



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

***Poinsettia mosaic virus, Tobacco mosaic virus Y
Cucumber mosaic virus EN NOCHEBUENA
SILVESTRE (*Euphorbia pulcherrima*)***

OMAR JACOBO VILLEGAS

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


MAESTRO EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

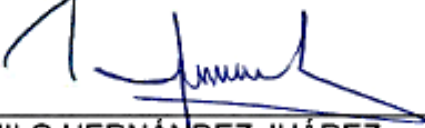
2015

La presente tesis titulada: *Poinsettia mosaic virus, Tobacco mosaic virus y Cucumber mosaic virus en nochebuena silvestre (Euphorbia pulcherrima)*, realizada por el alumno: Omar Jacobo Villegas, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

ASESOR: 
DR. SERGIO RAMÍREZ ROJAS

ASESOR: 
M.C. CAMILO HERNÁNDEZ JUÁREZ

Montecillo, Texcoco, México, junio de 2015

RESUMEN

Poinsettia mosaic virus, *Tobacco mosaic virus* Y *Cucumber mosaic virus* EN

NOCHEBUENA SILVESTRE (*Euphorbia pulcherrima*)

Omar Jacobo Villegas, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

La nochebuena se siembra en traspatios y jardines, se cultiva como variedad mejorada y se encuentra en estado silvestre desde el noroeste de México hasta el sur de Guatemala. A nivel mundial, la nochebuena, como especie mejorada, es una de las plantas ornamentales de mayor importancia comercial. En el 2013, el valor de su producción en México fue superior a los 416 millones de pesos, pero podría disminuir por la presencia del *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), el cual se reportó, junto con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV), en algunas plantas de “nochebuena de sol”. Considerando que las variedades mejoradas que se cultivan en México son de importación, pero de origen mexicano, y que el PnMV causa pérdidas económicas en su producción, los objetivos de esta investigación fueron buscar una fuente de resistencia al virus en plantas silvestres de nochebuena, y corroborar su presencia, junto con la del TMV y CMV en plantas de nochebuena desarrolladas en su hábitat natural. Se recolectaron plantas silvestres de nochebuena asintomáticas y con síntomas asociados a virus en Jiutepec, Morelos; Tehuilotepic, Guerrero; Xilitla, San Luis Potosí y en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. Se hicieron pruebas serológicas (ELISA) y moleculares (RT-PCR) para determinar la presencia de los virus, así como inoculaciones mecánicas y por injerto. Como fuente de inóculo para el PnMV, TMV y CMV se utilizaron las variedades de nochebuena “Red Prestige” y “Freedom”, *Physalis floridana* y *Capsicum annum*, respectivamente. Los resultados indicaron que las plantas silvestres de nochebuena no son hospedantes del PnMV, por lo que podrían representar una fuente de resistencia para este virus; tampoco son hospedantes naturales del TMV ni del CMV. Este es el primer reporte del PnMV en plantas de nochebuena mejoradas.

Palabras clave: Nochebuena, mejoramiento genético, resistencia a virus.

ABSTRACT

Poinsettia mosaic virus, *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* IN

POINSETTIA WILD (*Euphorbia pulcherrima*)

Omar Jacobo Villegas, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

Poinsettia is cultivated in backyards and gardens, as an improved variety, and is located as a wild plant from the northwest of Mexico to the south of Guatemala. At the worldwide level, poinsettia, as an improved species, is one of the most economically important ornamental plants. In 2013, its production value in Mexico was higher than 416 million pesos, but it can be reduced by *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), which was reported, along with *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV), in “nochebuena de sol” and wild poinsettia plants. Taking into account that the improved varieties that are cultivated in Mexico are imported, but with a Mexican origin, and that PMV causes economical losses in its production, the objectives of this research were to find a virus resistant source in wild poinsettia plants, and to corroborate its presence, along with the TMV and CMV ones, in poinsettia plants grow in its natural habitat. Symptomless wild poinsettia plants and plants with symptoms associated with virus were collected in Jiutepec, Morelos; Tehuilotepic, Guerrero; Xilitla, San Luis Potosí, and in the Chapingo Autonomous University, Mexico State. Serological (ELISA) and molecular (RT-PCR) analyses were performed in order to determine the presence of the viruses, as well as mechanical and graft inoculations. “Red Prestige” and “Freedom” poinsettia plants, *Physalis floridana* and *Capsicum annuum* were the source of inoculum for PnMV, TMV and CMV, respectively. The results indicated that the wild poinsettia plants are non-hosts of PnMV, so they could be a resistant source for this virus; they are not TMV or CMV natural hosts either. This is the first report of PnMV in improved poinsettia plants.

Keywords: Poinsettia, genetic improvement, virus resistance.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Instituto de Fitosanidad**, por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica en esta institución.

Al **FIDEICOMISO No. 167304 año 2013**, para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por el apoyo financiero para el desarrollo de la investigación.

Al **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT)** por el apoyo para la obtención del grado.

A la **Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce**, por su dedicación y compromiso en la investigación, por la paciencia y guía oportuna para la realización del trabajo de laboratorio y redacción de la tesis.

Al **Dr. Sergio Ramírez Rojas**, por su disponibilidad y apoyo en la investigación, especialmente en el trabajo de recolección de los materiales de nochebuena silvestre.

Al **M.C. Camilo Hernández Juárez**, por sus enseñanzas y consejos en la investigación, disponibilidad y apoyo en las pruebas serológicas y moleculares.

Al **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez** por las facilidades brindadas en el laboratorio de virus de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados.

Al **M.C. Amando Flores Espinoza** por la disponibilidad en la toma de muestras de la “Colección de nochebuena silvestre” en Chapingo, México.

A las **autoridades de Tehuilotepic**, Guerrero (2014-2015), por su disposición y apoyo en la recolección de los materiales silvestres.

Al **C. Mario Salazar**, técnico de virus del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH, por su disponibilidad de tiempo en la investigación, apoyo incondicional, facilidades brindadas para la realización de pruebas ELISA y proporción de los materiales necesarios para las pruebas de transmisión mecánica.

A la **M.C. Alfonsina Judith Hernández y equipo de trabajo** del laboratorio de Diagnóstico de Fitosanidad (LADIFIT) del Colegio de Postgraduados, por la disponibilidad y apoyo en las pruebas de biología molecular.

