

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**"IDENTIFICACIÓN DE VIRUS
ASOCIADOS A LA NOCHEBUENA
DE SOL (*Euphorbia pulcherrima*
Willd. Ex Klotzch) EN MÉXICO"**

TANIA OCAMPO OCAMPO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: "Identificación de virus asociados a la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Ex. Klotzch) en México" realizada por la alumna: Tania Ocampo Ocampo bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

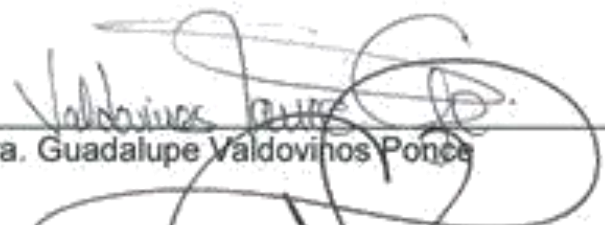
MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESOR


Dr. Cristian Nava Díaz

ASESOR


Dr. Sergio Ramírez Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2012.

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ASOCIADOS A LA NOCHEBUENA DE SOL (*Euphorbia pulcherrima* Ex. Klotzch) EN MÉXICO

Tania Ocampo Ocampo, MC.
Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

El Campo Experimental “Zacatepec”, del INIFAP, inició un programa de mejoramiento genético de plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena (“nochebuena de sol”). Dicho programa requiere de la generación de una amplia base de datos fitosanitarios que permitan la liberación permanente de nuevas variedades e híbridos con tolerancia a las principales enfermedades. En México no hay con información sobre presencia de virus en nochebuena de sol, por lo que el objetivo de la presente investigación fue generar información de los virus asociados a esta planta. La identificación de estos patógenos se realizó mediante pruebas ELISA, inmunotiras y RT-PCR; adicionalmente, se inocularon plantas indicadoras y se hizo microscopía electrónica de transmisión. Con inmunotiras se detectaron los virus *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). La prueba DAS-ELISA confirmó la presencia de CMV, TMV y PnMV, pero no la del TSWV. Mediante RT-PCR se corroboró la infección de las plantas por TMV y PnMV. Las pruebas de transmisión a plantas indicadoras fueron negativas; y las células de hojas de nochebuena de sol con síntomas virales y que resultaron positivas a CMV y TMV con la prueba DAS-ELISA mostraron deformación y desorganización del sistema de tilacoides, y acumulación de lípidos y/o almidón. Con base en los análisis serológico y molecular se identifica por primera vez en México la presencia de PnMV en plantas de nochebuena de sol, siendo también un nuevo hospedero para el TMV. De acuerdo con la prueba DAS-ELISA, es posible considerar a la nochebuena de sol como un nuevo hospedante para el CMV.

Palabras clave: DAS-ELISA, RT-PCR, TMV, PnMV, nochebuena de sol.

**VIRUSES ASSOCIATED TO WILD POINSETTIA (*Euphorbia pulcherrima* Willd.
Ex Klotzch) IN MEXICO**

Tania Ocampo Ocampo, MC.
Colegio de Postgraduados, 2012

ABSTRACT

INIFAP Experimental Station in Morelos state started a genetic improvement program of wild and semi-cultivated poinsettia plants ("nochebuena de sol"). So, it is important to generate a phytosanitary database that allows the release of new varieties and hybrids tolerant to important diseases in poinsettia plants. The phytosanitary status of the "nochebuena de sol" plants is unknown in Mexico, so the objective of this research was to generate preliminary data about viruses associated to these materials. The identification of the pathogen was done by ELISA, immunostrips and RT-PCR, indicator plants inoculation, and transmission electron microscopy. The *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were identified by immunostrips. The DAS-ELISA test confirmed the occurrence of CMV, TMV, and PnMV but not TSWV. The molecular diagnosis corroborated the presence of TMV and PnMV. The virus transmission tests to indicator plants were not successful. Parenchyma cells of wild poinsettia leaves with viral symptoms and DAS-ELISA positive to CMV and TMV showed deformation and disruption of the thylakoid system as well as starch and / or lipid accumulation in chloroplasts. Based on the serological and molecular results, we reported for the first time the presence of PnMV y TMV in wild and semi-cultivated poinsettia plants from Mexico. According to the DAS-ELISA test, it is possible to consider that poinsettia is as a new host for CMV.

Key words: DAS-ELISA, RT-PCR, TMV, PnMV, Wild poinsettia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante mis estudios de Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas del Postgrado de Fitosanidad Fitopatología por permitirme iniciar mis estudios de maestría.

A mi consejo particular: Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, Dr. Sergio Ramírez Rojas y Dr. Cristian Nava Díaz por su guía y conocimientos brindados durante mi tesis.

A todos mis compañeros y amigos por compartir sus conocimientos y por su ayuda durante mi trabajo de investigación.

Al proyecto MOR-2009-C02-120661 financiado por FOMIX CONACYT-MORELOS.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 del Colegio de Postgraduados.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme un día más de vida.

A mi madre y hermanos por su apoyo, comprensión, preocupación hacia mi persona, y sobre todo por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A toda mi familia por su preocupación y apoyo recibido.

A Esteban por todos los momentos que hemos pasado juntos.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estados, municipios y delegaciones políticas productores de nochebuena en maceta en México.	3
Cuadro 2. Características de las bacterias reportadas a nivel mundial en nochebuena comercial.	4
Cuadro 3. Virus que han sido reportados en nochebuena comercial a nivel mundial.	9
Cuadro 4. Condiciones de amplificación de PCR para el gen de actina.	17
Cuadro 5. Condiciones de retrotranscripción con iniciadores universales para tobamovirus.	18
Cuadro 6. Condiciones de amplificación de PCR con iniciadores universales para tobamovirus.	18
Cuadro 7. Condiciones de amplificación de PCR para PnMV.	19
Cuadro 8. Condiciones de amplificación de PCR para CMV.	20
Cuadro 9. Virus detectados mediante la prueba serológica DAS-ELISA.	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hojas de nochebuena de sol con síntomas putativos de virus (A-E)	23
Figura 2. Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR para el gen de actina.....	24
Figura 3. Productos de amplificación obtenidos mediante RT- PCR para el género <i>Tobamovirus</i>	25
Figura 4. Productos de amplificación obtenidos mediante RT- PCR para PnMV.....	25
Figura 5. Producto de amplificación obtenido mediante RT- PCR para CMV	26
Figura 6. Fotomicrografías de células parenquimatosas de hojas de nochebuena de sol infectadas con CMV (A) y TMV (B).....	27

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
DEDICATORIA.....	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.3.1 Bacterias	4
2.3.2 Hongos	6
2.3.3 Oomicetos.....	8
2.3.4 Nematodos	9
2.3.5 Virus	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES.....	30
7. LITERATURA CITADA.....	31
8. ANEXOS	42

1. INTRODUCCIÓN

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch), perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es una planta de ornato utilizada en interiores en la época navideña. Es de origen mexicano y se cultivó desde la época de los aztecas, quienes la llamaron “cuetlaxochitl”. La planta se convirtió en un símbolo de la navidad a partir del siglo XVIII en las fiestas del santo pesebre en Taxco, Guerrero (García, 2008).

Joel Robert Poinsett, primer embajador de Estados Unidos de América (E.U.A.) en México, propagó la nochebuena y la introdujo a Carolina del Sur, donde se dispersó a diferentes lugares, incluyendo jardines botánicos (Ecke *et al.*, 1990; Grounds, 1965; Shanks, 1980). A principios del siglo XX, la empresa Ecke empezó la producción y mejoramiento genético de la nochebuena a partir de las plantas propagadas en Carolina del Sur (Ecke *et al.*, 1990).

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), a través del Campo Experimental “Zacatepec” en el estado de Morelos, inició un programa de mejoramiento genético de plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena (“nochebuena de sol”), con el objetivo de generar variedades mexicanas para no depender tecnológicamente de otros países y evitar la fuga de divisas que contribuyen en la disminución de los costos de producción al ofertar genotipos competitivos con precios accesibles. Dicho programa requiere de la generación de una amplia base de datos genéticos y fitosanitarios que permitan la formación permanente de nuevas variedades e híbridos según las exigencias del mercado, de tal manera que los materiales puedan garantizar un desarrollo homogéneo y rápido en las etapas iniciales de crecimiento, y presentar tolerancia a las principales plagas y enfermedades.

México no cuenta con información científica sobre el estado fitosanitario que guarda la nochebuena de sol, por lo que el objetivo de la presente investigación fue generar datos preliminares sobre los virus asociados a plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen de la nochebuena

La planta de nochebuena pertenece a la familia Euphorbiaceae y al género *Euphorbia* (Shanks, 1980), es originaria de América Central y de México, específicamente de las regiones montañosas y zonas subtropicales (Conzatti, 1988; Grounds, 1965; Vidalie, 1992). En México, la nochebuena se encuentra en forma silvestre en la vertiente Oeste de la Sierra Madre Occidental en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Martínez, 1995; Mayfield, 1997).

A principios de 1900, la familia Ecke vendió la nochebuena como flor de corte en California, E.U.A., y en 1923 la producción de la planta se obtuvo a partir de plántulas previamente seleccionadas con características más atractivas para el consumidor, las cuales eran de menor tamaño y con mayor ramificación (Ecke *et al.*, 1990).

2.2 Características generales e importancia económica de la nochebuena comercial

La nochebuena se caracteriza por su forma de arbusto y puede medir hasta 8 m de alto. Presenta grandes hojas alternas o verticiladas de forma dentada, las cuales son de color verde oscuro (Rodríguez, 1985). Las brácteas son de color rojo, amarillo y de otros colores dependiendo de la variedad (Grounds, 1965). El tallo es leñoso con ramas vigorosas y cilíndricas. Su inflorescencia es un ciatio compuesto por flores masculinas, una femenina y una glándula (Rodríguez, 1985). El fruto es una cápsula trilocular que contiene una semilla con un endospermo grasoso y carnoso (Larson, 1996). Las raíces son pivotantes en la nochebuena silvestre y adventicias en plantas comerciales reproducidas a partir de esquejes (Rodríguez, 1985).

La reproducción de la nochebuena en maceta es por medio de esquejes, lo cual requiere de por lo menos 12.5 horas continuas de luz para inducir la floración en la época de invierno (Martínez, 1995). En condiciones naturales la planta florece en el periodo de octubre a marzo (Shanks, 1980).

A nivel mundial, la nochebuena en maceta presenta una alta demanda en la época decembrina (Camacho *et al.*, 1989). La planta se ha propagado ampliamente y con rapidez en los E.U.A., Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega, Suecia, Gran Bretaña, Alemania, Francia, Costa Rica, Holanda y México (Vidalie, 1992).

La demanda de nochebuenas y las fuentes de empleo que genera, la convierten en una de las especies ornamentales de gran importancia económica en México. A nivel mundial se ubica en la cuarta posición, con una superficie cultivada de 320 hectáreas y genera aproximadamente 3,200 empleos directos y alrededor de 9,600 indirectos (SAGARPA, 2011).

A nivel nacional, los principales estados productores de nochebuena en maceta son Morelos, Puebla, Michoacán y el Distrito Federal (Cuadro 1), contribuyen con 41.4, 23, 19 y 10% de la producción nacional, respectivamente, lo que representa alrededor de 20 millones de plantas con un valor comercial de 700 millones de pesos (SAGARPA, 2011).

Cuadro 1. Estados, municipios y delegaciones políticas productores de nochebuena en maceta en México (SAGARPA, 2011).

Estado	Municipio
Morelos	Cuautla
	Jiutepec
	Cuernavaca
	Emiliano Zapata
	Tepoztlán
Puebla	Atlixco
Distrito Feral	Xochimilco
Estado de México	San Lorenzo
	Atlacomulco
Michoacán	Zitácuaro
Jalisco	Guadalajara

2.3 Principales enfermedades bióticas en la nochebuena comercial

Al igual que otras plantas ornamentales cultivadas bajo condiciones de invernadero, la nochebuena comercial no se encuentra libre de patógenos durante su desarrollo vegetativo, el cual inicia desde la propagación de la planta hasta su comercialización

(Ecke *et al.*, 1990). Durante este periodo, las plantas pueden ser infectadas por bacterias, hongos, oomicetos, nematodos y/o virus.

2.3.1 Bacterias

Las bacterias que infectan al cultivo de nochebuena son *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, *Pseudomonas cichorii*, *P. viridiflava*, *Xanthomonas campestris* pv. *poinsettiae* y *Pectobacterium* spp., además de un fitoplasma, el *Poinsettia branch-inducing Phytoplasma (PoiBI)* (Cuadro 2). A la fecha, ninguna de estas especies se ha registrado oficialmente infectando al cultivo de nochebuena en México.

Cuadro 2. Características de las bacterias reportadas a nivel mundial en nochebuena comercial.

Especie	Tinción Gram	Forma	Tamaño (µm)	Flagelos	Motilidad	Características de la colonia en medio de cultivo	Prueba de hipersensibilidad	Pruebas bioquímicas positivas	Referencias
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	+	Bastón	DN	Uno o dos polares o laterales	DN	NBY color amarillo-anaranjado	DN	Catalasa Rojo de metilo	Carlson y Vidavera, 1982; Chen <i>et al.</i> , 2007; Collins y Jones, 1983; Dye y Kemp, 1977
<i>P. cichorii</i>	-	DN	0.8 a 1.3	Polares	+	DN	+	Oxidasa	Aysan <i>et al.</i> , 2009; Pernezny y Raid, 2001
<i>P. viridiflava</i>	-	DN	DN	DN	DN	B de King fluorescente	+	Manitol Sorbitol Eritrol Sucrosa Citrato Ácido galacturónico L (-) lisina D (-) tartrato L (+) tartrato L (+) lactato D (-) lactato	Gitaitis <i>et al.</i> , 1998; Moretti <i>et al.</i> , 2012; Suslow y McCain, 1981
<i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiae</i>	-	DN	DN	DN	DN	Agar nutritivo mucoides de color amarillo	DN	Ureasa Aesculina Almidón Asparagina Catalasa Gelatina Tolerantes al cloruro de sodio al 2%	Hernández y Trujillo, 1999; Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Pectobacterium</i> spp.	-	DN	DN	DN	DN	CVP forman pequeños pozos	-	Glucosa	Bradbury, 1986; Kaneshiro <i>et al.</i> , 2008

DN. Datos no encontrados.

