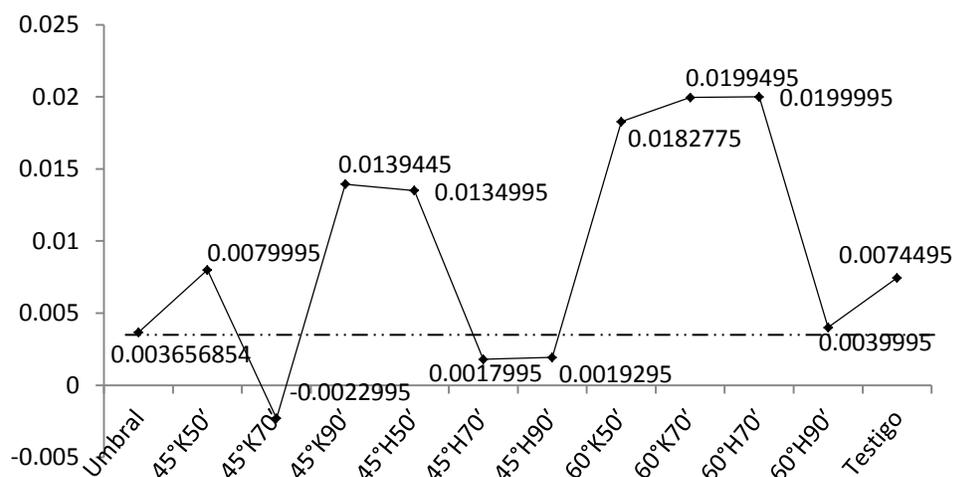


Figura 13. Medias de absorbancia de AMV respecto al umbral calculado.

Respecto del Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV), los valores menores al 0.003656854, son negativos a infección por virus, y los que están por encima de este valor son positivos. -0.0022995, 0.0017995 y 0.0019295 (Cuadro 3).

El tratamiento 45' KNO₃ 70°C resulto con el mejor porcentaje de germinación superando al testigo, así mismo dio negativo a la infección por el virus del mosaico de la alfalfa. Por otro lado el tratamiento 45' H₂O 50°C registró valores negativos para CMV este tratamiento registro el tercer mejor porcentaje de germinación estadísticamente diferente a 45'KNO₃70° en germinación y superando al testigo. Se observa que no hay

un tratamiento donde la temperatura haya desactivado tanto a AMV como a CMV (Cuadro 2; figuras 12 y 13). Varios tratamientos han sido evaluados para evitar la transmisión de virus; semillas de tomate fueron sometidas a tratamientos térmicos de 80°C durante 24 horas y 74°C durante 48 horas con el objetivo de inactivar el PepMV, sin embargo, estos tratamientos no erradican el virus en las semillas enteras (Córdoba *et al.*, 2007).

Recientemente, el calor seco fue probado en semillas de alfalfa para controlar patógenos transmitidos por esta vía, dicho estudio fue realizado por el Departamento de Ciencias Animales y Alimentarias de la Universidad de Delaware, EEUU por Neetoo y Chen (2010). Las semillas se sometieron a temperaturas de 55, 60 y 65 °C durante 10 días, y 70°C durante 24 horas. Los resultados de este estudio indican que aplicar calor seco a temperaturas moderadas (55 y 60 °C) representa una intervención efectiva en la descontaminación de las semillas de alfalfa de *Salmonella*. Sin embargo, la exposición de las semillas a temperatura un poco mayores de 65 °C, fue capaz de eliminar simultáneamente *Salmonella* sp. y *E. coli* pero afectando la germinación de las semillas, es decir, la termoterapia afecta la calidad fisiológica de las semillas, al disminuir los porcentajes de germinación, lo cual no ocurrió en este trabajo de investigación, en el cual se lograron inactivar el virus AMV o CMV y de manera simultánea se mejoró la calidad fisiológica de la semilla de tomate de cáscara.

De acuerdo con Šutić *et al.* (1999), la infección por AMV retarda el crecimiento de las plantas, reduce la floración y amarre de frutos; lo cual coincide con los daños observados en las plantas de tomate de cáscara infectadas con virus durante el ciclo de producción de semilla desarrollado a campo abierto. En general, los virus hacen que disminuya la fotosíntesis de la planta al reducir el nivel de la clorofila por hoja, la eficacia que tiene esta molécula fotosintética y el área foliar por planta. Por lo común, los virus disminuyen la cantidad de sustancias reguladoras del crecimiento (hormonas) de la planta, al inducir un aumento en las sustancias inhibidoras del crecimiento. La disminución de nitrógeno soluble durante la rápida síntesis del virus es un fenómeno común en las enfermedades virales de las plantas, y en el caso de los mosaicos el nivel de los carbohidratos en los tejidos de la planta disminuye en forma drástica (Agrios, 2006).