Al **M.C. Faustino García Pérez** del INIFAP, campo experimental Zacatepec, por su guía para la recolección de material vegetal en el estado de Guerrero.

A los **profesores de Fitosanidad-Fitopatología** por sus enseñanzas y consejos en las materias cursadas, por su tiempo y contagiarme de las ganas de realizar investigación en fitopatología.

A los **encargados de los herbarios** visitados, en la UNAM, preparatoria de Chapingo (UACH) y Colegio de Postgraduados, por las facilidades en la revisión de los materiales.

A las familia **Garcilaso y Gómez Cruz**, por su amistad y apoyo incondicional, por permitirme ser parte de momentos y vivencias afortunadas.

A mis amigos y compañeros de generación **Fitopatología otoño 2012** que me brindaron su apoyo y compañía en esta etapa de formación académica.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme seguir aprendiendo todos los días, gozar de salud y continuar mi formación académica.

*A mis padres: **Margarita Villegas Martínez**, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, por estar siempre al pendiente de mí y por ser el tesoro máspreciado que tengo; **Tomás Jacobo Benítez**, por ser mi ejemplo de superación, por todo el apoyo que me brinda, sus consejos, enseñarme que con esfuerzo y dedicación es posible cumplir nuestras metas.*

*A mis hermanos: **Jenny Lucía**, por ser el mejor ejemplo a seguir, por la valentía y determinación con que enfrentas las adversidades y el cariño que me tienes; **Norma**, porque has sabido afrontar las situaciones difíciles y sigues compartiendo momentos de alegría con nosotros; **Mayra**, por nunca darte por vencida, eres fuerte, noble, y siempre demuestras cariño a los que te rodeamos; **y a ti Eduardo**, por tu apoyo incondicional siempre que lo necesito, comprensión y cariño.*

*A **Cristofer** (el más pequeño), por alegrarnos todos los días con tu sonrisa; **Esmeralda** y **Sergio**, por tantas experiencias gratas compartidas; a mi tía **María de la Luz**, por su cariño y apoyo incondicional; a mis abuelitos, **Domingo** y **Soledad**, por sus consejos, especialmente a mi **abuelita Catalina Martínez**, por ser una de las personas más nobles y cariñosas que conozco, por sus oraciones, y por todo el apoyo que siempre me brinda.*

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Nochebuena	4
2.2 Nochebuena silvestre.....	6
2.3 Virus en plantas silvestres de nochebuena y en “nochebuena de sol”	7
2.4 Virus en otras especies del género <i>Euphorbia</i>	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 Muestreo.....	9
3.2 Establecimiento de las estacas	10
3.3 Identificación de los virus	10
3.3.1 Pruebas serológicas.....	10
3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa con la transcriptasa reversa (RT-PCR)	11
3.3.2.1 Extracción de ARN Total.....	11
3.3.2.2 Calidad del ARN total	12
3.4 Inoculación de plantas silvestres de nochebuena y plantas indicadoras	14
3.4.1 Inóculo.....	14
3.4.2 Inoculación mecánica.....	14
3.4.3 Inoculación por injerto en plantas silvestres de nochebuena	15
IV. RESULTADOS	16
4.1 Caracterización de síntomas	16
4.2.1 Identificación serológica	17
4.2.2 Identificación molecular.....	19
4.3 Inoculación mecánica.....	22
4.3.1 Plantas silvestres de nochebuena.....	22
4.3.2 Plantas indicadoras	22

4.3.3 Inoculación por injerto.....	23
V. DISCUSIÓN.....	24
VI. CONCLUSIONES.....	28
VII. LITERATURA CITADA.....	29
APÉNDICE 1.....	32
APÉNDICE 2.....	34
APÉNDICE 3.....	36
APÉNDICE 4.....	39
APÉNDICE 5.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de muestreo.	9
Cuadro 2. Prueba ELISA en plantas silvestres y comerciales de nochebuena. ...	11
Cuadro 3. Resultados de la detección serológica (ELISA) del PnMV, TMV y CMV en plantas silvestres de nochebuena.	18
Cuadro 4. Resultado de la detección serológica (ELISA) del PnMV, TMV y CMV en variedades mejoradas de nochebuena.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas silvestres de nochebuena.....	16
Figura 2. Hojas de plantas silvestres de nochebuena con síntomas de posible origen viral.....	17
Figura 3. Hojas de plantas de variedades mejoradas de nochebuena.....	18
Figura 4. Productos de amplificación de la secuencia parcial del gen 18S ribosomal en muestras de ARN aislado de plantas silvestres de nochebuena	20
Figura 5. Productos de amplificación de las secuencias parciales del PnMV, TMV y CMV en ARN aislado de hojas de plantas silvestres de nochebuena.....	21
Figura 6. Hojas de plantas silvestres de nochebuena después de haberse inoculado con el PnMV, TMV o CMV.....	22
Figura 7. Hojas de <i>Nicotiana rustica</i> , <i>N. occidentales</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> cv. Xanthi y <i>N. virginia</i> después de haberse inoculado con el PnMV	23
Figura 8. Injertos de nochebuena variedades “Freedom” y “Red Prestige” sobre plantas silvestres de nochebuena	23

I. INTRODUCCIÓN

En México, la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) se siembra en traspatios y jardines, se cultiva como variedad mejorada y se encuentra en estado silvestre a lo largo de las pendientes del Pacífico, desde el noroeste de México hasta el sur de Guatemala (Trejo, *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014).

La planta tiene crecimiento arbóreo y arbustivo, es caducifolia y genera brácteas de diferentes colores formas y tamaños (Canul *et al.*, 2010a).

De acuerdo con Canul *et al* (2014), las plantas de nochebuena que se establecen en jardines y traspatios reciben el nombre de “nochebuena de sol”; se utilizan como plantas medicinales, flor de corte y para adornar espacios públicos (Colinas *et al.*, 2009).

Los viveristas de algunos municipios del estado de Morelos desarrollaron las variedades “Juan Pablo”, “Rehilete”, “Belén” y “Amanecer navideño” a partir de la selección y reproducción de nochebuenas criollas. Estas variedades están registradas como plantas de “nochebuena de sol” en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) y en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV), y son las que actualmente están en el mercado (Colinas *et al.*, 2009).