C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae (Starr & Pirone 1942) Dye & Kemp 1977

La bacteria se encuentra distribuida en Nueva Zelanda y E.U.A. (Dye y Kemp, 1977). Los síntomas iniciales de la enfermedad se presentan en el tallo como rayas alargadas, acuosas o pardas, las cuales se extienden hacia los peciolo y hojas. En las hojas las manchas son irregulares, se deforman y se caen. En las lesiones de los tallos y hojas se produce un exudado bacteriano de color ámbar (Daughtrey, 2001).

P. cichorii (Swingle 1925) Stapp 1928

Los síntomas son pequeñas manchas foliares acuosas de color marrón oscuro que cambian a una coloración negruzca cuando la lesión se agranda. En los tallos ocasiona pudrición y rayas de color marrón, las cuales se tornan negruzcas conforme se expande la enfermedad (Bradbury, 1986).

P. viridiflava (Burkholder 1930) Dowson 1939

Se encuentra distribuida en E.U.A. (Suslow y McCain, 1981). La bacteria induce canchros, manchas foliares y atizonamiento de brácteas y brotes (Suslow y McCain, 1981). El cancro se desarrolla a partir de las heridas realizadas por la poda en el tallo, teniendo una apariencia grasosa sin pudrición blanda; posteriormente, cuando la cutícula se desprende del tallo y se seca, se presenta una coloración marrón con una textura parecida al papel (Daughtrey, 2001). En las hojas se forman halos cloróticos alrededor de las manchas. En brácteas y brotes se observa una rápida necrosis y marchitamiento (Engelhard y Jones, 1990).

X. campestris* pv. *poinsettiaeicola (Patel *et al.*, 1951) Dye 1978

La bacteria se encuentra reportada en China, Italia, Nueva Zelanda y Venezuela (Hernández y Trujillo, 1999; Hill, 1979; Li *et al.*, 2006; Stravato *et al.*, 2004). Los síntomas iniciales que se observan en el tejido foliar son pequeñas lesiones irregulares, acuosas y de color gris a marrón rodeadas frecuentemente por un halo amarillo (Hill, 1979). Cuando la infección es severa ocasiona clorosis, distorsión de las hojas nuevas y abscisión de las hojas viejas (Chase, 1985).

***Pectobacterium* spp.**

Los esquejes, los cuales son muy susceptibles a *P. carotovora* y *P. chrysanthemi*, presentan una pudrición blanda a los 2 o 5 días después del enraizamiento (Daughtrey, 2001). La bacteria se propaga del tallo al ápice de forma rápida, cubriéndolo totalmente en 24 horas bajo condiciones óptimas (Martínez, 1995). Las plantas adultas presentan síntomas de marchitamiento, oscurecimiento, acuosidad de tallos y hojas, ennegrecimiento vascular y colapso (Hoitink y Daft, 1972).

Poinsettia branch-inducing Phytoplasma

El fitoplasma se ha reportado en E.U.A. (Lee *et al.*, 1997); induce acortamiento de entrenudos, deformación foliar (hojas menos lobuladas), aplanamiento de tallos, producción anormal del número de vértices en el ápice y proliferación de yemas florales (Chung y Choi, 2010; Mogens y Christensen, 2007).

2.3.2 Hongos

Hasta ahora, los reportes indican que los hongos *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Alternaria euphorbiicola*, *Oidium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Sphaceloma poinsettia* afectan los cultivos de nochebuena en México. Estas especies también se han reportado asociadas a este cultivo en otros países del mundo (Engelhard, 1987; García *et al.*, 2009; Heimann, 1987; Martínez *et al.*, 2004; Palmucci y Grijalba, 2005; Rubin, 1961; Wehlburg, 1968).

***Fusarium* spp.**

El hongo también se encuentra en E.U.A.; ataca la corona, tallo y raíz (Caesar, 1996). La infección empieza cuando las clamidosporas presentes en el suelo son diseminadas por el viento, insectos o por salpicaduras de agua de riego (Caesar *et al.*, 1998; Daughtrey, 2001; Kremer *et al.*, 2006). Al inicio de la enfermedad se observa marchitez de solo una rama y ennegrecimiento de los ápices (García, 2008). Los síntomas aparecen en cualquier etapa de desarrollo ocasionando marchitez, colapso y muerte de la planta (Molina, 2006). En las raíces provoca ennegrecimiento y ablandamiento del tejido (Agrios, 2010; Daughtrey, 2001).

B. cinerea Pers.:Fr.

En nochebuena se encuentra distribuido en Argentina y en E.U.A. (Engelhard, 1987; Palmucci y Grijalba, 2005). El hongo ataca la planta durante todas las fases de producción, afectando hojas, brácteas, corona y tallos con lesiones de color marrón a pardo, cubiertas con un micelio de color gris (Daughtrey, 2001; García, 2008; Palmucci y Grijalba, 2005). De acuerdo con Martínez *et al.* (2004), la infección en tallos ocurre cuando las hojas enfermas desarrollan hifas y son diseminadas, ocasionando necrosis y maceración del tejido. La liberación de los conidios se logra con mayor facilidad cuando el clima es húmedo y son esparcidos por el viento (Agrios, 2010).

A. euphorbiicola E. Simmons & Engelhard

En E.U.A. y México el hongo ocasiona la enfermedad conocida como mancha foliar por alternaria (Engelhard, 1987; García *et al.*, 2009). Los síntomas se manifiestan en brácteas, hojas, tallos e inflorescencias (Daughtrey, 2001). En hojas induce lesiones angulares o irregulares de 1-3 mm de diámetro con centros marrones rodeados de un halo clorótico que se expande a lo largo de las nervaduras cuando las manchas se agrandan. En casos severos ocasiona deformación y abscisión (Barreto y Evans, 1998; Engelhard y Schubert, 1985). Al inicio de la infección causa lesiones negras elípticas en las brácteas; estas lesiones son de 0.5 mm de diámetro, aunque pueden llegar a medir hasta 8 cm una vez que la infección se ha desarrollado (Engelhard y Jones, 1985). En los tallos induce manchas alargadas y hundidas de color marrón oscuro (Daughtrey, 2001; Engelhard y Jones, 1985).

***Oidium* sp.**

El hongo también se encuentra en E.U.A. y Puerto Rico ocasionando graves pérdidas económicas en la nochebuena de maceta (Byrne *et al.*, 2000; Celio y Hausbeck, 1997; Daughtrey y Hall, 1992; García *et al.*, 2009). En las brácteas, envés y haz de las hojas se producen manchas circulares blancas pulverulentas, las cuales coalescen para formar grandes extensiones atizonadas (Kim y Olson, 1994). En el haz se forman lesiones cloróticas (Celio y Hausbeck, 1998; Daughtrey, 2001).

***R. solani* Kühn**

El patógeno presenta una amplia distribución en E.U.A. y México (García *et al.*, 2009; Hwang y Benson, 2002), y su incidencia se favorece en suelos húmedos y climas calurosos (Bateman, 1961). Los síntomas de la enfermedad que induce son clorosis y marchitamiento foliar, y pudrición de tallo y raíz (Jones, 1990; Yuen y Masters, 1995). En la corona del tallo induce la formación de canchros pardos y en los tallos de las plantas viejas se desarrollan grietas longitudinales de apariencia seca. En las hojas ocasiona clorosis, marchitamiento y raquitismo de la planta (Daughtrey, 2001).

***S. poinsettiae* Jenk. & Ruehle**

En el cultivo de la nochebuena se encuentran reportes del patógeno en países como E.U.A., Brasil, Jamaica y Puerto Rico (Rubin, 1961; Wehlburg, 1968). El hongo, causante de la enfermedad conocida como roña de la nochebuena, induce lesiones en hojas y tallos (Engelhard, 1983; Rubin, 1961). En hojas, estas lesiones son de color marrón, circulares y con halo clorótico; son cóncavas en el haz y sobresalen en el envés (Alwadie y Baka, 2003). En tallos origina canchros de forma alargada o circular de 1-10 mm, rodeados por bordes de color rojo o púrpura (Jenkins, 1942; Wehlburg, 1968). Las lesiones pueden unirse y cubrir una gran porción del tallo hasta causar la muerte de la planta (Daughtrey, 2001; Ruehle, 1941).

2.3.3 Oomicetos

***Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitsp.**

La interacción nochebuena-oomiceto se ha reportado en los países de Argentina, Canadá y E.U.A. (Bolton, 1978; Moorman *et al.*, 2002; Palmucci y Grijalba, 2007). A la fecha no se tiene información sobre la presencia de este patógeno en cultivos de nochebuena en México. Se propaga de forma eficiente en invernaderos a través del riego, suelo, prácticas culturales, y a partir de macetas y material vegetal contaminado (Daughtrey, 2001; Sanogo y Moorman, 1993). Al inicio de la enfermedad, las plantas dejan de crecer originando muerte y defoliación cuando la enfermedad progresa (García, 2008). En la raíz causa pudrición, la cual avanza hasta el tallo formando un canchro en la base (Palmucci y Grijalba, 2007).

2.3.4 Nematodos

Meloidogyne spp.

En México no se tiene reportes del nematodo en plantas de nochebuena. Los síntomas que ocasionan son formación de agallas en las raíces, retraso en el crecimiento y marchitamiento (Daughtrey, 2001).

2.3.5 Virus

Los virus que se han encontrado en el cultivo de nochebuena comercial son *Euphorbia leaf curl virus* (ELCV), *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) y *Poinsettia latent virus* (PnLV) (Collins *et al.*, 2009; Fulton y Fulton, 1980; Koenig y Lesemann, 1980; Ma *et al.*, 2004) (Cuadro 3). En México no hay información sobre la presencia de estos virus en nochebuena.

Se conoce un cuarto virus: *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) que no se ha reportado en plantas comerciales de nochebuena. Sin embargo, el virus está presente en Brasil, Jamaica, México, Puerto Rico y Venezuela (Bird, 1971; Collins *et al.*, 2009; Costa y Bennett, 1950; Debrot y Centeno, 1985; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007) causando síntomas de mosaico amarillo, dorado o blanco entre o a lo largo de las nervaduras y distorsión foliar en plantas de *E. heterophylla* (Collins *et al.*, 2009; Costa y Bennett, 1950).

Cuadro 3. Virus que han sido reportados en nochebuena comercial a nivel mundial.

Virus	ELCV	PnMV	PnLV
Familia	Geminiviridae	Tymoviridae	No asignada
Género	<i>Begomovirus</i>	<i>Tymovirus</i> * ¹	<i>Polemovirus</i>
Genoma	ADN monopartita monocatenario	ARN monocatenario	ARN monocatenario
Partícula viral	Geminada	Isométricas de 26 y 29 nm diámetro	Isométrica de 34 nm diámetro

Transmisión	Mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	Mecánica	Puede ser transmitido por semilla
Referencias	Ma <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2011	Bradel <i>et al.</i> , 2000 ; Daughtrey, 2001; Fulton y Fulton, 1980; Koenig <i>et al.</i> , 1986	Koenig y Lesemann, 1980; Siepen <i>et al.</i> , 2005

*¹ Aunque pertenece al género *Tymovirus* tiene una estrecha relación con el género *Marafivirus* de acuerdo a la organización de su genoma (Bradel *et al.*, 2000).

Euphorbia leaf curl virus

Este virus se aisló por primera vez de plantas de nochebuena en Tianyang, Provincia de Guangxi, China. Induce síntomas de rizado de hojas y engrosamiento de nervaduras (Ma *et al.*, 2004).

Poinsettia mosaic virus

Tiene distribución mundial y ocasiona graves pérdidas en plantas de nochebuena comercial. Se identificó por primera vez en E.U.A y está registrado en Canadá, Australia, Alemania, Inglaterra, Corea, Japón, Noruega, Nueva Zelanda y Venezuela (Bradel *et al.*, 2000; Carballo *et al.*, 2001; Chiko, 1983; Chung *et al.*, 2004; Fulton y Fulton, 1980; Guy, 1985; Koenig y Lesemann, 1980; Lebas *et al.*, 2007; Lesemann *et al.*, 1983; Okano *et al.*, 2010; Spetz *et al.*, 2008).

El virus ocasiona distorsión en brácteas, moteado y mosaico en hojas superiores, y clorosis en las hojas senescentes (Carballo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2004; Fulton y Fulton, 1980; Gordon *et al.*, 1996). Los síntomas se presentan en primavera y otoño, enmascarándose en verano por las altas temperaturas y luminosidad (Albouy y Devergne, 1999).

Poinsettia latent virus

Anteriormente este virus era conocido como *Poinsettia cryptic virus* (PnCV). En Alemania e Italia se encuentra generalmente asociado con el PnMV en infecciones

complejas (Bellardi y Bertaccini, 1989; Koenig y Lesemann, 1980). PnLV no induce síntomas en nochebuena (Koenig y Lesemann, 1980).

2.4 Métodos para la detección de virus fitopatógenos

Actualmente, la detección de virus se basa en la integración y/o complementación de métodos que incluyen la observación de síntomas y exámenes microscópicos, así como técnicas más rápidas, específicas y sensibles como las serológicas y moleculares para obtener un diagnóstico confiable (Albouy y Devergne, 1999).