Johansen *et al.* (1994) mencionan que la transmisión del AMV por semilla está asociada a la infección del embrión, ya que el virus presente en la testa y en el endospermo puede inactivarse durante el proceso de maduración, almacenamiento y deshidratación de la semilla. De ahí que la transmisión por este medio está determinada por la invasión directa o indirecta del embrión y por la supervivencia del virus durante la formación de la semilla, almacenamiento y germinación. Por tal motivo, el AMV se encuentra en el embrión de las semillas de tomate de cáscara, toda vez que los frutos se cosechan cuando estos alcanzan su madurez fisiológica, y una vez extraída la semilla se deja secar para posteriormente almacenarse y así conservar su calidad.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo y los resultados que se obtuvieron se llegó a las siguientes conclusiones:

Aplicar termoterapia y priming incrementa la calidad fisiológica y sanitaria de la semilla de tomate de cáscara.

El mejor tratamiento para incrementar la calidad fisiológica y sanitaria de la semilla de tomate de cáscara consistió en someter aplicar termoterapia a 70°C durante 45 minutos y posterior priming con KNO₃ a -20 atm de presión osmótica durante 48 horas, al obtener un 63.6 % de germinación e inactivar el virus Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV), valor que supera estadísticamente al resto de los tratamientos y al testigo absoluto, cuyo porcentaje de germinación obtenido fue del 27.6 %.

Tres tratamientos de termoterapia lograron inactivar el virus de AMV; 70°C durante 45 minutos más priming con KNO₃ a -20 atm durante 48 horas; 70°C durante 45 minutos e hidroacondicionamiento con agua destilada; 90°C durante 45 minutos e hidroacondicionamiento con agua destilada.

Dos tratamientos de termoterapia lograron desactivar el virus de CMV; 90°C durante 45 minutos más priming con KNO₃ a -20 atm durante 48 horas; 50°C durante 45 minutos e hidroacondicionamiento con agua destilada.

Ninguno de los tratamientos aplicados logró inactivar de manera simultánea los virus Cucumber mosaic cucumovirus (virus mosaico del pepino, CMV) y Alfalfa mosaic alfamovirus (virus mosaico de la alfalfa, AMV).

Se recomienda ensayar más temperaturas dentro del rango de 50-90°C y duración de 45 minutos en los tratamientos de termoterapia más priming con KNO₃ para lograr inactivar de manera simultánea los virus AMV y CMV en semilla de tomate de cáscara.

LITERATURA CITADA

- Agrios N. G. 1996. Fitopatología. Ed. Limusa. México. 821 p.
- AIDSINFO. 2004. Ribavirín. Hoja de datos técnicos (en línea). Consultado 15 may. 2005 disponible en <http://aidsinfo.nih.gov>.
- Akers W. y E Kevin. 1986. SPS: A system for priming seed using aerated polyethylen glycol or salt solutions. Hort Sci. 21:529-531.
- Anaya S. 1992. Manejo fitosanitario de las hortalizas en México. Centro de Entomología y Acarología, 412 p.
- Anónimo, 2005. Pest Risk Analysis for Pepino mosaic virus, 29 abril 2005. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York.
- Apodaca, M. A., M. A Barreras, E. Cortez y J. A. Quintero. 2008. Enfermedades del Tomate de Cáscara en Sinaloa. INIFAP-CIRNO. Campo Experimental Valle del Fuerte. Folleto Técnico No. 31. Los Mochis, Sinaloa, México. 33 p.
- Basra A. S. 1995. Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications. Food Products Press. New York, United States of America. 389 p.
- Bittencourt M. L. C., D. C. F. S. Díaz y E. F. Araujo. 2004. Effects of priming on asparagus seed germination and vigour under water and temperature stress. Seed Sci. and Tech. 32: 607-616.
- Bradford J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination undestress conditions. Hort Sci. 21(5):1105-1110.
- Bradford J., J. Steiner y S. Trawatha. 1990. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. Crop Sci. 30:718-721.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson y E. J. Zurcher, (eds.) 1996 – Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>
- Burbano C. y F. Garcés. 2007. Control del Virus de la Hoja Amarilla de la Caña de Azúcar (SCYLV) Mediante Técnicas de Cultivo de Tejidos en la Variedad CR74-250. Revista Tecnológica ESPOL. 20: 203-208p.
- Cantliffe D. J. 1981. Seed priming of lettuce for early and uniform emergence under conditions of environmental stress. Acta Hort. 122:29-38.
- Castillo, R., A. Gómez., F. Garcés. 2003. Multiplicación masiva de semilla sana en variedades de caña de azúcar mediante cultivo de tejidos vegetales. Publicación Técnica No 1. CINCAE. El Triunfo, Ecuador. 10 p.
- Cochrane, M. P. 2000. Seed Carbohydrates. In: Black M, Bewley JD (Eds.) Seed Technology and its Biological Basis. Sheffield Academic Press. Sheffield, UK. pp. 85-120.
- Conti M., D. Gallitelli, V. Lisa, O. Lovisolo, G. P. Mertelli, A. Ragazzino, G. L. Rana y C. Vovlas. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Ed. Mundi-Prensa. 206 p.