En México, no se tienen datos oficiales sobre la superficie que se siembra con “nochebuena de sol”; sin embargo, en el 2010, en el estado de Morelos, se cultivaron alrededor de 20.000 m² con un mercado limitado a nivel regional, estatal y nacional, y sin contrato para su comercialización (Galindo-García *et al.*, 2012). En contraste, a nivel mundial, la nochebuena, como especie mejorada, es una de las plantas ornamentales cultivada en maceta de mayor importancia comercial. De acuerdo con los registros de la producción de cultivos florícolas de Estados Unidos de América, la venta de esta ornamental en el 2013 fue de 146 millones de dólares (USDA, 2014). En este mismo año, el valor de la producción en México fue superior a los 416 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

Nuestro país exporta alrededor de 30 millones de esquejes que se producen en el estado de Morelos a mercados de África, América del Norte, Asia y Europa con un valor aproximado de 90 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

La nochebuena silvestre ha estado bajo una constante presión de selección, por lo que ha desarrollado estrategias que se reflejan en caracteres que le confieren un gran valor como recurso fitogenético (SINAREFI, 2010), con potencial para investigación y comercialización, y que las incluye en el patrimonio biológico de México, por lo que es necesario conservarlas e incorporarlas a programas de mejoramiento genético (Canul *et al.*, 2010a). En este sentido, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Campo Experimental Zacatepec, en el estado de Morelos, se está desarrollando un programa de mejoramiento genético de plantas de “nochebuena de sol” y silvestres con la finalidad de obtener variedades mexicanas con atributos comerciales y fitosanitarios que beneficien a los productores (Canul *et al.*, 2010a).

En cuanto al estado sanitario, la nochebuena de maceta es hospedante regular del *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) y del *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005).

A la fecha no se han reportado síntomas en plantas infectadas con el PnLV (aus dem Siepen *et al.*, 2005), pero el PnMV, que se encuentra altamente distribuido en el mundo, induce distorsión de brácteas, mosaico y moteado foliar, lo que origina pérdidas importantes en la comercialización de esta ornamental (Ocampo, 2012).

Como actividades complementarias del programa de mejoramiento del INIFAP Campo Experimental Zacatepec, Ocampo (2012) aisló el ARN de plantas que se recolectaron en 10 estados de la República Mexicana (Morelos, Guerrero, Distrito Federal, Michoacán, Estado de México, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Nayarit) para determinar la presencia de virus fitopatógenos.

A partir de estas muestras, Ocampo (2012) reportó al CMV, y posteriormente al TMV y PnMV (Ocampo *et al.*, 2013). Sin embargo, los órganos vegetales a partir

de los cuales se hizo la detección se obtuvieron de estacas que se recolectaron en campo y que se establecieron en las instalaciones del INIFAP-Zacatepec, por lo que la presencia de estos virus no indica si las plantas se infectaron en su hábitat natural o en las instalaciones del INIFAP.

Considerando que las variedades mejoradas que se cultivan en México son de importación, pero de origen mexicano, y que a nivel mundial el PnMV es la causa de pérdidas en la producción de esta ornamental, los objetivos de esta investigación fueron buscar una fuente de resistencia al virus en plantas silvestres de nochebuena, y corroborar su presencia, junto con la del TMV y CMV.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nochebuena

La nochebuena pertenece a la familia Euphorbiaceae, género *Euphorbia*. Este género cuenta con 1000 especies agrupadas en el subgénero Poinsettia, el cual se divide en dos grupos. El primer grupo está integrado por siete especies, y el segundo por 18, entre las cuales se tiene a la nochebuena (*E. pulcherrima*), considerada como el subgénero tipo (SINAREFI, 2010).

La nochebuena es una planta nativa de México y Centroamérica, propia del bosque tropical caducifolio de la vertiente pacífica, que se distribuye desde Sinaloa hasta Guatemala entre los 0 a 2,000 metros aproximadamente (Steinmann, 2012).

El primer registro histórico del uso de esta ornamental durante la temporada navideña data del siglo XVII, con los misioneros Franciscanos en el sur de México. Posteriormente, Robert Poinsett, quien fue embajador de los Estados Unidos de América en México (1825–1829), la cultivó y propagó en invernadero hasta dar origen al desarrollo de la nochebuena como ornamental de maceta (Rodríguez, 2010).

Como especie mejorada, la nochebuena se cultiva en Alemania, Estados Unidos de América, Francia, Gran Bretaña (Vidalie, 2001), Dinamarca, Venezuela, Corea, Tasmania, Nueva Zelanda y Noruega (Bech, 1996; Carballo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2004; Guy, 1985; Lebas *et al.*, 2007; Spetz *et al.*, 2008), mediante el enraizamiento de esquejes (Vidalie, 2001). Los horticultores han desarrollado plantas de poca altura, de colores amarillo, rosado, crema, durazno y rojos más vivos por hibridación. A nivel mundial se encuentra entre las diez especies cultivadas en maceta de mayor importancia económica (Rodríguez, 2010).

En México, la nochebuena se siembra en traspatios y jardines, se cultiva como variedad mejorada y se encuentra en estado silvestre desde el noroeste de

México hasta el sur de Guatemala (Trejo, *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014). Las plantas de nochebuena que se establecen en jardines y traspatios reciben el nombre de “nochebuena de sol” (Canul *et al.*, 2014) y se utilizan como plantas medicinales, flor de corte y para adornar espacios públicos (Colinas *et al.*, 2009). Las variedades “Juan Pablo”, “Rehilete”, “Belén” y “Amanecer navideño” se obtuvieron a partir de la selección y reproducción de nochebuenas criollas y están registradas como plantas de “nochebuena de sol” en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) y en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV).

En el municipio de Cuernavaca, Morelos, la “nochebuena de sol” se produce de manera convencional en vivero a cielo abierto desde hace más de treinta años. Las variedades “Valenciana”, “Superior” y “Rehilete” son las de mayor demanda en el mercado nacional, y con un precio actual similar al de la nochebuena mejorada (de invernadero) (Galindo-García *et al.*, 2012).