Inoculación en plantas indicadoras

El uso de plantas indicadoras sirve como complemento para el diagnóstico y confirmación de la naturaleza vírica de la enfermedad (Albouy y Devergne, 1999). La elección de las plantas se basa en la susceptibilidad que puedan tener ante cierto tipo de virus en condiciones experimentales y naturales (Jayasinghe y Chuquillanqui, 1992).

Las plantas indicadoras que se utilizan frecuentemente son *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* vc. *Samsun*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* vc. *Xanthi*, *Datura stramonium*, *Capsicum annum*, *Cucumis sativus* y *Solanum lycopersicum* (Hidalgo e Hidalgo, 2011; Sosa-Moss *et al.*, 1996).

Inclusiones virales

Las inclusiones son agregados de partículas virales, proteínas codificadas en el genoma del virus, componentes celulares de la planta hospedante, material inducido en la infección o la mezcla de todos estos elementos (Cárdenas, 1999; Edwardson y Christie, 1978). Por su localización dentro de las células, las inclusiones se pueden clasificar en citoplasmáticas, nucleares y nucleolares. Tienen formas cristalinas y amorfas (Cárdenas, 1999). Las cristalinas pueden ser hexagonales, piramidales, rectangulares, paracristalinas, etc. Las inclusiones amorfas son granulosas, fibrosas, vacuoladas, bandeadas, laminadas, densas o irregulares (Sosa-Moss *et al.*, 1996).

La distribución de las inclusiones en la planta dependerá de la interacción del virus con los tejidos (Cárdenas, 1999). No todas las células las tendrán cuando la infección inicia, pero conforme avanza la enfermedad la mayoría presentarán inclusiones (Bawden y Sheffield, 2008). Por medio de estas estructuras es posible determinar si una infección es causada por más de un virus (Pinto, 1993). Además, algunas inclusiones son específicas para cierto virus, lo que permite su clasificación parcial a nivel taxonómico (Cárdenas, 1999; Edwardson y Christie, 1978; Martelli y Russo, 1977).

Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión es un método que demuestra de forma contundente la presencia de virus en los tejidos vegetales (Albouy y Devergne, 1999). Permite conocer la forma y tamaño de las partículas virales, su localización en la célula, y describir las alteraciones ultraestructurales que inducen en sus hospedantes. Con estas características se puede clasificar a nivel taxonómico el patógeno (Albouy y Devergne, 1999; Brandes y Bercks, 1965; Van y Bouwen, 1995). Adicionalmente, la microscopía electrónica de transmisión es una herramienta complementaria en el estudio de la relación virus-vector, permite determinar la adecuada purificación del virus, detectar infecciones virales mixtas, y obtener información sobre el estudio de la replicación y traslocación del virus en las plantas hospedantes y en sus vectores (Baker *et al.*, 1985; Van y Bouwen, 1995).

Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas se basan en las propiedades antigénicas de las proteínas virales, anticuerpos y la interacción entre ellos, con el propósito de identificar y cuantificar los antígenos (Albouy y Devergne, 1999). Las pruebas serológicas utilizadas para detectar virus fitopatógenos se clasifican en: (1) Técnicas de aglutinación [aglutinación de cloroplastos, microaglutinación de bajo aceite, aglutinación en tubo, coaglutinación (PALLAS)], (2) Técnicas de neutralización de la infectividad, (3) Técnicas de precipitación [inmunodifusión doble o de Ouchterlony (ID), inmunodifusión radial o de Mancini (IR)], (3) Técnicas inmunoeléctroforéticas (inmunoeléctroforesis simple, inmunoeléctroforesis bidimensional o de Laurell, inmunoosmoforesis o inmunoeléctroforesis contracorriente), (4) Técnicas que

utilizan conjugados y fases sólidas [inmunofluorescencia (IF), inmunoradioensayo (RIA), inmunoenzimáticas (ELISA)] y (5) Técnicas mixtas o conjuntas [inmunoelectromicroscopía (IEM), inmunoelectrotransferencia (IET), inmunocaptura-PCR, inmuno-magneto reacción] (Llácer *et al.*, 2000).

Uno de los métodos serológicos más utilizado es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas con doble anticuerpo (DAS- ELISA), donde se utiliza el anticuerpo del virus unido a una fase sólida (placa de microtitulación de poliestireno). Posteriormente, se agrega la savia de la planta problema y un segundo anticuerpo del patógeno unido covalentemente a una enzima (conjugado enzimático). La presencia del complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo+enzima se pone de manifiesto por una reacción colorida que se presenta al aplicar un sustrato que es utilizado por la enzima conjugada al segundo anticuerpo (reacción positiva) (Albouy y Devergne, 1999; Clark y Adams, 1977). Las ventajas de la prueba ELISA con respecto a las demás técnicas serológicas radican en su mayor sensibilidad, se utiliza una pequeña cantidad de antisueros y los resultados son cuantitativos (Agrios, 2010); sin embargo, la prueba ELISA es menos sensible que las pruebas moleculares (Usta *et al.*, 2005); en especies herbáceas y leñosas es 625 veces menos sensible que la RT-PCR (Sánchez *et al.*, 1998). Albouy y Devergne (1999), mencionan que de acuerdo al tipo de virus a identificar se tiene una sensibilidad de 1-10 ng/ml. Otra desventaja es el tipo de tejido a analizar y la época de colecta de la muestra (Scott *et al.*, 1992; Uyemoto *et al.*, 1989).

Técnicas moleculares

Los recientes avances en las técnicas moleculares se están utilizando para generar herramientas rápidas, confiables y sensibles para la detección de virus fitopatógenos. Algunos de los métodos de diagnóstico se enuncian a continuación:

Extracción de ARN bicatenario

El genoma viral puede estar constituido por ARN monocatenario o bicatenario de sentido positivo o negativo (Chen, 2011). Los virus de ARN monocatenario generan una doble cadena de ácido nucleico durante su replicación y debido a que la doble cadena no se encuentra en las células vegetales sanas, este método de diagnóstico

es una forma conveniente para detectar la presencia de virus en las plantas (Dodds *et al.*, 1984; Morris y Dodds, 1979; Tzanetakis y Martin, 2008). Después de la extracción del ARN bicatenario se debe hacer la digestión enzimática para corroborar la naturaleza del producto obtenido y de esta manera eliminar la posibilidad de que se trate de ARN monocatenario (Jordan y Dodds, 1985; Monette *et al.*, 1989).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La PCR es un método de diagnóstico de alta sensibilidad. Vunsh *et al.* (1990), demostraron que la PCR es superior a los métodos serológicos para identificar virus en plantas. Cuando la RT-PCR es 100% eficiente a los 20 ciclos se obtiene una amplificación de un millón de veces de la cadena de ADN molde (McPherson y Moller, 2006). La reacción de RT-PCR puede ser inhibida por compuestos orgánicos e inorgánicos, principalmente cuando los tejidos vegetales contienen altas cantidades de proteínas o carbohidratos, los cuales pueden unirse a los iones magnesio ocasionando que no estén disponibles para la Taq polimerasa (Moreira, 1998; Queiroz *et al.*, 2001).

La RT-PCR consta de cuatro etapas: (1) Retrotranscripción, que consiste en sintetizar ADN a partir de una cadena de ARN, posteriormente genera una segunda formando una doble hélice de ADN, denominada ADN complementario (cADN). La enzima que cataliza la primera parte de este proceso recibe el nombre de ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa) (Ausina y Moreno, 2006). (2) Desnaturalización, en donde se separan las dos hebras de ADN a una temperatura de 94-95°C (Zavala, 2005). (3) Alineamiento, el oligonucleótido se une a su secuencia complementaria en el ADN complementario a una temperatura de 40-68°C, durante 20-40 segundos (Rodríguez y Barrera, 2004). (4) Elongación de la cadena, actúa la ADN polimerasa tomando el ADN molde para generar la cadena complementaria y a partir del oligonucleótido se inicia la síntesis del nuevo ADN. La temperatura para esta reacción depende de la ADN polimerasa que se use. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre 75-80°C, utilizando comúnmente 72°C (Zavala, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal

En 2010 y 2011 se colectaron plantas de nochebuena de sol con y sin síntomas atribuidos a virosis en los estados de Morelos, Guerrero, Distrito Federal, Michoacán, México, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Nayarit y Sinaloa. Se tomaron semillas, varetas y esquejes de unos 30 centímetros de largo, y se mantuvieron en papel periódico húmedo dentro de una hielera para su posterior traslado y establecimiento en el Campo Experimental “Zacatepec” del INIFAP (longitud 99° 12′02.9″, latitud 18°39′11.3″ a 911 msnm).

Establecimiento de plantas

Las varetas y esquejes colectados se enraizaron en macetas de 16 L con una mezcla de sustrato de ocochal, atocle y polvillo de coco (60:20:20 v/v). Las macetas se mantuvieron bajo una malla aluminizada para su posterior análisis e identificación de virus.

Inmunotiras

Como diagnóstico preliminar, se hizo la técnica de inmunotiras (Agdia®) específicas para *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), siguiendo el protocolo de Agdia®.

Prueba serológica DAS-ELISA

Para confirmar la presencia de los virus detectados con las inmunotiras y la del PnMV, reportado en nochebuena comercial, se realizó la prueba DAS-ELISA con los anticuerpos y conjugados correspondientes (Agdia®). Se evaluó tejido vegetal de 121 plantas sintomáticas y asintomáticas, según el protocolo de la empresa. Los valores de absorbancia de las muestras se midieron a los 45 y 60 minutos de incubación en un lector de placas ELISA (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que tuvieron valores de absorbancia mayores al promedio de los controles negativos más dos veces su desviación estándar (Sutula *et al.*, 1986).

RT-PCR

Los resultados positivos obtenidos a partir de las pruebas serológicas se corroboraron mediante RT-PCR. La extracción de ARN se realizó de acuerdo al protocolo de Harris (2002), con algunas modificaciones. En nitrógeno líquido se maceraron independientemente 250 mg de hoja, raíz y semilla. El macerado se colocó en un tubo eppendorf estéril con 500 µl de buffer salino de lavado (Anexo I). Las muestras se agitaron en un vórtex y se centrifugaron por 5 min a 14 000 rpm. Se decantó la fase acuosa de los sólidos sedimentados, se agregaron 600 µl de buffer CTAB (Anexo I), y se mezclaron con un vórtex. Las muestras se incubaron a 55°C durante 30 min y se adicionaron 400 µl de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló con vórtex para emulsificar y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se adicionó una mezcla de acetato de amonio 7.5 M: isopropanol en una proporción 1:10 según el volumen colectado.

Los tubos se mezclaron siete veces por inversión, se incubaron en hielo por 10 min y se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min para precipitar los ácidos nucleicos. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 1 min a 14 000 rpm. Se decantó el etanol y la pastilla de ARN se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua estéril libre de ARNsas en baño María a 55°C durante 15 min.

La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis a 90 V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Invitrogen®) en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). La calidad del ARN se cuantificó en un nanodrop® (ND - 1 000 V 3.2.1).

Previo a la identificación de los virus, se determinó la posible presencia de inhibidores, para lo cual se realizó la amplificación del gen de actina con los iniciadores Rc-actinFP y Rc-actinRP, los cuales amplifican un fragmento de 400 pb (Xu *et al.*, 2010) (Anexo II).

La RT se realizó con 2 µg de ARN, 1 µl de los iniciadores Rc-actinFP y Rc-actinRP a una concentración de 10 mM en un volumen final de 12 µl. La mezcla se incubó a 65°C por 10 min y se colocó en hielo. Posteriormente, se adicionó una mezcla de

reacción con 4 µl de buffer RT 5X, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de reversa transcriptasa M-MLV 200 U (Promega®). Las muestras se incubaron durante 60 min a 37°C y por 10 min a 70°C en un termociclador (Techne mod. TC 512).

La mezcla de PCR consistió en 5 µl de buffer de PCR 5X, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de los iniciadores Rc-actinFP y Rc-actinRP 10 mM, 0.5 µl de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®) y 5 µl de ADN en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación se indican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de amplificación de PCR para el gen de actina.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min	95°C
Desnaturalización	30	30 s	95°C
Alineamiento		40 s	57°C
Extensión		40 s	72°C
Extensión final	1	10 min	72°C

Como testigo positivo se utilizó el ARN de una hoja de higuera (*Ricinus communis*).

Tobamovirus

Debido a que los antisueros utilizados en la prueba DAS-ELISA para TMV pueden detectar otros virus del género *Tobamovirus* como el *Tomato mosaic virus* (ToMV) y el *Sunhemp mosaic virus* (SHMV), se decidió utilizar iniciadores universales para este género que amplifican un producto de 400 pb (Dovas *et al.*, 2004) (Anexo II).

La RT-PCR se realizó según el protocolo propuesto por Dovas *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Para la retrotranscripción del ARN, se utilizó una mezcla de reacción de 25 µl con 2.5 µl de Tris HCl pH 8.8 100 mM, 1.25 µl de KCl 1 M, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl de Triton X-100 al 1%, 0.6 µl de dNTP's 10 mM, 1.25 µl de DTT 100 mM, 1.25 µl de DMSO al 100%, 0.3 µl de inhibidor de ARNasa 40 U/µl (Roche®), 0.025 µl de Superscript II ARNasa H transcriptasa reversa 280 U (Invitrogen™), 0.2 µl de reversa transcriptasa M-MLV 40 U (Promega®), 2 µg de ARN de la muestra problema, y 2.5 µl de los iniciadores Tob RT up 1 y Tob RT do 2 10 µM (Anexo II).