- Corbineau, F., M. A. Picard., J. A. Fougereux., F. Ladonne y D. Côme. 2000. Effects of Dehydration Conditions on Desiccation Tolerance of Developing Pea Seeds as Related to Oligosaccharide Content and Cell Membrane Properties. *Seed Sci. Res.* 10: 329-339.
- Córdoba M. C. (2010). El virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*) afectando al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*): Caracterización y Epidemiología. 216p.
- Córdoba M. C., A. García, A. Alfaro, y C. Jordá. 2007. Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease.* 91: 1280-1254
- Dearman, J., P. A. Brocklehurst. y L.K. Drew. 1986. Effects of osmotic priming and ageing on onion seed germination. *Ann. Appl. Biol.* 108:639-648.
- De la Torre A. R. 1996. Caracterización Biológica y Molecular de un Complejo Viral en Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en los Valles Altos de México. Tesis de Doctor en Ciencias. Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 93 p.
- De La Torre A. R., R. Valverde., J. Méndez L., J. T. Ascencio y R. F. Rivera. 2002. Caracterización Preliminar de Geminivirus en Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la Región Centro de México. *Agroc.* 36(4): 471-481.
- De la Torre R., M. Salazar-Segura y R. A. Valverde (2003) Etiología del moteado amarillo del tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* B.) en México. *Agrociencia* 37: 277-289
- De la Torre, A. R., D. Téliz O., B. Barrón R., E. Cárdenas S., E. García L., M. 1998. Identificación de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16(1): 1-11.
- EDA. 2008. El uso del ácido salicílico y fosfonatos (fosfitos) para activación del sistema de resistencia adquirida de la planta. *Boletín Técnico de Producción. Cuenta del Desafío del Milenio de Honduras (MCA-Honduras).* 3p.
- Fauquet, C. M, M. A. Mayo, J Maniloff, U. Desselberger y L. A. Ball. 2005. *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Virology Division International Union of Microbiological Societies. Elsevier Academic Press, San Diego California, United States of America. 1162 p.
- Flores, H. A. 2004. Introducción a la tecnología de las Semillas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. De México.160 p.
- Gillaspie, A. G., M. R. Hajimorad. y S. A. Ghabrial. 1998. Characterization of a Severe Strain of Cucumber mosaic cucumovirus Seedborne in Cowpea. *Plant Dis.* 82: 419-422.
- Gozzo, F. 2004. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection (en línea). Outlooks on Pest Management 10.1564 Consultado 2 jun. 2005. Disponible en www.researchinformation.co.uk/pest/sample/15-1/11-Gozzo.pdf.