No se tienen datos oficiales sobre la superficie que se siembra en México con “nochebuena de sol”, pero en el 2010, en Morelos, se cultivaron alrededor de 20.000 m² con un mercado limitado a nivel regional, estatal y nacional, y sin contrato para su comercialización (Galindo-García *et al.*, 2012). En contraste, a nivel mundial, la nochebuena, como especie mejorada, es una de las plantas ornamentales cultivada en maceta de mayor importancia comercial. En el 2013, su venta en Estados Unidos de América fue de 146 millones de dólares (USDA, 2014). En este mismo año, el valor de la producción en México fue superior a los 416 millones de pesos (SAGARPA, 2014). Sin embargo, la producción se basa en variedades e híbridos de procedencia extranjera, por lo que su uso implica el pago de regalías al mejorador. Bajo estas condiciones, existe la necesidad de impulsar programas de mejoramiento genético a fin de generar variedades nacionales adaptadas a las condiciones ambientales del país y ofertar genotipos competitivos con precios accesibles al productor (Canul *et al.*, 2010b).

2.2 Nochebuena silvestre

Las plantas silvestres de nochebuena se encuentran ampliamente distribuidas en México en ambientes limitantes y diversos (Canul *et al.*, 2010b). Las plantas son árboles y arbustos que miden entre 3 y 5, y 10 m de altura, respectivamente. Son caducifolias con brácteas de diferentes colores formas y tamaños (Canul *et al.*, 2010a). Las hojas son alternas de 10 a 25 cm de longitud, elípticas a panduradas (forma de violín), glabras a pubescentes. La corteza es de color bronce a gris brillante, lustrosa y generalmente glabra (SINAREFI, 2010).

La nochebuena silvestre ha sufrido una constante presión de selección por factores abióticos y bióticos, entre ellos plagas y enfermedades. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias que se reflejan en una serie de caracteres que les confieren un gran valor como recurso fitogenético (SINAREFI, 2010), con potencial para investigación y comercialización, y que las incluye en el patrimonio biológico de México, por lo que es necesario revalorarlas para conservarlas e incorporarlas a programas de mejoramiento genético (Canul *et al.*, 2010a).

Actualmente, la nochebuena silvestre no está registrada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2004 (SINAREFI, 2010) la cual determina las especies y subespecies de flora silvestre, terrestre y acuática en peligro de extinción, amenazada, raras; y las sujetas a protección especial. Tampoco se reporta en los apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), ni en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). Sin embargo, de acuerdo con el SINAREFI (2010), las plantas se encuentran en riesgo de desaparecer debido a la fragmentación de ecosistemas, deforestación de su hábitat natural, cambio de uso de la tierra, calentamiento global, desertificación y contaminación química, entre otros factores.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Campo Experimental Zacatepec, en el estado de Morelos está desarrollando un programa de mejoramiento genético de plantas de “nochebuena de sol” y

silvestres con la finalidad de obtener variedades mexicanas con atributos comerciales y fitosanitarios que beneficien a los productores (Canul *et al.*, 2010b).

2.3 Virus en plantas silvestres de nochebuena y en “nochebuena de sol”

En México, el estudio de virus fitopatógenos en plantas de “nochebuena de sol” y silvestres es reciente. A la fecha se tienen dos reportes en donde se asocia la presencia de estos patógenos con síntomas de clorosis, mosaico, variegado y deformación foliar.

En el 2012, en un diagnóstico preliminar con inmuno-tiras, se detectaron al CMV, TMV y al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). La presencia del CMV y TMV se corroboró posteriormente con la prueba DAS-ELISA (Ocampo, 2012).

En el 2013, se identificaron al PnMV y TMV. De acuerdo con los análisis serológico y molecular (RT-PCR), el TMV se presentó en plantas de “nochebuena de sol” que se recolectaron en el Estado de México y Nayarit, y el PnMV en plantas de Michoacán y Oaxaca. En plantas silvestres que se recolectaron en Guerrero, Nayarit y Morelos se detectó al TMV serológicamente (Ocampo *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que todas las plantas que presentaron los síntomas asociados a virus se recolectaron como varetas en los sitios de muestreo, y posteriormente se establecieron bajo malla aluminizada en las instalaciones del INIFAP del Campo Experimental Zacatepec, por lo que no se tiene la certeza de que los virus evaluados hayan infectado a las plantas en su hábitat natural o en las instalaciones del INIFAP.

2.4 Virus en otras especies del género *Euphorbia*.

A la fecha, de todas las especies que forman parte del subgénero *Poinsettia*, solamente en *E. heterophylla* (sinónimo *E. prunifolia*) (Fernandes *et al.*, 2011) el *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) induce mosaico de color amarillo y enrollamiento foliar (Collins *et al.*, 2009), clorosis intervenal y achaparramiento (Fernandes *et al.*,

2011). Este patógeno es un Begomovirus que se localiza en Brasil, Puerto Rico, Perú, Venezuela, Jamaica y México (Jalisco y Península de Yucatán) (Hernández *et al.*, 2007; Gregorio *et al.*, 2010).

De acuerdo con el CABI (Centre for Agricultural Bioscience International) y la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), el EuMV no tiene importancia económica y no representa un riesgo fitosanitario en Europa ni en el Mediterráneo (CABI/EPPO). Sin embargo, en el continente Americano tiene como hospedantes experimentales al frijol (*Phaseolus vulgaris*), chile (*Capsicum annuum*), jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Hernández *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2011), *Datura stramonium* y *N. benthamiana* (Fernandes *et al.*, 2011), de tal manera que se convierten en hospedantes potenciales (frijol, chile y jitomate) y fuente de inóculo (*D. stramonium* y *N. benthamiana*, incluyendo *E. heterophylla*) para este patógeno.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo

En el 2013 y 2014 se recolectaron estacas, raíces y hojas de plantas silvestres de nochebuena asintomáticas y con síntomas asociados a virus.

Las recolectas se hicieron en los municipios de Jiutepec, Morelos; Tehuilotepec, Guerrero; Xilitla, San Luis Potosí y en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), en el Estado de México (Cuadro 1).

Las plantas silvestres localizadas en la UACH se obtuvieron de los estados de Guerrero, Nayarit y Jalisco por investigadores de esa institución.

Además se consiguieron plantas mejoradas de nochebuena variedad "Freedom" y esquejes de la variedad "Red Prestige" en la empresa "Vivero Internacional" ubicada en el estado de Morelos.

Cuadro 1. Sitios de muestreo.