La RT se realizó bajo las condiciones indicadas en el cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones de retrotranscripción con iniciadores universales para tobamovirus.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Retrotranscripción	1	60 min	43°C
Retrotranscripción	1	2 min	50°C
Desnaturalización	5	30 s	94°C
Alineamiento		30 s	43°C
Extensión		15 s	72°C
Desnaturalización	35	30 s	94°C
Alineamiento		30 s	46°C
Extensión		15 s	72°C
Extensión final	1	2 min	72°C

La PCR se hizo con 5 µl de ADN complementario, 2 µl de Tris HCl pH 8.8 100 mM, 1 µl de KCl 1 M, 1.2 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de Triton X-100 al 1%, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 0.16 µl de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®) y 2 µl de cada uno de los iniciadores TobN up3, TobN do4 y TobN do4G 10 µM (Anexo II) en un volumen final de 20 µl.

Las condiciones del termociclador para la amplificación del virus se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Condiciones de amplificación de PCR con iniciadores universales para tobamovirus.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	3 min	94°C
Desnaturalización	2	20 s	95°C
Alineamiento		15 s	51°C
Extensión		15 s	72°C
Desnaturalización	26	20 s	95°C
Alineamiento		26 s	61°C
Extensión		15 s	72°C
Extensión final	1	2 min	72°C

Como testigo positivo se incluyó ARN total obtenido de una hoja de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con TMV.

PnMV

Los iniciadores (PnMV-F y PnMV-R) (Anexo II), que amplifican un fragmento de 700 pb, se diseñaron a partir del genoma completo de PnMV (accesión NC_002164.1) con el programa NCBI/Primer-BLAST.

La RT se realizó con una mezcla de 12 µl con 2 µg de ARN y 1 µl de los iniciadores PnMV-F y PnMV-R 10 mM. Las muestras se incubaron a 65°C por 10 min, se transfirieron a hielo y se agregó una mezcla con 4 µl de buffer RT 5X, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de dNTP's 10 mM y 1 µl de reversa transcriptasa M-MLV 200 U (Promega®). Posteriormente, las muestras se incubaron en el termociclador a 42°C y 70°C por 60 y 10 min, respectivamente.

La PCR se hizo en una mezcla de 25 µl con 5 µl de buffer de PCR 5X, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de los iniciadores PnMV-F y PnMV-R 10 mM, 0.5 de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®) y 5 µl de ADN complementario. Las condiciones del termociclador se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones de amplificación de PCR para PnMV.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	2 min	94°C
Desnaturalización	35	30 s	94°C
Alineamiento		30 s	55°C
Extensión		60 s	72°C
Extensión final	1	7 min	72°C

Como control positivo se utilizó ARN obtenido de tejido liofilizado del control positivo para PnMV de Agdia®.

CMV

La RT-PCR se hizo con los iniciadores CMV1 y CMV2 (Singh *et al.*, 1995), que amplifican un producto de 500 pb (Anexo II).

La RT se realizó con 2 µg de ARN y 1 µl de los iniciadores CMV1 y CMV2 10 Mm mezclados en un volumen final de 11 µl. Las muestras se incubaron a 70°C por 10

min y se colocaron en hielo. Posteriormente, se agregó una mezcla que contenía 4 µl de buffer RT 5X, 1 µl de inhibidor de ARNasa 40 U/µl (Roche®), 2 µl de dNTP's 10 mM y 1 µl de reversa transcriptasa M-MLV 200 U (Promega®). Las muestras se colocaron en el termociclador, y se incubaron a 42°C y 70°C por 60 y 10 min, respectivamente.

La mezcla de PCR consistió de 5 µl de buffer de PCR 10X, 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de los iniciadores CMV1 y CMV2 10 mM, 0.25 de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®) y 9 µL de ADN complementario en un volumen de 58 µl. Las condiciones para la PCR se indican en el Cuadro 8 (Parrella y Sorrentino, 2009).

Cuadro 8. Condiciones de amplificación de PCR para CMV.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	3 min	92°C
Desnaturalización	35	1 min	95°C
Alineamiento		1 min	60°C
Extensión		1.5 min	72°C
Extensión final	1	7 min	72°C

Como positivo se utilizó ARN de tejido liofilizado del control positivo para CMV de Agdia®.

En todas las RT-PCRs se incluyó un control negativo consistente en una mezcla de reacción sin el templado de ADN complementario.

La electroforesis de todos los productos de RT-PCR (actina, CMV, tobamovirus y PnMV) se realizó en un gel de agarosa al 1.8% (p/v) disuelto en amortiguador TBE 1X a 90 V durante 40 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador (Gene Wizard, Syngene Bio Imaging) y se purificaron con el Wizard SV Gel y Sistema de limpieza de PCR (Promega®) siguiendo el protocolo de la empresa. La secuenciación de los amplicones se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Inoculación de plantas indicadoras

Como fuente de inóculo se utilizaron las hojas de nochebuena de sol que fueron positivas a CMV, TMV y PnMV con la prueba DAS-ELISA y que presentaron los mayores valores de absorbancia.

Las plantas utilizadas para PnMV fueron *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* (Chung *et al.*, 2004; Lebas *et al.*, 2007); para CMV, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. tabacum* cv. Samsun y *Solanum lycopersicum* (Afreen *et al.*, 2009; Zitikaité *et al.*, 2011); y para TMV, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi y *N. tabacum* cv. Samsun (Dovas *et al.*, 2004).

La inoculación de las plantas indicadoras se hizo mecánicamente. De manera independiente, el tejido foliar infectado con cada virus se maceró en una solución de amortiguador de fosfatos 0.01 M más ácido dietilditiocarbámico (DIECA) pH 7.2 en una proporción de 1:10 peso/volumen (Chung *et al.*, 2004). Sobre la superficie de las hojas de dos plantas (tres hojas por planta), se espolvoreó carborundum de 600 mallas y con un hisopo humedecido con el macerado se frotó la lámina foliar. La inoculación se hizo en los meses de octubre del 2011, y en febrero y marzo del 2012. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 10-35°C durante 45 días. Para verificar la presencia de los virus en las plantas inoculadas se hizo RT-PCR de las hojas que mostraron síntomas relativos a virus.

Microscopía electrónica

Se utilizaron hojas asintomáticas y sintomáticas positivas a CMV, TMV y PnMV con la prueba DAS-ELISA. Las hojas se disectaron en fragmentos de 1-2 mm² y se fijaron al vacío en glutaraldehído al 6% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2 (Anexo I) durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los fragmentos de hoja se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 durante 15 minutos en cada lavado, se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% preparado en amortiguador en fosfatos 0.1 M pH 7.2 durante 2 horas y se lavaron tres veces con el mismo amortiguador. Las muestras se deshidrataron gradualmente en alcohol etílico al 10, 30, 50, 70, 80, 90 y 100% durante 20 minutos en cada alcohol y se colocaron en mezclas de alcohol etílico absoluto: óxido de propileno (ACS[®]) en proporciones 2:1,

1:1 y 1:2 durante 15 minutos cada una. Posteriormente, se colocaron en dos cambios de óxido de propileno de 15 minutos cada uno y en tres mezclas de óxido de propileno: resina Embed 812 (Anexo I) en una relación 2:1, 1:1 y 1:2 durante 1 hora en cada mezcla. Finalmente, las muestras se colocaron en resina pura durante 24 horas a temperatura ambiente y en rotación constante, y se incluyeron en resina fresca durante 48 horas a 60°C. Las muestras se cortaron a 70 nm de grosor en la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Las secciones obtenidas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol Mod. JEM 1200 EX II a 60 Kv en las mismas instalaciones del IPN.

4. RESULTADOS

El material vegetal colectado mostró síntomas parecidos a los inducidos por virus, tales como clorosis, mosaico, variegado, deformación foliar y manchas blancas (Figura 1).

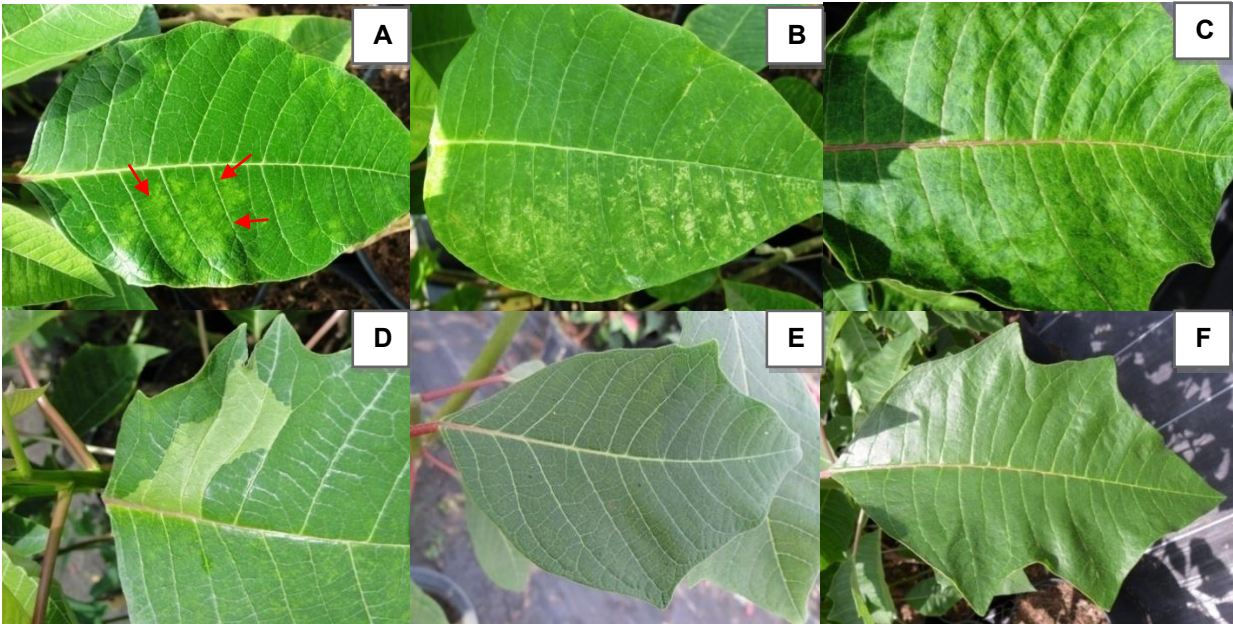


Figura 1. Hojas de nochebuena de sol con síntomas putativos de virus (A-E). A) Pequeñas manchas cloróticas, B) Manchas blancas, C) Mosaico, D) Variegado, E) Deformaciones, F) Hoja asintomática.

Inmunotiras

La técnica de inmunotiras indicó la presencia de los virus CMV, TMV y TSWV en dos plantas de nochebuena de sol con síntomas de clorosis y mosaico.

Prueba serológica DAS-ELISA

La prueba DAS-ELISA confirmó la presencia de los virus CMV, TMV y PnMV, pero no la del TSWV (Cuadro 9).

Cuadro 9. Virus detectados mediante la prueba serológica DAS-ELISA.

Virus	Proporción de plantas infectadas	Porcentaje de infección (%)
CMV	5/121	4.13
PnMV	15/121	12.4

TMV	48/121	40.5
TSWV	0 / 121	0

RT-PCR

Actina

Las muestras de ARN de las hojas y raíces de las plantas evaluadas presentaron los transcritos del gen de actina, ya que los iniciadores utilizados amplificaron una banda de aproximadamente 400 pb (Figura 2), cuya secuencia presentó un índice de similaridad del 96% con respecto a la secuencia de *R. communis* depositada en el GenBank (accesión XM_002522148.1).

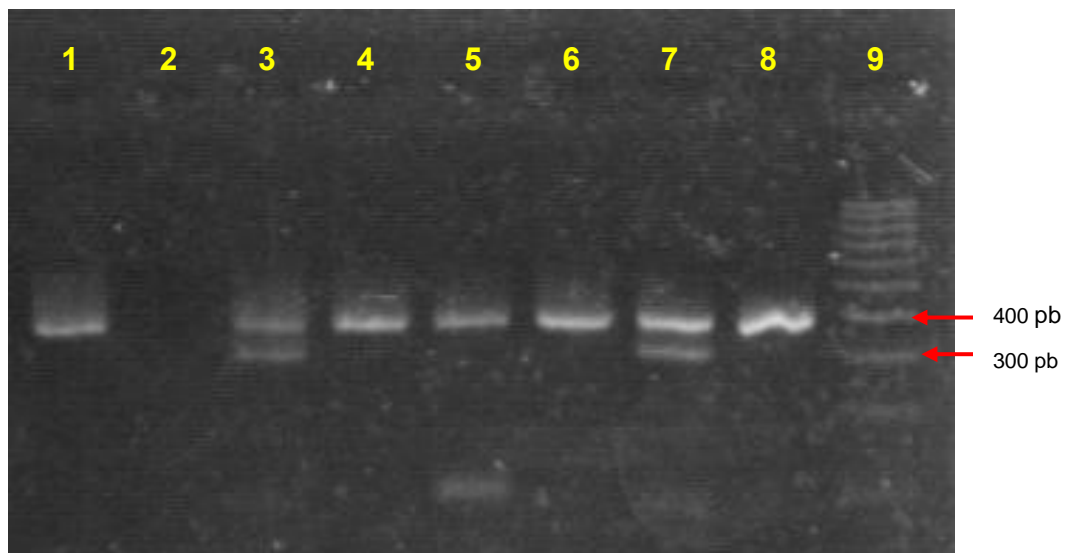


Figura 2. Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR para el gen de actina. Carril 1 control positivo (hoja de *Ricinus communis*); carril 2 Control negativo; carriles 3, 5 y 7 tejido foliar; carriles 4, 6 y 8 tejido radical; carril 9 marcador de peso molecular 100 pb (USB[®]).