- Haigh M., A. y W R. Barlow. 1986. Field emergence of tomato, carrot and onion seeds primed in an aerated salt solution. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:660-665.
- Hampton J. G. 2002. What is Seed Quality. *Seed Sci. and Technol.* 30: 1-10.
- Harris K. F. 1981. Arthropod and Nematode vectors of plant viruses. *Annual Review of Phthopathology* 19, 391-426.
- Hartmann T. H. y D. E. Kester. 1994. Propagación de Plantas: Principios y Prácticas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, 760 p.
- Hull, R. 2002. *Matthew's Plant Virology*. Academic Press Inc, London UK. 1001 p.
- IFS (International Federation of Seeds). 2000. Tratamientos de semillas con productos biológicos. Comité de Tratamiento de Semillas y del Medio Ambiente (STEC).
- Igarza J., R. Hernández, B. Cruz. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en malanga. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. No.60 p.57-60. Centro de Biotecnología Vegetal (C.B.V).Holguín. Cuba. Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT). Villa Clara.
- INIFAP. 2004. El Amarillamiento en el Cultivo de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) y Medidas Para su Manejo. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental Zacatepec, Morelos. 23 p.
- ISTA. 2004. International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland. 700 p.
- Johansen, E., M. C. Edwards y R. O. Hampton. 1994. Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 363-386.
- Kado, C. I. y H. O. Agrawal. 1972. Principles and Techniques in Plant Virology. Litton Educational Publishing, Inc. United States of America. 688 p.
- Kmetz, G. M., y D. Struve. 2000. Blackgum seed conditioning increases germination: rate, seedling emergence and quality. *Seed Science and Technology.* 28(1): 49-57.
- Kermode, A. R. 1995. Regulatory Mechanisms Involved in Transition from Seed Development to Germination: Between the Embryo and the Seed Environment. In Kigel J, Galili G (Eds.) *Seed Development and Germination*. Dekker. Nueva York, United States of America. pp. 273-332.
- Kigel y Galili. 1995. . Seed development and germination. Marcel Dekker, New York.
- Knypl, J. S. and A. A. Khan. 1981. Osmoconditioning of soybean seed to improve performance at suboptimal temperatures. *Agron. J.* 73(1): 112-116.
- Lacasa, A., M. M. Guerrero, I. Hita, M. A. Martínez, C. Jordá, P. Bielza, J. Contreras, A. Alcazar, y A. Cano. 2003. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on Pepino mosaic virus (PepMV) spread on tomato crops. *Plagas* 29:393-403.
- Loomans A., J. Franssen, M. van der Staaij, I. Stijger y J. Klapwijk. 2000. Latest news on whitefly in the Netherlands. *EWSN Newsletter* 6, 2.

- Marín S. J. 2010. Producción de semilla de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) libre de virus mediante el manejo de insectos vectores. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 81 p.
- Marín J., J. A. Mejía, A. Hernández, A. Peña y A. Carballo. 2007. Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agricultura Técnica en México*. 33: 115-123
- Martínez, S. J.; A. Peña L. y D. Montalvo H. 2004. Producción y Tecnología de Semilla de Tomate de Cáscara. Universidad Autónoma Chapingo, México. 36 p.
- Momol, M. S. Olson, J. Funderburk y J. Stavisky. 2004. Integrated Management of Tomato Spotted Wilt on Field-Grown Tomatoes (en línea). *Plant Diseases* 88:882-890. Consultado el 06 jul. 2005. Disponible en 199.86.26.56/pd/pdfs/2004/0608-01R.pdf.
- Neetoo H. y H. Chen. 2010. Individual and Combined Application of Dry Heat With High Hydrostatic Pressure To Inactivate *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa Seeds. Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, De 19716-2150, USA.
- Ortega G. R. 1991 Transmisión de enfermedades por las semillas de hortalizas. Su prevención. Dirección general de investigación y capacitación agrarias. http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1990_06.pdf. conexión: 16/ 04/ 2011. 15p.
- Panta A, A. Golmirzaie.S/F. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos con fines de producción de semilla de papa. Centro Internacional de la Papa. 1-8 p.
- Parera, A. C. y D. J. Cantliffe. 1994. Presowing seed priming. *Horticultural Review* 16: 109-141.
- Parmessur, Y. y A. Saumtally. 2001. Elimination of Sugarcane Yellow Leaf Virus and Sugarcane Baciliform Virus by tissue culture (en línea). Consultado el 15 sep 2005. Disponible en <http://ncb.intnet.mu/moa/farc/amas2001/pdf/s42.pdf#search=scbv%20saumtally>.
- Parmessur, Y., S. Aljanabi, S. Saumtally y Dookun-Saumtally. 2002. Sugarcane Yellow Leaf Virus and Sugarcane yellows Phytoplasma: Elimination by Tissue Culture (en línea). *Plant Pathology* 51, 561-566. Consultado el 09 Marzo. 2005. Disponible en www.blackwellsynergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-3059.2002.00747.x/full/-...
- Peña, M. R. y R. Bujanos M. 1992. Especies de Áfidos (Homóptera: Aphididae) que Dañan Hortalizas, pp. 41-71. *In*: Anaya R., S., N. Bautista M. y B. Domínguez R. (Eds.) Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Pérez, C. I.; V. A. González H.; J. C. Molina M.; O. J. Ayala G y A. Peña L. 2008. Efecto de Desarrollo y Secado de Semillas de *Physalis ixocarpa* Brot., en Germinación, Vigor y Contenido de Azúcares. *Interc.* 33(10): 762-766.