	Altitud (msnm)	Latitud	Longitud	Número de plantas recolectadas
Jiutepec, Morelos	1471	18°55'36.9" N	99°09'27.0" O	10
Tehuilotepc, Guerrero	1601	18°32'27.7" N	99°34'48.1" O	9*
Xilitla, San Luis Potosí	600	21°24'49.51"N	99° 4'24.6" O	2*
UACH, Estado de México	2250	19°29'23.69"N	98°52'22.7" O	11

* De estas plantas se obtuvieron esquejes para hacer las pruebas de patogenicidad.

3.2 Establecimiento de las estacas

Las estacas de nochebuena silvestre recolectadas en Guerrero y San Luis Potosí se plantaron en suelo estéril en vasos desechables de unicel de 1 L. Previamente, la base de las estacas se cortó en forma de cuña y se aplicó Radix 1500® (ácido indol-3-butírico 1,500 ppm y ácido naftalán-acético 200 ppm) para promover la formación de raíces; la porción apical de la estaca se cortó diagonalmente y se cubrió con Paraplast Sigma® para evitar pudrición por entrada de agua.

Las estacas se establecieron en un cubículo del invernadero de virus fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH, a una temperatura de 18-35°C.

3.3 Identificación de los virus

3.3.1 Pruebas serológicas

La detección del PnMV, TMV y CMV se realizó serológicamente con las pruebas DAS (Double Antibody Sandwich) y TAS (Triple Antibody Sandwich) ELISA en hojas tiernas y raíces de plantas silvestres y comerciales (Cuadro 2), según los protocolos del fabricante (Agdia®). PnMV: (DAS) ELISA (Reagent Set SRA 90700/0096), TMV: (DAS) ELISA (Reagent Set SRA 57400/0096) y CMV: Triple Antibody Sandwich (TAS) ELISA. (Reagent Set SRA 44501/0096).

Los valores de absorbancia se midieron a los 60 minutos de incubación en un lector de placas de ELISA (Multiskan EX, Labsystems) a 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que tuvieron valores de absorbancia mayores al promedio de los controles negativos multiplicado por dos (García-Rodríguez, *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Prueba ELISA en plantas silvestres y comerciales de nochebuena.

Sitio de muestreo / variedad	Número total de plantas	Número de plantas analizadas					
		Hoja			Raíz		
		PnMV	TMV	CMV	PnMV	TMV	CMV
Jiutepec ^a	10	10	10	10	10	10	10
Tehuilotepc ^a	9	9	9	9	9	9	9
Xilitla ^a	2	2	2	2	0	0	0
UACH ^a	11	11	11	11	1	1	1
“Freedom” ^b	5	5	4	5	0	0	0
“Red Prestige” ^b	4	4	4	4	0	0	0

Plantas silvestres ^a y comerciales ^b de nochebuena.

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

3.3.2.1 Extracción de ARN Total

La extracción de ARN se hizo con el Kit comercial ZR Plant RNA MiniPrep™ (Número de catálogo R2024 (Zymo Research) considerando el protocolo del fabricante.

De manera independiente, se pesaron 100 mg de cada muestra (pedúnculo u hoja joven) y se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido. El macerado se transfirió a un tubo (ZR BashingBead™ tube) con 800 µL de buffer de lisis (“RNA Lysis Buffer”), se colocó en un vórtex por 5 min y se centrifugó a 12,000 x *g* durante 1 min. El sobrenadante (400 µL) se transfirió a la columna “Zymo-Spin™ IIC” en un tubo de colecta, se centrifugó a 8,000 x *g* durante 30 s, se añadieron 0.8 volúmenes de etanol al 100% y se mezcló bien.

La mezcla se transfirió a la columna “Zymo-Spin™ IIC” en un tubo de colecta, se centrifugó a 12,000 x *g* durante 30 s y se descartó el eluido. A la columna se agregaron 400 µL de “RNA Prep Buffer”, se centrifugó a 12,000 x *g* por 1 min y nuevamente se descartó el eluido; posteriormente se colocaron 800 µL del “RNA

Wash Buffer”, se centrifugó a 12,000 x *g* durante 30 s y se desechó el eluido. Para remover completamente el buffer de lavado, se agregaron 400 µL del “RNA Wash Buffer” y se centrifugó por 2 min a 12,000 x *g*.

Se removió cuidadosamente la columna Zymo-Spin™ IIC del tubo de colecta y se colocó en un tubo eppendorf libre de nucleasas, se agregaron 25 µL de agua directamente a la matriz de la columna y se dejó reposar durante 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s para eluir el ARN de la columna. El ARN se transfirió al filtro “Zymo-Spin™ IV-HRC” en un tubo libre de nucleasas y se centrifugó a 8,000 x *g* durante 1 minuto.

El ARN se almacenó a -80°C para posteriormente realizar la amplificación de los fragmentos de cada virus.

3.3.2.2 Calidad del ARN total

Para descartar la presencia de inhibidores, se amplificó un segmento del gen 18S ribosomal con los primers específicos 18SF (5´- ACG GAT CGC ACG GCC TTC GT -3) y 18SR (5´- ACC AGA CTT GCC CTC CAA TGG -3) (Zamboni *et al.*, 2008).

Retrotranscripción. En un tubo para PCR se agregaron cada uno de los iniciadores (18SF y 18SR) a una concentración de 0.5 mM, 7 µL de agua libre de nucleasas (Promega®) y 3 µL del ARN total. El tubo se incubó a 72°C por 10 min en un termociclador MyCycler™ marca BIO-RAD y posteriormente se colocó en hielo.

En un segundo tubo se mezclaron el Buffer de RT 1X, DTT 0.01 M, dNTP´s 0.5 mM y 200 U de la retrotranscriptasa MML-V de Promega®. La mezcla se agregó al tubo que estaba en hielo, y se incubó a 37 y 70°C por 60 y 10 min, respectivamente.

Para la PCR se preparó una mezcla de 25 µL con Taq Buffer KCl 0.5X, Taq Buffer (NH₄)₂SO₄ 0.5X, MgCl₂ 1.25 mM, dNTP´s 0.2 mM, iniciadores (18SF y 18SR 0.5 mM), agua libre de nucleasas, Taq polimerasa 5U (Thermo Scientific®) y 2 µL del

ADN complementario. Posteriormente, se colocaron en un termociclador MyCycler™ marca BIO-RAD programado como se indica en el Apéndice 2.