Estos resultados sugieren la integridad del ARN y la ausencia de posibles inhibidores de la RT-PCR.

Virus

Los iniciadores universales para tobamovirus y para el virus PnMV amplificaron un fragmento de aproximadamente 400 y 700 pb, respectivamente (Figuras 3 y 4) (Anexo IV). Las secuencias de estos fragmentos fueron 88 y 96% similares a las

secuencias de TMV y PnMV reportadas en el GenBank, respectivamente, lo que confirma su presencia en el tejido foliar y radical de plantas de nochebuena de sol.

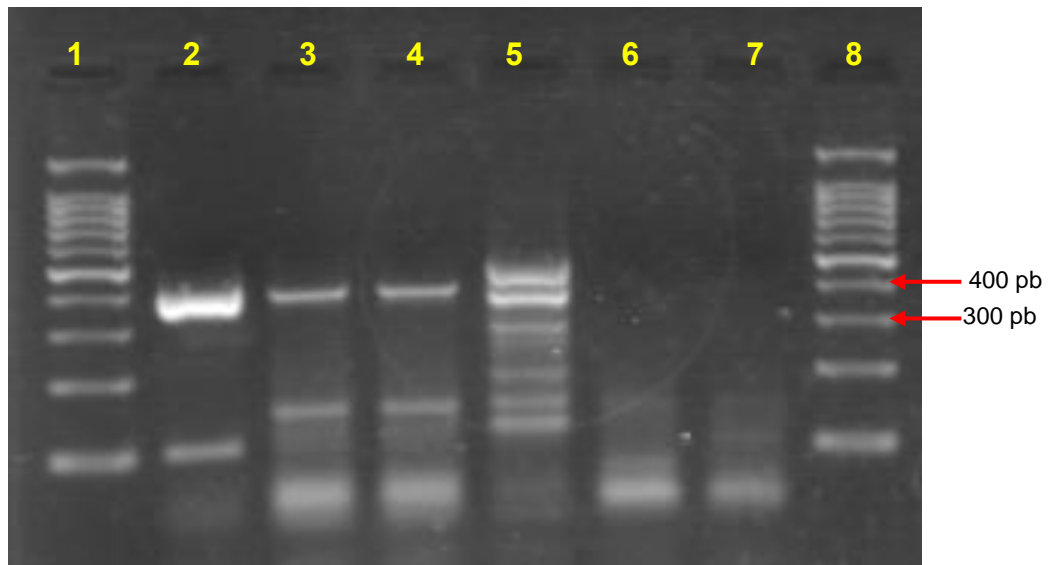


Figura 3. Productos de amplificación obtenidos mediante RT- PCR para el género *Tobamovirus*. Carriles 1 y 8 marcador de peso molecular 100 pb (USB[®]); carril 2 control positivo hoja de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con TMV; carriles 3 y 5 tejido foliar; carriles 4 y 6 tejido radical; carril 7 control negativo.

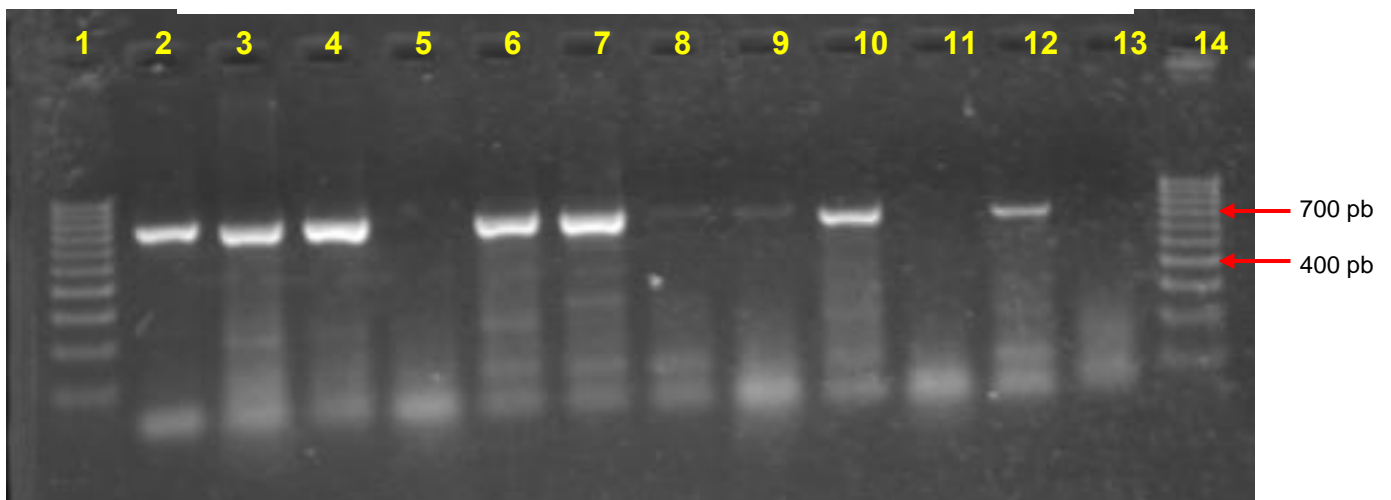


Figura 4. Productos de amplificación obtenidos mediante RT- PCR para PnMV. Carriles 1 y 14 marcador de peso molecular 100 pb (USB[®]); carril 2 control positivo PnMV (Agdia[®]); carriles 3, 5, 7, 9 y 11 tejido foliar; carriles 4, 6, 8, 10 y 12 tejido radical; carril 13 control negativo.

No se corroboró la presencia del CMV en las plantas de nochebuena de sol que fueron positivas para este virus con la prueba DAS-ELISA (Figura 5).

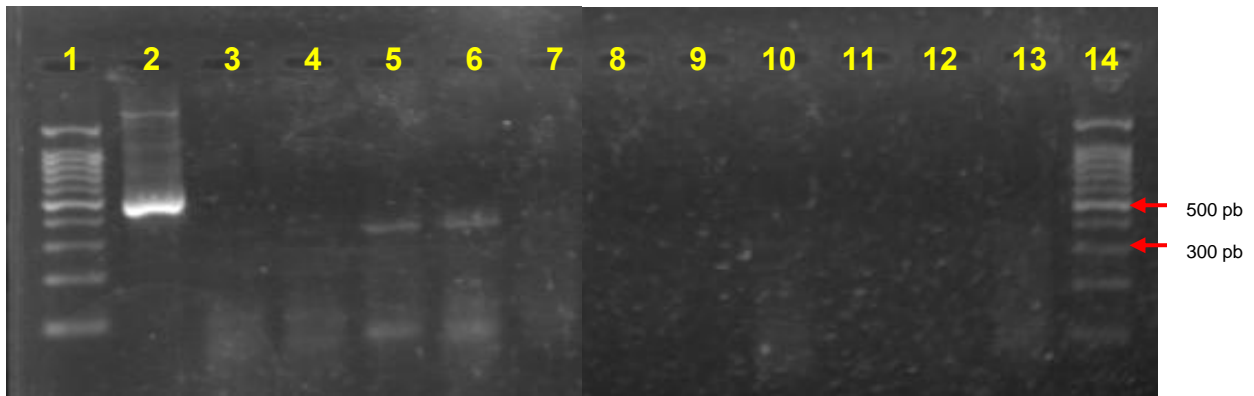


Figura 5. Producto de amplificación obtenido mediante RT- PCR para CMV. Control positivo de CMV (carril 2). Carriles 1 y 14 marcador de peso molecular 100 pb (USB®); carriles 3 - 6 semilla; carriles 8 - 12 tejido radical; carril 13 control negativo.

Inoculación de plantas indicadoras

Durante el tiempo en que se evaluaron las plantas inoculadas mecánicamente con CMV, TMV o PnMV se manifestaron síntomas de clorosis y manchas necróticas. Estas plantas se analizaron mediante RT-PCR para confirmar la presencia de los virus, pero en ningún caso hubo amplificación.

Microscopía electrónica

No se observaron partículas virales en las plantas infectadas con CMV, TMV ni PnMV. No obstante, los cloroplastos de las células de hojas con síntomas virales y que resultaron positivas a CMV y TMV con la prueba DAS-ELISA mostraron deformación y desorganización del sistema de tilacoides, así como acumulación de sustancias ergásticas que posiblemente correspondan a lípidos y/o almidón (Figura 6).

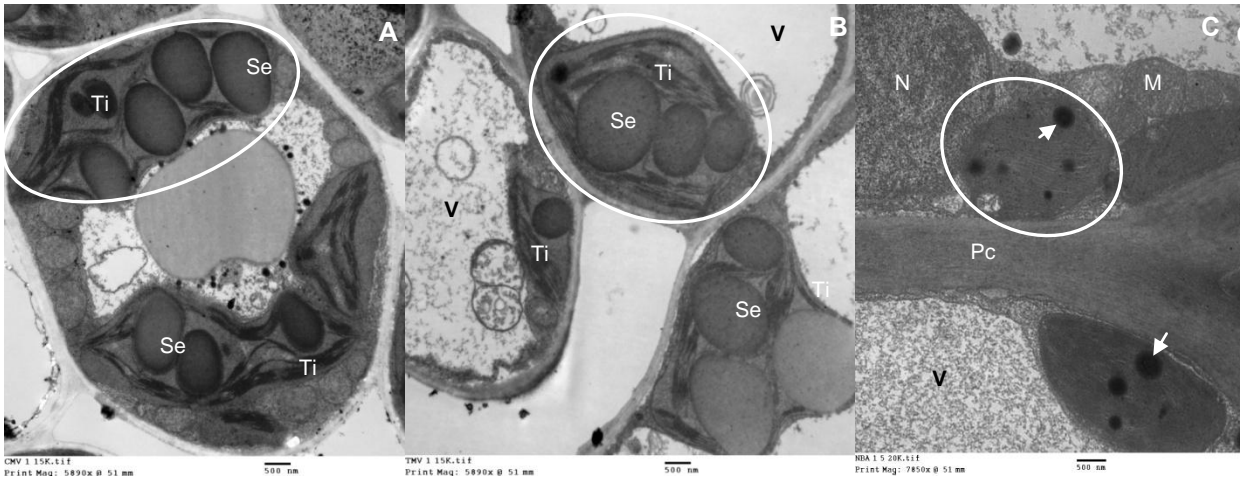


Figura 6. Fotomicrográficas de células parenquimatosas de hojas de nochebuena de sol infectadas con CMV (A) y TMV (B). Los cloroplastos (en el círculo) presentaron deformación y desorganización de tilacoides (Ti), así como acumulación de sustancias ergásticas (Se). Las células parenquimatosas de hojas asintomáticas (C) mostraron un sistema tilacoidal más abundante y gránulos esféricos de posible naturaleza lipídica (flechas). M = mitocondria, N = núcleo, Pc = pared celular, V = vacuola.

5. DISCUSIÓN

El rango natural de hospedantes del *Poinsettia mosaic virus* se restringe a especies del género *Euphorbia*, particularmente a la especie *E. pulcherrima*. El virus se ha reportado en E.U.A, Canadá, Australia, Alemania, Inglaterra, Corea, Japón, Nueva Zelanda, Noruega y Venezuela infectando plantas comerciales de nochebuena (Bradel *et al.*, 2000; Carballo *et al.*, 2001; Chiko, 1983; Chung *et al.*, 2004; Fulton y Fulton, 1980; Guy, 1985; Koenig y Lesemann, 1980; Lebas *et al.*, 2007; Lesemann *et al.*, 1983; Okano *et al.*, 2010; Spetz *et al.*, 2008). En esta investigación, los análisis serológico y molecular detectaron al PnMV en hojas de nochebuena de sol con síntomas de mosaico. La secuencia de las amplificaciones de la nochebuena de sol presentaron un porcentaje de similitud del 96-95% con los genomas reportados en Alemania (accesión AJ271595.1), Japón (accesión AB550788.1, AB550792.1, AB550791.1, AB550790.1 y AB550789.1) y Noruega (accesión AM412237.1).

Los resultados de RT-PCR también corroboraron la presencia del *Tobacco mosaic virus* en nochebuena de sol. Las secuencias de las amplificaciones obtenidas abarcaron las regiones conservadas de los genes RdRp del género *Tobamovirus* (Gibbs *et al.*, 1998) y se alinearon con dichas regiones en los genomas del TMV reportados en Ohio, E.U.A. (accesión FR878069.1) y Taiwán (accesión EF392659.1).

Aunque TMV infecta varias especies de plantas ornamentales como *Cyclamen persicum*, *Petunia hybrida* y *Eustoma grandiflorum*, entre otras, en las que induce síntomas de raquitismo, clorosis y mosaico (Alexandre *et al.*, 2000; Gera y Cohen, 1990; Kaminska, 1975), a la fecha no se tenía información en donde se reportara a la nochebuena como hospedante de este virus.

El rango de hospedantes del *Cucumber mosaic virus* en plantas ornamentales es muy amplio. Se ha reportado en algunas plantas como *Asclepias curassavica*, *Gladiolus*, *Pelargonium* spp. y *Lilium* spp. induciendo síntomas de mosaico, moteado y achaparramiento (Dubey *et al.*, 2008; Gera, 1994; Mahinghara *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2006). En este trabajo, el virus se detectó serológicamente en nochebuena de sol, pero no se confirmó su presencia mediante RT-PCR. El CMV se divide en los

subgrupos I y II, los cuales se distinguen mediante el análisis de sus secuencias y relaciones serológicas (Afreen *et al.*, 2009). Es posible que el virus que se detectó serológicamente en las plantas evaluadas corresponda a un subgrupo para el cual los iniciadores utilizados no fueron específicos, lo que podría explicar la ausencia de amplicones en la prueba molecular. Si bien no se tienen las evidencias moleculares que asocien la presencia del CMV con los síntomas de clorosis observados en las plantas de nochebuena de sol, el análisis mediante la prueba DAS-ELISA sugiere que el virus está presente en esta planta, por lo que se recomienda utilizar iniciadores que se diseñen a partir de secuencias conservadas en los grupos mencionados.