- Pérez, M.L.; E. J. Rico.; J.R. P. Sánchez.; J.T. I. Ascencio.; R. P. Díaz y R.F. B. Rivera. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el Estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 22 (2): 187-197.
- Pill, W.G. 1995. Low water potential and presowing germination treatments to improve seed quality. P 319-359. In: A.S. Basra (ed.). *Seed quality*-Food Products Press, New York.
- Pradhanang, P., P. Momol y S. Olson. 2005. Application of Acibenzolar-S-Methyl Enhances Host Resistance in Tomato Against *Ralstonia solanacearum* (en línea). *Plant Disease* DOI:10.1094/PD-89-0989. Consultado 07 oct 2005. Disponible en www.apsnet.org/pd/+toc/2005/dse05tc.htm.
- PRODUCE. 2005. Memoria: Jornada de Tecnología de Producción de Tomatillo. Fundación PRODUCE, Sinaloa A. C. Culiacán, Sinaloa, México. 72 p.
- Romero, M. C. Kousik y D. Ritchie. 2001. Resistance to bacterial Spot in Bell Pepper Induced by Acibenzolar-S-Methyl. *The American Phitopatological Society*.
- Sepúlveda G. 2011. Aspectos generales de los virus de las plantas. Sepúlveda P. Virus transmitidos por insectos vectores en tomate en la región de Arica y Paracota: situación actual de manejo. Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias del Desierto y Altiplano. pp: 13-19
- Shipp J.L., R. Buitenhuis, L. Stobbs, K. Wang, W. S. Kim y G. Ferguson. 2008. Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble-bees in tomato greenhouses. *Annals of Applied Biology* 153, 149-55.
- SIAP, (2010). Cierre de la producción agrícola por cultivo. [Base de datos en línea]. México, D.F. SIAP. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=2067. [17 abr 12]
- SIAP, (2012). Tomate verde. [Base de datos en línea]. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=265&Itemid=101. SIAP. [17 abr 12].
- Šutić, D.D.; R.E. Ford and M.T. Tošić. 1999. *Handbook of Plant Viruses Diseases*. Edit. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, United States of America. 553 p.
- Sutula, C. L.; J. M. Gillett.; S. M. Morrissey, and D. C. Ramsdell. (1986). Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. *The Amer. Phytopathol. Soc.* 70(8): 722-726.
- Szafirowska A.; A.A. Khan y N. H. Peck. 1981. Osmoconditioning of carrot seed to improve seedling establishment and yield in cold soil. *Agron. J.* 73: 845-848.
- Tetepa. C. 1997. Acondicionamiento osmótico de semilla de tres especies hortícolas solanáceas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 76 p.

- Trigo, M.F.O.O., J. L. Nedel, A. García y L. F. N. Trigo. 1999. Efeitos do condicionamiento osmótico com solucoes aereadas de nitrato de potasio no desempenho de sementes de cebola. *Rev. Bras. Sementes*. 17: 171-178.
- Tun, S. J. M. 2006. Transmisión por Semilla y Respuesta del Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) al Alfalfa mosaic virus (AMV). Tesis de Doctor en Ciencias. Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 62 p.
- Van der Vlugt R. A. A. 2009. Pepino mosaic virus. *Hellenic Plant Protection Journal* **2**, 47-56.
- Vidales, F. J. A. y R. J. J. Alcantar. 1989. Ataque de la virosis durante la floración y su efecto sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.) Memorias del XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz,
- Welbaum, G. E., S. Zhengxing, O. M. Oluoch, L.W. Jett. 1998. The evolution and effects of priming vegetables seeds. *Seed Technology* 20(2): 209-235.
- Wiggans S., C. y Gardner P., F. 1959. Effectiveness of various solutions for simulating drought conditions as measured by germination and seedling growth. *Agron. J.* 51:315-318.
- Zadjali, A. D.; A. R. Matrooshi, y S. M. Moghal. 2002. Occurrence, Distribution and Properties of Alfalfa mosaic virus. *Agric. Sci.* 71: 47-51.