Las condiciones de retrotranscripción y amplificación de los segmentos del PnMV, TMV y CMV se indican en los Apéndices 1 y 2.

Los primers que se utilizaron se indican a continuación.

Virus	Primer	Fragmento esperado (pb)	Referencia
PnMV	PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGTTCTTCT-3') PnMV-R (5'-TGAGCCGGCGACTCCATCCA-3')	700 Proteína de la cápside	Ocampo <i>et al.</i> , 2013.
TMV	TMV1 (5'-GACCTGACAAAAATGGAGAAGATCT-3') TMV2 (5'-GAAAGCGGACAGAAACCCGCTG-3')	422 Proteína de movimiento	Martins <i>et al.</i> , 2008.
CMV	CMV1 (5'-GCCGTAAGCTGGATGGACAA-3') CMV2 (5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3')	500 Proteína de la cápside	Singh <i>et al.</i> , 1995.

El control positivo para TMV (No. catálogo: LPC 57400) se obtuvo del ARN que se aisló de tejido liofilizado infectado con este virus (Agdia®). El control para el CMV se obtuvo de plantas de *Nicotiana rustica*, y para el PnMV de plantas comerciales de nochebuena variedad "Red Prestige", mantenidas en el invernadero de virus de la UACH.

Para todos los casos el control negativo consistió en la mezcla de reacción sin el ADN complementario.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% p/v a 100 V durante 80 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador

(Vilber Lourmat, Quantum) con el programa Vision-Capt, se purificaron con el Kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega®, siguiendo el protocolo del fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.4 Inoculación de plantas silvestres de nochebuena y plantas indicadoras

3.4.1 Inóculo

La fuente de inóculo para los virus TMV y CMV fueron plantas de *Physalis floridana* y *Capsicum annuum*, respectivamente, mantenidas en el invernadero de virus fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

El inóculo del PnMV se obtuvo de las variedades “Red Prestige” y “Freedom” que presentaron la mayor concentración del virus según los resultados serológicos obtenidos (Apéndice 3).

De cada planta y de manera independiente, se pesó 0.1 g de tejido foliar y se maceró en un mortero con amortiguador de fosfatos (DIECA) pH. 7.4 en proporción 1:10 p/v.

3.4.2 Inoculación mecánica

Cada virus se inoculó independientemente en plantas silvestres de nochebuena. Las plantas indicadoras se inocularon solamente con el PnMV.

Brevemente, tres a cinco hojas jóvenes de las plantas se asperjaron con carborundum de 600 mallas y se frotaron de manera independiente con un hisopo previamente humedecido con el inóculo.

Como testigo negativo se aplicó carborundum en la superficie de las hojas y se frotaron con un hisopo humedecido en amortiguador de fosfatos (DIECA) pH. 7.4.

Se inocularon ocho plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Guerrero y San Luis Potosí. Cuatro de estas plantas se inocularon con el PnMV, dos con el TMV y dos con el CMV. Como testigo negativo se inocularon tres hojas de otras dos plantas.

El PnMV, en un primer ensayo, se inoculó en tres plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*; posteriormente se inoculó en otras tres plantas de las siguientes especies, incluyendo *N. benthamiana* y *N. clevelandii*: *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. virginia* y *N. rustica*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*.

3.4.3 Inoculación por injerto en plantas silvestres de nochebuena

Como portainjerto se usaron tres plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Guerrero.

Los injertos (brotes tiernos con dos a tres hojas) se obtuvieron de las variedades “Red Prestige” y “Freedom” positivas al PnMV con la prueba de ELISA (Apéndice 3).

A cada planta silvestre se le hicieron dos incisiones oblicuas de 0.5 a 1 cm de profundidad. Los injertos se cortaron en forma de cuña (0.5 a 1cm de longitud) y se insertaron en las incisiones hechas en las plantas silvestres.

Los injertos se cubrieron con Parafilm® para prevenir la entrada de agua y se protegieron con una bolsa de plástico transparente, a la cual se le hizo una abertura de 10 cm en una de las esquinas para evitar la pérdida excesiva de humedad (Jayasinghe y Chuquillanqui, 1992). Tres días después se retiró la bolsa y las plantas se mantuvieron en observación en un cubículo aislado del invernadero de virus de la UACH.

Como testigo negativo se utilizaron dos plantas de nochebuena silvestre, una como injertó (brotes nuevos) y otra como portainjerto (plantas generadas a partir de las estacas recolectadas en el estado de Guerrero y San Luis Potosí).

IV. RESULTADOS

4.1 Caracterización de síntomas

En general, las plantas de nochebuena silvestre localizadas en Jiutepec, Morelos, en Tehuilotepec, Guerrero y en Xilitla, San Luis Potosí presentaron crecimiento arbustivo de 3 a 5 m de altura, con brácteas angostas y de color rojo brillante (Figura 1). Las hojas son de forma variable aún en la misma plata y no presentaron algún síntoma que pudiera asociarse a los inducidos por virus, pero si algunos daños mecánicos causados por insectos.