Las plantas indicadoras inoculadas con CMV, TMV o PnMV mostraron síntomas putativos a virus tales como manchas necróticas y clorosis, pero no se corroboró su presencia mediante el análisis molecular, lo que sugiere que los virus no se transmitieron. Sin embargo, debe mencionarse que dicho análisis se hizo únicamente con tejido foliar, y debido a que algunos virus presentan movimiento sistémico se recomienda analizar las raíces de las plantas inoculadas para corroborar los resultados (Jung *et al.*, 2002; Kelaniyangoda y Madhubashini, 2008).

También es probable que la falta de transmisión se haya debido a que las partículas se agregaron y precipitaron porque el pH y la fuerza iónica del medio de homogenización utilizado no fue el adecuado (Kado, 1972). Para la inoculación mecánica del CMV se sugiere trabajar con un amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M con 2-mercaptoetanol al 0.02% pH 7.0 (Zitikaité *et al.*, 2011), para TMV se ha utilizado amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7.0 (Adkins *et al.*, 2003) y para el PnMV amortiguador de fosfatos 0.03 M a pH 8.0 (Fulton y Fulton, 1980; Chiko, 1983; Spetz *et al.*, 2008).

Es importante mencionar que algunos factores intrínsecos a la planta y/o al virus probablemente estén también involucrados con la falta de transmisión. Es posible que la concentración del virus en la planta de nochebuena a partir de la cual se obtuvo el inóculo haya sido muy baja; que la etapa fenológica de la planta indicadora no haya sido la adecuada al momento de la inoculación; o que la presencia de algún metabolito secundario en la planta donadora y/o en las receptoras haya actuado como inhibidor de la infección. También debe considerarse que las condiciones

ambientales presentes antes, durante y después de la inoculación pueden determinar el éxito de la transmisión, infección y manifestación de síntomas (Kado, 1972; Kelaniyangoda y Madhubashini, 2008).

Uno de los síntomas más comunes inducidos por virus fitopatógenos está asociado con alteraciones estructurales en los plastidios, principalmente en los cloroplastos, en donde ocurre la fotosíntesis dado que los pigmentos fotosintéticos se localizan en los tilacoides (Handford y Carr, 2007; Soll y Schleiff, 2004).

El síntoma de clorosis en las hojas de nochebuena de sol con síntomas virales pudo deberse a la pérdida de clorofila, deformación y desorganización de los tilacoides, como se ha reportado en plantas infectadas por TMV, en donde la proteína de la cápside se asocia con tales membranas (Banerjee y Zaitlin, 1992; Reiner y Beachy, 1989). Es probable también que estos síntomas se asocien con la replicación del virus y la síntesis de la proteína viral, lo cual ocasiona un incremento de la actividad de las enzimas que intervienen en la ruta pentosa fosfato y NADP-dependiente de la enzima málica, el aumento de la actividad fotosintética de la célula y la acumulación de sustancias ergásticas como el almidón en plantas infectadas por CMV (Técsi *et al.*, 1994; Técsi *et al.*, 1996).

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis serológico y molecular, se reporta en México la presencia del PnMV en plantas de nochebuena de sol.

Conforme a los análisis serológico y molecular, se reporta a la nochebuena de sol como un nuevo hospedante para el virus TMV.

Con base en la prueba DAS-ELISA, es posible considerar a la nochebuena de sol como un nuevo hospedante para el virus CMV.

7. LITERATURA CITADA

- Adkins, S., Kamenova I., Achor D. and Lewandowski D. J. 2003. Biological and molecular characterization of a novel tobamovirus with a unique host range. *Plant Disease*. 87:1190-1196.
- Afreen B., Khan A. A, Naqvi Q. A., Kumar S., Pratap D., Snehi S. K. and Raj S. K. 2009. Molecular identification of a *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolate from carrot (*Daucus carota*) based on RNA3 genome sequence analyses. *Journal of Plant Diseases and Protection*.116: 193–199.
- Agrios, G. N. 2010. *Fitopatología*. 2ª edición. Editorial Limusa. México. 856 p.
- Albouy, J. y Devergne J. C. 1999. *Enfermedades producidas por virus de las plantas ornamentales*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 480 p.
- Alexandre, M. A. V., Soares R. M., Rivas E. B., Duarte L. M. L., Chagas C. M., Saunal H., Van Regenmortel M. H. V. and Richtzehain L. J. 2000. Characterization of a strain of Tobacco mosaic virus from *Petunia*. *Journal of Phytopathology*. 148: 601-607.
- Alwadie, H. and Baka A. M. Z. 2003. New records of fungal pathogens of *Euphorbia inarticulata* from aseer region, South-West Saudi Arabia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 36: 195 – 209.
- Ausina, R. V. y Moreno G. S. 2006. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1595 p.
- Aysan, Y., Mirik M. and Sahin F. 2009. First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* on *Schefflera arboricola* in Turkey. *Plant Disease*. 93: 848.
- Baker, K. K., Ramsdell C. D. and Gillett M. J. 1985. Electron Microscopy: Current Applications to Plant Virology. *Plant Disease*. 69:85-90.
- Banerjee, N. and Zaitlin M. 1992. Import of *Tobacco Mosaic Virus* Coat Protein into Intact Chloroplasts In Vitro. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.5: 466-471.
- Barreto, R. W. and Evans H. C. 1998. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia*. 141: 21–36.
- Bateman, D.F. 1961. The effect of soil moisture upon development of poinsettia root rots. *Phytopathology*. 51: 445-451.
- Bawden, F. C. and Sheffield F. M. L. 2008. The intracellular inclusions of some plant virus diseases. *Annals of Applied Biology*. 26:102–115.
- Bellardi, M. G. and Bertaccini A. 1989. Virus diseases of ornamental shrubs. III. Angular mosaic of *Euphorbia fulgens*. *Phytopathologia Mediterranea*. 28: 79-82.

Bird J, S. J. 1971. Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 55: 461–7.

Bolton, A. T. 1978. Sudden wilting of Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) caused by *Pythium aphanidermatum*. *Canadian Journal of Plant Science*. 58: 569-570.

Bradbury, J. F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International, Wallingford, UK. 332 p.

Bradel, B. G., Preil W. and Jeske H. 2000. Sequence Analysis and Genome Organisation of Poinsettia Mosaic Virus (PnMV) Reveal Closer Relationship to Marafiviruses Than to Tymoviruses. *Virology*. 271: 289-297.

Brandes, J. and Bercks R. 1965. Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Advances in Virus Research*. 11:1-24.

Byrne, J. M., Hausbeck M. K. and Shaw B. D. 2000. Factors affecting concentrations of airborne conidia of *Oidium* sp. among poinsettias in a greenhouse. *Plant Disease*. 84:1089-1095.

Caesar, J. A. 1996. Identity, pathogenicity, and comparative virulence of *Fusarium* spp., related to stand declines of leafy spurge (*Euphorbia esula*) in the northern plains. *Plant Disease*. 80: 1395–1398.

Caesar, J. A., Campobasso G. and Terragitti G. 1998. Identification, pathogenicity and comparative virulence of *Fusarium* spp. associated with diseased *Euphorbia* spp. in Europe. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 313-319.

Camacho, R. J. F., Cortéz D. B., García H. G., López V. M. y Plata C. J. 1989. Situación actual y perspectivas de la floricultura en el Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Fitotecnia. Chapingo, México. 86 p.

Carballo, O., Izaguirre M.L. and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting Poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease*. 85: 1208.

Cárdenas, S.E. 1999. Diagnostico de virus mediante inclusiones virales, microscopia electrónica y rango de hospedantes. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 147 p.

Carlson, R. and Vidavera K. 1982. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32: 15-326.

Celio, G. J. and Hausbeck M. K. 1997. Evaluation of poinsettia cultivars for susceptibility to powdery mildew. *Horticultural Science*. 32: 259-261.

- Celio, G. J. and Hausbeck M. K. 1998. Conidial germination, infection structure formation, and early colony development of powdery mildew on poinsettia. *Phytopathology*. 88: 105-113.
- Chase, A. R. 1985. Bacterial leaf spot of *Codiaeum variegatum* cultivars caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Poinsettiicola*. *Plant Pathology*. 34: 446-448.
- Chen, Y. F., Yin Y. N., Zhang X. M. and Guo J. H. 2007. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, a new pathovar of pathogens in sugar beet. *Plant Disease*. 91: 677-684.
- Chen, J. 2011. *Experimental Plant Virology. Editorial Advanced Topics in Science and Technology in China - Springer*. Berlin, Alemania. 270 p.
- Chiko, A. W. 1983. Poinsettia mosaic virus in British Columbia. *Plant Disease*. 67:427-428.
- Chung, B. N., Lee E. K., Jeong M. I. y Kim H. R. 2004. First Report on *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 20: 220-223.
- Chung, B. N. and Choi G. S. 2010. Occurrence of Poinsettia Stem Flat Disease Caused by *Phytoplasma* in Korea. *Plant Disease*. 94: 792.
- Clark, M. F. and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 475-483.
- Collins M.D. and Jones D. 1983. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsem'ae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *Journal of General Microbiology*. 129: 3545-3548.
- Collins, M. A., Brown K. J., Rehman M. M. y Roye E. M. 2009. Complete nucleotide sequence of an isolate of *Euphorbia mosaic virus* that infects *Euphorbia heterophylla* and *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Archives of Virology*. 154: 1859–1860.
- Conzatti, C. 1988. Flora taxonómica mexicana. Volumen I. Editorial Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F. 220 p.
- Costa, A. S. and Bennett C. W. 1950. White-fly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*. 40: 266-283.
- Daughtrey, M. L. and Hall J. 1992. Powdery mildew: A new threat to your poinsettia crop. *Grower Talks*. 23-31 pp.
- Daughtrey, M. L. 2001. Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 90 p.
- Debrot, E. y Centeno F. 1985. Ocurrencia del virus mosaico de las euforbiáceas infectando a *Euphorbia heterophylla* L. en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 35: 5 -12.

- Dodds, J. A., Morris T. J. and Jordan R. L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. Annual Review of Phytopathology. 22: 151-168.
- Dovas, C. I., Efthimiou K. and Katis N. I. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dl-containing primers along with homologous dG-containing primers. Journal of Virological Methods .117: 137–144.
- Dubey, V.K., Aminuddin, Singh V. P. 2008: First report of a subgroup IA *Cucumber mosaic virus* isolate from gladiolus in India. Australasian Plant Disease. 3: 35-37.
- Dye, D. W. and Kemp. W. J. 1977. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. New Zealand Journal of Agricultural Research. 20: 563-582.
- Ecke, P. Jr., Matkin O. A. and Hartley D. E. 1990. The poinsettia manual. 3rd ed. Editorial Paul Ecke Poinsettia. Encinitas, California, USA. 267 p.
- Edwardson, J. R. and Christie R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. Annual Review of Phytopathology. 16: 31-55.
- Engelhard, A. W. 1983. Chemical control of scab (*Sphaceloma poinsettiae*) on outdoor grown poinsettia plants in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. Soc. 96: 285-287.
- Engelhard, A. W. 1987. Foliage disease management on poinsettia plants. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 100: 364-368.
- Engelhard, A. W. and Jones J. B. 1985. A leaf, petiole and stem lesion disease of poinsettia incited by *Alternaria* sp. Phytopathology. 75: 1306.
- Engelhard, A. W. and Jones J. B. 1990. Stem canker and leaf spot of poinsettia caused by *Pseudomonas viridiflava* in Florida. Plant Disease.74: 528-529.
- Engelhard, A. W. and Schubert T. S. 1985. *Alternaria* blight of poinsettia. Plant Pathology. 277: 1-3.
- Fulton, R. W. and Fulton, J. L. 1980. Characterization of a tymolike virus common in poinsettia. Phytopathology 70: 321-324.
- García, A. 2008. Producción de Nochebuena planta terminada. *In: Memoria del 7° Simposium Internacional de Viverismo del 28-31 de agosto de 2008.*; F. Osuna C.; F. García P.; S. Ramírez R.; L. Granada C. y D. Galindo García (eds.). 63-77 pp.
- García P., F., Ramírez R. S., Osuna C. F. J., y Ocampo O. T. 2009. Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Folleto Técnico No.39. Zacatepec, Morelos, México. 30 p.

Gera, A. and Cohen J. 1990. The natural occurrence of bean yellow mosaic, cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in lisianthus in Israel. *Plant Pathology*. 39:561-564.

Gera, A. 1994. The natural occurrence of Cucumber mosaic virus in ornamental in Israel. *Acta Horticulture*. 377: 99-106.

Gibbs, A., Armstrong J., Mackenzie A. M. and Weiller G. F. 1998. The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridisation-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *Journal of Virological Methods*.74:67–76.

Gitaitis, R., MacDonald G., Torrance R., Hartley R., Sumner D. R., Gay J. D. and Johnson W. C. 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: II. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. *Plant Disease*. 82:935-938.

Gordon, D., Morrison B. C. and Teakle D. S. 1996. Poinsettia mosaic virus-first record in Queensland. *Australasian Plant Pathology*. 25: 145.

Grounds, B. 1965. Poinsettia culture. Agricultural Extension Service. Yuma, Arizona. 4 p.

Guy, P. 1985. New plant disease record in Tasmania: Poinsettia Mosaic Virus. *Australasian Plant Pathology*. 14: 12-13.

Handford, G. M. and Carr P. J. 2007. A defect in carbohydrate metabolism ameliorates symptom severity in virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Virology*. 88: 337–341.