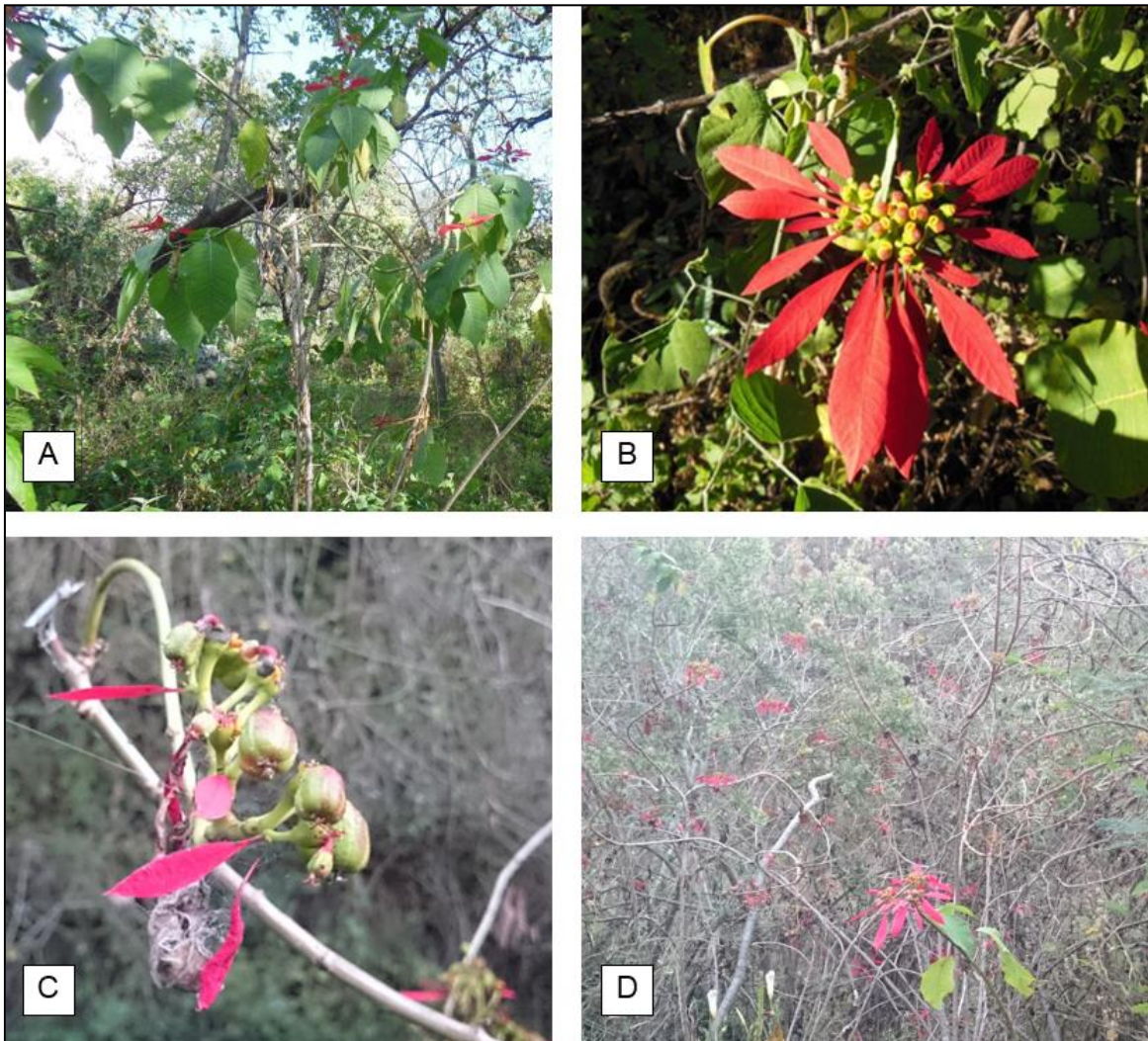


Figura 1. Plantas silvestres de nochebuena en Jiutepec, Morelos (A y B) y Tehuilotepec, Guerrero (C y D).

Algunas de las hojas de las plantas recolectadas en Jiutepec y en el invernadero de la UACH presentaron mosaico amarillo, manchas anulares, moteado, deformaciones, y puntos y manchas cloróticas (Figura 2). En las hojas de las variedades “Red Prestige” y “Freedom” se observaron mosaicos (Figura 3).

4.2 Identificación de virus

4.2.1 Identificación serológica

Las 32 plantas silvestres de nochebuena dieron reacción negativa a los antisueros de los virus que se evaluaron (Cuadro 3). En general, la absorbancia promedio de las muestras foliares para PnMV, TMV y CMV fue de 0.113, 0.119 y 0.127, respectivamente (Apéndice 4). Para el tejido radical, el cual se evaluó de las mismas plantas que se recolectaron en Tehuilotepec y Jiutepec, y en una de las plantas recolectada en el invernadero de la UACH fue de 0.134, 0.121 y 0.153, respectivamente (Apéndice 4).

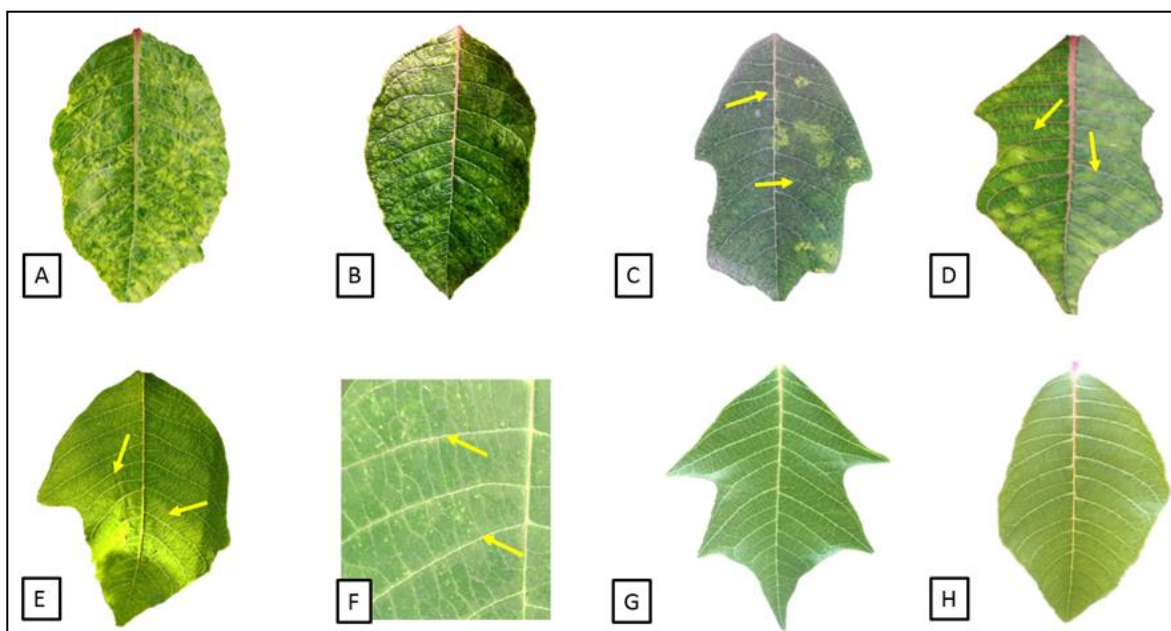


Figura 2. Hojas de plantas silvestres de nochebuena con síntomas de posible origen viral. Hojas de plantas mantenidas en el invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo. Mosaico (A y B), manchas anulares (C) y moteado (D). Hojas de plantas recolectadas en Jiutepec, Morelos. Deformación (E) y puntos cloróticos (F). Hojas asintomáticas de plantas recolectadas en Tehuilotepec, Guerrero (G) y en Xilitla, San Luis Potosí (H).