Harris, A. 2002. Nepoviruses and Their Diagnosis in Plants: a Novel Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test for Nepoviruses in Nursery Stock. *Biosecurity Australia*. 110 p.

Heimann, M. F. 1987. Basal Stem Canker of Poinsettia Caused by *Fusarium solani* in Wisconsin. *Plant disease*. 71:469.

Hernández, Y. y Trujillo G. 1999. Bacterial disease of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzch) in La Victoria, Aragua state, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 25: 17–28.

Hernández-Zepeda, C., Idris A. M., Carnevali G., Brown J. K. and Moreno-Valenzuela O. A. 2007. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology*.56:763–770.

Hidalgo, F. C. L. y Hidalgo T. J. 2011. *II Tratado de Viticultura*. 4^a edición. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 2065 p.

Hill, C.F. 1979. New plant disease records in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 22: 641-645.

Hoitink, H. A. J. and Daft G. C. 1972. Bacterial stem rot of poinsettia, a new disease caused by *Erwinia carotovora* var. differentiation among isolates of *Erwinia carotovora* from potato and Chrysanthemi. *Plant Disease*. 56:480-484.

Hwang, J. and Benson D. M. 2002. Biocontrol of Rhizoctonia stem and root rot of poinsettia with Burkholderia cepacia and binucleate Rhizoctonia. *Plant Disease*. 86:47-53.

Jayansinghe, U. y Chuquillanqui C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus de papa. *Guía de investigación 21*. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 28 p.

Jenkins, A. E. 1942. Poinsettia scab discovered in Honolulu. *Phytopathology*. 32: 336-337.

Jung, H. W., Yun W. S., Hahm Y. I. and Kim, K.-H. 2002. Characterization of *Tobacco mosaic virus* isolated from potato showing yellow leaf mosaic and stunting symptoms in Korea. *Plant Disease*. 86:112-117.

Jones, R. K. 1990. Poinsettia diseases and their management. *North Carolina Flower Growers' Bulletin*. 35: 6-11.

Jordan, R. L. and Dodds I. A. 1985. Double-stranded RNA in detection of diseases of known and unproven viral etiology. *Acta Horticulturae*. 164: 101-108.

Kado, C. I. 1972. Mechanical and biological inoculation principles. *In: Principles and Techniques in Plant Virology*; Kado, C. I. and Agrawal H. O. (eds.). 3-31 pp. Van Nostrand Reinhold Company. New York, U.S.A. 688 pp.

Kelaniyangoda, D. B and Madhubashini L. W. M. 2008. Indicator plants: Tools for Detecting *Papaya Ring Spot Potyvirus* and *Cucumber Mosaic Cucumovirus*. *Journal of Food and Agriculture*. 1:64-69.

Kaminska, M. 1975. Susceptibility of cyclamen to certain viruses. *Prace Instytutu Sadownictwa w Skierniewicach Series B*.1:167-172.

Kaneshiro, W. S., Burger M., Vine B. G., de Silva A. S. and Álvarez A. M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. *Plant Disease*. 92: 1444-1450.

Kim, S. H. and Olson T. N. 1994. Morphology of powdery mildew on poinsettias. *Phytopathology* 84: 544.

Kremer, J. R., Caesar J. A. and Souissi T. 2006. Soilborne microorganisms of Euphorbia are potential biological control agents of the invasive weed leafy spurge. *Applied Soil Ecology*. 32: 27-37.

- Koenig, R. and Lesemann, D. E. 1980. Two isometric viruses in poinsettias. *Plant Disease*. 64: 782-784.
- Koenig, R., Lesemann D. E. and Fulton R. W. 1986. Poinsettia mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 311.
- Larson, R. A. 1996. Introducción de la floricultura. 3^{ra} ed. Editorial AGT. D.F., México. 115 p.
- Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona F. M., Elliott D. R., Tang J. Z. and Alexander B. J. R. 2007. Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. In New Zealand. *Plant Disease*. 91: 110.
- Lee, I.M., Klopmeier M., Bartoszyk I. M., Gundersenrindal D. E., Chou T. S., Thomson K. L. and Eisenreich R. 1997. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology*. 15: 178-182.
- Lesemann, D.-E., Koenig R., Huth W., Brunt A. A., Phillips S. and Barton R. J. 1983. Poinsettia mosaic virus: A tymovirus?. *Phytopathology*. 107:250-262.
- Li, B., Xie G. L. and Swings J. 2006. First report of leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* on poinsettia in China. *Plant Pathology*. 55: 293.
- Llácer, G., López M.M., Trapero A. y Bello A. 2000. Patología Vegetal. Tomo I. 2^a edición. Editorial PHYTOMA, Sociedad Española de Fitopatología, Mundi-Prensa. España. 695 p.
- Ma, X. Y., Cai J. H., Li G. X., Qin B. X. and Zhou X. P. 2004. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal Phytopathology*. 152:215–218.
- Mahinghara, B.K., Singh A.K., Hallan V., Ram R., Zaidi A.A. 2010. Analysis of the coat protein gene and untranslated region of RNA3 of *Cucumber mosaic virus* isolates infecting various *Lilium* species and hybrids: association of the isolate infecting Asiatic Hybrid lily with subgroup II. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 43: 826-848.
- Martelli, G. P. and Russo M. 1977. Plant virus inclusion bodies. *Advances in Virus Research*. 21:175-266.
- Martínez, F. 1995. Manual práctico de la producción de nochebuena. Consultora Oasis. Jiutepec, Morelos, México. 87 p.
- Martínez, F. E., Cárdenas S. E. y Zavaleta M. E. 2004. Infección de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. en dos cultivares de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzch. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 290-298.
- Mayfield, M. H. 1997. A systemic treatment of *Euphorbia* subgenus *Poinsettia* (Euphorbiaceae). UMI Dissertation Services. 229 p.

- McPeherson, M. and Moller S. 2006. PCR. Segunda edición. Editorial Taylor y Francis Group. Cornwall, UK. 292 p.
- Mogens, N. and Christensen N. M. 2007. Phytoplasma induced changes in gene expression in poinsettia. *Bulletin of Insectology*. 60: 215-216.
- Molina, S.E. 2006. Manejo de plagas del follaje y patógenos de suelo del cultivo de Pascua (*Euphorbia pulcherrima* Willd ex. Klotzsch) para exportación de esquejes, en la empresa Paul Ecke de Guatemala S.A., San Juan Alotenango Sacatepéquez. Universidad de San Carlos de Guatemala. 102 p.
- Monette, P.L., James L. and Godkin E. S. 1989. Double-stranded RNA from rupestris stem pitting-affected grapevines. *Vitis*. 28:137-144.
- Moorman, G. W., Kang S., Geiser D. M., Kim S.H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant Disease*. 86:1227–1231.
- Moreira, D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*. 26: 3309–3310.
- Moretti, C., Fakhr R. and Buonauro R. 2012. *Calendula officinalis*: A New Natural Host of *Pseudomonas viridiflava* in Italy. *Plant Disease*. 96: 285.
- Morris, T. J. and Dodds J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.
- Okano, Y., Maejima K., Shiraishi T., Hashimoto M., Senshu H., Ozeki J., Takahashi S., Komatsu K., Yamaji Y. and Namba S. 2010. Genetic heterogeneity found in the replicase gene of poinsettia mosaic virus isolates. *Archives of Virology*. 155: 1367-1370.
- Palmucci, H. E. and Grijalba P. E. 2005. Leaf Spot and Stem Blight Caused by *Botrytis cinerea* on Poinsettia in Argentina. *Plant Disease*. 89: 1359.
- Palmucci, H. E. and Grijalba P. E. 2007. Root and stem rot caused by *Pythium aphanidermatum* on poinsettia in a soil-less culture system in Buenos Aires Province, Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*. 2:139–140.
- Parrella, G. and Sorrentino D. 2009. Identification of a *Cucumber mosaic virus* isolate from *Passiflora edulis* in Southern Italy and validation of subgroup identification by in silico restriction fragment length polymorphism. *Journal of Phytopathology*. 157: 762–767.
- Pernezny K. and Raid R.N. 2001. Occurrence of Bacterial Leaf Spot of Escarole Caused by *Pseudomonas cichorii* in the Everglades Agricultural Area of Southern Florida. *Plant Disease*. 85: 1208.
- Pinto, C.B. 1993. Manual de prácticas de virología agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México. 134 p.

- Queiroz, A. P. S, Santos F. M., Sassaroli A., Hársi C. M., Monezi T. A. and Mehnert D. U. 2001. Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4614–4618.
- Reinero, A. and Beachy R. N. 1989. Reduced Photosystem Activity and Accumulation of Viral Coat Protein in Chloroplasts of Leaves Infected with Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiology*. 89: 111-116.
- Rodríguez, C. B. 1985. *Botánica sistemática*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 286-287 pp.
- Rodríguez, S. I. P. y Barrera S. H. A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7: 323-335.
- Rubin, H. L. 1961. *Poinsettia scab* - a new report for Puerto Rico. *Plant Disease Reporter*. 45: 375.
- Ruehle, G. D. 1941. *Poinsettia scab* caused by *Sphaceloma*. *Phytopathology*. 31: 947- 948.
- SAGARPA. 2011. Expendenán productores de nochebuena 20 millones de plantas, con un valor de 700 MDP. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y alimentación. D.F., México. *In*: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2011B732.aspx> (Consulta diciembre 2011).
- Sanogo, S. and Moorman G. W. 1993. Transmission and control of *Phytophthora aphanidermatum* in an ebb-and-flow subirrigation system. *Plant Disease*. 77: 287-290.
- Scott, S. W., Bowman V. V, and Bachman E. J. 1992. The use of nucleic acid probes for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus*. *Acta Horticulturae*. 309:79–83.
- Shanks, J. B. 1980. *Poinsettias-Nochebuenas*. P. 273-295. *In*: Introduction to Floriculture. Larson, R. A. (Ed.). Academic Press. New York. USA.
- Siepen, M., Pohl J. O., Koo B.-J., Wege C. and Jeske H. 2005. *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but a natural polerovirus–sobemovirus hybrid. *Virology*. 336: 240 – 250.
- Singh, Z., Jones R. A. C., Jones M. G. K. 1995. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease*. 79:713–716.
- Soll, J. and Schleiff E. 2004. Protein import into chloroplasts. *Nature reviews*. 5: 198-208.

- Sosa-Moss, C., Perdomo R. F., Brathwaite C. W. D. y Salazar C. J. J. 1996. Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas: Diagnóstico fitosanitario II. Editorial IICA. D. F., México. 223 p.
- Spetz, C., Moe R. and Blystad D.-G. 2008. Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of *Poinsettia mosaic virus*. Archives of Virology. 153:1347–1351.
- Stravato, V. M., Carannante G. and Scortichini M. 2004. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* on *Euphorbia pulcherrima* in Italy. Journal of Plant Pathology. 86:177.
- Suslow, T. V. and McCain A. H. 1981. Greasy canker of poinsettia caused by *Pseudomonas viridiflava*. Plant Disease. 65: 513-514.
- Sutula, C. L., Gillett J. M., Morrissey S. M. and Ramsdell D. C. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. Plant Disease. 70:722-726.
- Técsi, L. I., Maule A. J., Smith A. M. and Leegood R. C. 1994. Complex, localized changes in CO₂ assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. The Plant Journal. 5: 837–847.
- Técsi, L. I., Smith A. M., Maule A. J. and Leegood R. C. 1996. A spatial analysis of physiological changes associated with infection of cotyledons of marrow plants with cucumber mosaic virus. Plant Physiology. 111:975–985.
- Tzanetakis, I. E. and Martin R. R. 2008. A new method for extraction of double stranded RNA from plants. Journal of Virological Methods. 149: 167-170.
- Usta, M., Sipahioglu M. H. and Polat B. 2005. Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). Journal of Agricultural Science. 15:153-158.
- Uyemoto, J. K., Luhn C. F., Asai W. K., Beede R., Beutel J. A. and Fenton R. 1989. Incidence of ilarviruses in young peach trees in California. Plant Disease. 73: 217–20.
- Van, B. E. and Bouwen I. 1995. The electron microscope as a diagnostic tool in plant virology. EPPO Bulletin. 25: 233–238.
- Verma, N., Mahinghara V. K., Ram R., Zaidi A. A. 2006. Coat protein sequence shows that *Cucumber mosaic virus* isolate from geranium (*Pelargonium* spp.) belongs to subgroup II. Journal of Bioscience. 31: 47-54.
- Vidalie, H. 1992. Producción de flores y plantas ornamentales. Segunda edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 310 p.

Vunsh, R., Rosner A. and Stain A.1990. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in *Gladiolus*. *Annals of Applied Biology*. 117: 561-569.

Wehlburg, R. 1968. *Poinsettia scab*. Florida Department of Agriculture. Division of Plant Industry. Plant Pathology Circular No. 65.

Wu, J., Zulfıqar A. and Huang C. 2011. Infectivity of *Euphorbia leaf curl virus* and interaction. *Archives of Virology*.156:517–521.

Xu, J., Aileni S. M., Abbagani M. and Zhang P. 2010. A Reliable and Efficient Method for Total RNA Isolation from Various Members of Spurge Family (Euphorbiaceae). *Phytochemical Analysis*. 21:395–398.

Yuen, Y. G. and Masters A. R. 1995. Moisture requirements and host specificity of *Rhizoctonia solani* from leafy spurge (*Euphorbia esula*) in Nebraska. *Weed Technology*. 9: 44-48.

Zavala, C. J. E. 2005. Manual de técnicas básicas de biología molecular. Editorial UADY. Mérida, Yucatán, México. 195 p.

Zitikaitė, I., Staniulis J., Urbanavičienė L. and Žižytė M. 2011. *Cucumber mosaic virus* identification in pumpkin plants. *Žemdirbystė=Agriculture*. 98: 421–426.

8. ANEXOS

ANEXO I

Preparación de buffers

Cuadro 1. Buffer salino de lavado*¹

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris- HCl pH 8.0 1M	10 mM	10 mL
EDTA pH 8.0	1 mM	0.029 g
NaCl	2 M	11.68 g
Albúmina bovina sérica	0.5% (adicionar después de esterilizar)	0.5 g
Cantidad final		100 mL

*¹Mantener en refrigeración.

Cuadro 2. Buffer CTAB*²

Reactivo	Concentración	Cantidad
CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide)	2% (p/v)	2 g
NaCl	1.4 M	8.176 g
Tris-HCl pH 8.0 1M	0.1 M	10 mL
β –mercaptoetanol	0.5% (adicionar después de esterilizar)	0.5 mL
Cantidad final		100 mL

*² Conservar a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Glutaraldehído al 6% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2*³

Reactivo	Concentración	Cantidad
Glutaraldehído al 25%	6 %	6 mL
Buffer de fosfatos	0.1 M	94 mL
Cantidad final		100 mL

*³ Conservar en refrigeración.

Cuadro 4. Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2*⁴

Reactivo	Concentración	Cantidad
Fosfato de sodio monobásico	0.1 M	1.4 g
Fosfato de sodio dibásico	0.1 M	2.68 g
Cantidad final		100 mL

*⁴Ajustar el pH a 7.2 una vez que se encuentre aforado a 100 mL y almacenar bajo refrigeración.

Cuadro 5. Tetróxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2*⁵

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tetróxido de osmio	1 %	1 mL
Buffer de fosfatos	0.1 M	94 mL
Cantidad final		100 mL

*⁵Conservar en refrigeración.

Cuadro 6. Resina Embed 812*⁶

Mezcla	Reactivo	Cantidad inicial	Cantidad final
A	EMBED 812	5 mL	13 mL
	DDSA	8 mL	
B	EMBED 812	8 mL	15 mL
	NMA	7 mL	
Mezcla final de inclusión	Mezcla A	13 mL	28.56 mL
	Mezcla B	15 mL	
	DMP-30	0.56 mL	

*⁶ Evitar la formación de burbujas al momento de disolver cada una de las mezclas y almacenar en refrigeración.

ANEXO II

Cuadro 1. Secuencias de primers universales para el género *Tobamovirus* y específicos para CMV y PnMV

Primers	Secuencia	Referencia
Rc-actinFP	5'-CGTTCTCTCCTTGTATGCCAGTGGTC-3	Xu <i>et al.</i> ,2010
Rc-actinRP	5'-GAGCTGCTCTTGGCAGTCTCAAGTTC -3'	Xu <i>et al.</i> ,2010
TobRT up1	5'-GARTAYSCIGCIYTICARAC-3'	Dovas <i>et al.</i> , 2004
TobRT do2	5'-BGCYTCRAARTTCCA-3'	Dovas <i>et al.</i> , 2004
TobN up3	5'-GGCGYTG CARACIATHGTITAYCA-3'	Dovas <i>et al.</i> , 2004
TobN do4	5'-GTRTTICCIATRAAIGTIGTIACRTC-3'	Dovas <i>et al.</i> , 2004
TobN do4G	5'-GCCGATRAAGGTGGTGACRTC-3'	Dovas <i>et al.</i> , 2004
CMV1	5'-GCCGTA AGCTGGATGGACAA-3'	Zitikaité <i>et al.</i> , 2011,
CMV2	5'-TATGATAAGAAGCTTGTTTCGCG-3'	Zitikaité <i>et al.</i> , 2011,
PnMV F	5'-GTGCCAGCCGCCGTTCTTCT-3'	
PnMV R	5'-TGAGCCGGCGACTCCATCCA-3'	

B: C, G o T; R: A o G; Y: C o T; S: G o C; H: A o T o C; I: inosina.

ANEXO III

Cuadro 1. Concentración y nivel de pureza de las extracciones de RNA para la detección del gen de actina, CMV, PnMV y TMV.

	Muestra	Concentración (ng/μl)	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
Actina	Hoja 1	2 970	1.73	2.03
	Raíz 1	368	2.05	1.66
	Hoja 2	1417	2.12	2.24
	Raíz 2	585	1.76	1.24
	Hoja 3	2 211	2.00	1.22
	Raíz 3	401	2.05	2.00
CMV	Semilla 4	2 767	1.89	1.82
	Raíz 4	177	1.50	0.99
	Semilla 5	1 638	1.75	1.65
	Raíz 5	153	1.33	0.37
	Raíz 6	368	2.05	1.66
	Semilla 7	919	2.07	2.19
	Raíz 7	187	1.20	0.26
	Semilla 8	2 182	1.95	1.88
PnMV	Raíz 8	205	1.70	0.66
	Hoja 9	1 142	2.11	2.10
	Raíz 9	927	2.12	2.02
	Hoja 10	1 534	2.10	2.00
	Raíz 10	668	2.05	1.93
	Hoja 11	1 059	1.89	1.86
	Raíz 11	876	2.00	1.82
	Hoja 12	2 487	2.08	2.04
	Raíz 12	651	2.14	2.00
TMV	Hoja 13	2 211	2.00	1.22
	Raíz 13	401	2.05	2.00
	Hoja 14	3 853	1.85	2.00
	Raíz 14	383	1.91	0.98
	Hoja 15	2 970	1.73	2.03
	Raíz 15	368	2.05	1.66

ANEXO IV

Secuencias de los amplicones del gen de actina:

Actina Forward

GTATTTGTAA TGTCCAATTG ATAGACTTTT TCCTCTTGTG AAAGGGATTG TGCTGGACTC
TGGTGTGGTG TGAGTCAGAC TGTACCCATC TATGAAGGGT ATGCTCTTCC GCTTGCAATC
CTTCGATTGT ACCTTGGTGG CTTTGATCTC ACTGATGCTT TAATGAATAT TCTTACCTTC
ATAGGGTACA TGTTTACCTC TTCGGCACAA CGGGAATTG TCCGTGACAT GAAGGAAAAA
CTGACATATG TGGCCCTTGA CTATGAGCCT AAATTGAGA CTGCCAAAAT CACCTCAGCA
GCTCA

Actina Reverse

AGGTGAACAA GGGGAAAATA TGGCAAGGTT TCTCCTTCAT GTCACGGACA ATTTCCCGTT
CGGCAGTGGT GGTGAACATG TACCCTCTCT CGGTAAGAAT CTTTCATCAA GCATCGGTGA
GATCACGTCC AGCAAGGTCC AAACGGAGAA TGGCATGTGG GAGAGCATAA CCTTCATAAA
TTGGCACAGT ATGACTCACA CCATCACCAG AATCAAGCAC AATACCTGTT GCAAATGAAA
ATCCATTCAA TATGACAAAT CATTATATA ACCATAGGAT GGTGAAATTG GAAATAGGCC
AGAACTGGTA CCTAACCAT GGTACAACCA CGGGTTACAG GGAAAAAAGG AAATAAAGTC
TTTGCTCTAT CAAACCATAA GCCATTTCTC TTCGGTAGGA AAATTTTCGTTT GGATGGTGG
GGAAATGGTA CCTCCGAAAA CTCCTCAACC TCGTAGATCC GCCGCAGGTC CAAGAAAAAT
GCTGGTGGAA AACAACTTT AAATGGCCTG GGCCCCCCA ATCCCCTCCC TTCAATTAA
ACCTTTTTTA CCCCTTTT

Secuencias de los amplicones del TMV:

TMV-MX1

GAAATCGGTA AACGCATCCT GTTGAAGCTC TTCGTGAGTC ACGAGGCAGT TACTATACAG
CGTGGATCCT GCTTCTTTCT TCTCCTTACA AATCAGACAC CGGCGCCTCC TCCAGATTTT
TTCTTAGACT GCACAAGTCA TGTGCCAATG GATATCTTGG AGCTTGATAT ATCAAAATAT
GACAAATCTC AAAATGAATT CCACTGTGCA GACGAATACA AAATCTGGAG GAGATTGGGT
TTTGAAGATT TTCTAGGAGA AGTTTGAAG CAGGGACTAC AAAGACCACT CTTAAGGATT
ACACTCCCTG AATAAAAACC CGAATATGGC ATTGAACAAA TAGGGATGAC GTCCCCACCT
TTGCCGGCAC AAAAA

TMV-MX2

TTGGGGGTTT CACTAATGCA TCTTCGGGCG CTCTTCGTAG CTCCGAGGCA GTTCTAGACA
GTGGGATTCT GCTTATTTTT GTTCTTTACA AAGAATACAC CGGCGCAGAT AGAGGATTTT
TTCGGAGATC TAGATAGTCA TGTGCCAATG GATATCTTGG AGCTTGATAT ATCAAAATAT
GACAAATCTC AAAATGAATT CCACTGTCTA GATCTCCAAA AAATCTGGAG GAGATTGGGT
TTTGAAGATT TTCTAGGAGA AGTTTCTGCT TGGGACATAC AAAGACCACT CTTAAGGATT
ACGCTCAAGG AATAGCGACC TGAATATGGC ATCGAACATT GAGTGGGGAC ACCCCCTCCT
CCCCAC

Secuencias de los amplicones del PnMV:

PnMV Forward MX

GCTTCTTTTCG TCGCCACCCG TCTCGCCTGG TGCCTCAATC TGTGTACAAT GCCCTGTTTA
CTTACACTCG AGCCGTTTCG ACTCTGCGCA TCTCCGATCC AGTCGGCTTC GTTCGCACGC
AGTCCAACAA GCCAGAGCAC GCCTGGGTCA CGTCCTCCGC CTGGGACAAT CTCCAGCACT
TTTCTCTTCT CACTGCCTCT AACCGTCTT CTAACTCCTA TTCCTGGAAT GGCAGCCTCT
GGCAGCGCTT CATCTCTCGC CTGCAAACAG TGGCCGCTGA GTTGAAATCT TCAGCCATCT

TCACTTCCTC CATCACCACC TTCCTCTTCT CTCTCCTTTT CCAATACTTCC GCCGGAAT
CTGCTGCCTC TAGGTCTTTG CCTAGCGACC TCGGTTTTCG GAATTTGGAT GAGCACGTCA
AGCTTCATGA AGGCCTTCTC CAGGCTGGTT TTAGTTACAC ACACACTTCC CCAACCCGCC
AAGGGCCTCG AGATTTCTAC CACAGGGCCG CTGAGCGATT CAAACTCATG TCCGCCCTTG
TTCGTTCCAT CTCCCTTTCT CTTCCCTGC TTGCGTTCGC CATCTACTCC AAGTGCACGC
AGCCCATGCC CCCTCAGAGC CTTACAGATT CCTACCACAA CTACCATCAT CCAAGCAAGT
GGGTCCTTGG TGACCCCCCG CGGCGGTCCC AAGACAGGCA TGGCGGTGTA TTAGCGAACC
TATTTTGGGA GTACCGGGCA GCACGTTGTG AGCGGGATGC AGCTGTGAAT AAATGGAGAG
GACAATGAGG GCGAATTGAG TAGGCATTGT AGGGTCGATG AGATAGGAAT TCCACGCCTT
GAGGCGTGGG GCAGTGTGTA TAATAAGCAA AACAGCCTGA AAGCTATACG GAACCTGGAC
GTGCCTCATC GATGTCGAAA GCTGAAGCGC ATGTCAAAGA AGATCAGAAG CGACGTATTT
TGCGCACTAT AGTCTGGCGA CATAACGCGA AAAGAAGTAG GGTGACTAGA AGGCAAGGAA
ATATGCCTAG TCACTCACCG GACCAAGATG TTGACGACGT GCAACG

PnMV Reverse MX

CTCTGGGATG ATGGTAGTTG TGGTAGGAAT CGTGAAGGCT CTGAGGGGGC ATGGGCTGCG
TGCACTTGGA GTAGATGGCG AACGCAAGCA GGGGAAGAGA AAGGGAGATG GAACGAACAA
GGGCGGACAT GAGTTTGAAT CGCTCAGCGG CCCTGTGGTA GAAATCTCGA GGCCTTGGC
GGGTTGGGGA AGTGTGTGTG TAACTAAAAC CAGCCTGGAG AAGGCCTTCA TGAAGCTTGA
CGTGCTCATC CAAATTCCGA AAACCGAGGT CGCTAGGCAA AGACCTAGAG GCAGCAGATT
TCCGGCGGAA GTATTGAAA AGGAGAGAGA AGAGGAAGGT GGTGATGGAG GAAGTGAAGA
TGGCTGAAGA TTTCAACTCA GCGGCCACTG TTTGCAGGCG AGAGATGAAG CGCTGCCAGA
GGCTGCCATT CCAGGAATAG GAGTTAGAAG GACGGTTAGA GGCAGTGAGA AGAGAAAAGT
GCTGGAGATT GTCCCAGGCG GAGGACGTGA CCCAGGCGTG CTCTGGCTTG TTGGACTGCG
TGCGAACGAA GCCGACTGGA TCGGAGATGC GCAGAGTCCG AACGGCTCGA GTGTAAGTAA
ACAGGGCATT GTACACAGAT TGAGGCACCA GGCGATGACG GGTGGGTTGA CGAATGCTGG
TGGCCTCAGG GAGAAGACCG GGGGGGGGGG CAAAAGTTAG CTTTCGTGCTT GTAACCATG
GAGAGCGAAT ACACAATGCT GTACCGGCAC AGCGCCATGG GCTTGTTGGA GTGTTATATA
GGTGTCAGTC GCATAGAGG