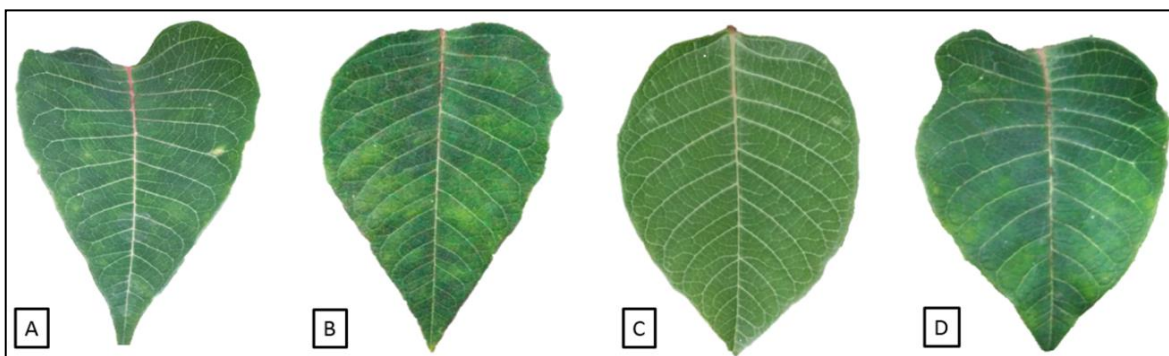


Figura 3. Hojas de plantas de variedades mejoradas de nochebuena. Variedades Freedom (A, B) y Red Prestige (D) con síntomas de mosaico. Hoja asintomática var. Freedom (C).

Cuadro 3. Resultados de la detección serológica (ELISA) del PnMV, TMV y CMV en plantas silvestres de nochebuena.

Sitio de muestreo	Número de plantas evaluadas	Hoja			Raíz		
		PnMV	TMV	CMV	PnMV	TMV	CMV
Jiutepec	10	-	-	-	-	-	-
Tehuilotepc	9	-	-	-	-	-	-
Xilitla	2	-	-	-	NA	NA	NA
UACH	11*	-	-	-	-	-	-

NA = No analizada

*Solamente la raíz de 1 de las 11 plantas se analizó

Solamente las nochebuenas “Freedom” y “Red Prestige” fueron positivas para el PnMV (Cuadro 4), con una absorbancia promedio de 0.609 y 0.286, respectivamente (Apéndice 3). El valor de absorbancia del control negativo fue de 0.1105 y para el control positivo de 1.256 (Apéndice 3). El tejido radical no se analizó.

Cuadro 4. Resultado de la detección serológica (ELISA) del PnMV, TMV y CMV en variedades mejoradas de nochebuena.

Variedades mejoradas	Número de plantas evaluadas	Hoja		
		PnMV	TMV	CMV
“Freedom”	5	+	-	-
“Red Prestige”	4	+	-	-

4.2.2 Identificación molecular

Los primers para el segmento del gen 18S ribosomal retrotranscribieron el fragmento esperado en el ARN que se aisló de las 32 plantas silvestres de nochebuena (Figura 4), pero en ningún caso se detectó a alguno de los virus en evaluación (Figura 5).

La secuencia parcial del gen 18S ribosomal fue 99% similar a las secuencia registrada en el Gen Bank (EU326598.1). Los controles positivos para el PnMV y CMV tuvieron un porcentaje de similitud del 92 y 94% con las secuencias AB550791.1 y AM183119.1 respectivamente reportadas en el GenBank. No se secuenciaron los amplicones para el positivo del TMV (Agdia).

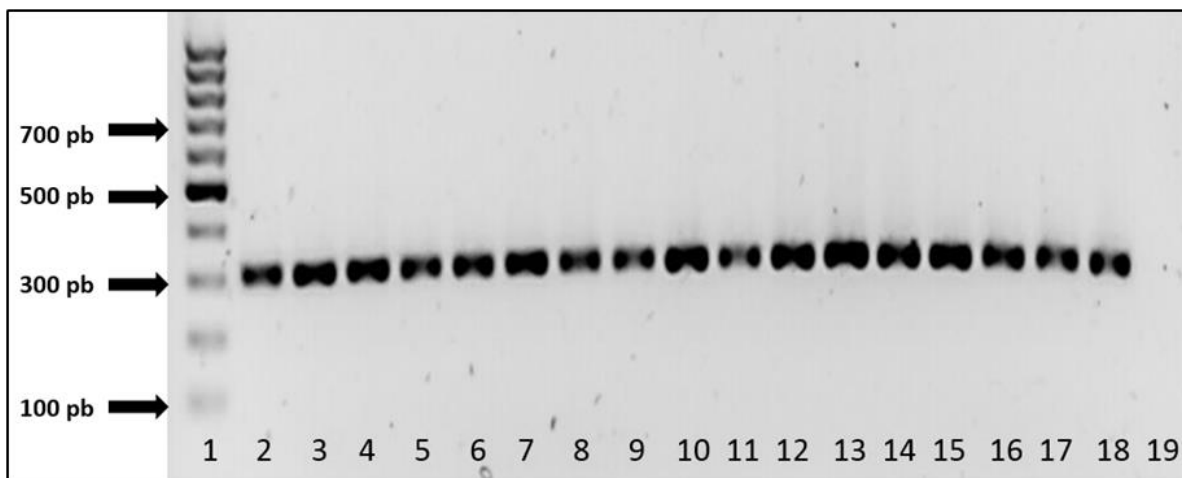


Figura 4. Productos de amplificación de la secuencia parcial del gen 18S ribosomal en muestras de ARN aislado de plantas silvestres de nochebuena (paneles 6-16). Carril 1: marcador molecular 100 pb (Thermo Scientific). Carril 2: tejido liofilizado control positivo TMV (Agdia®). Carril 3: *N. rustica*. Carril 4: Nochebuena var. “Freedom”. Carril 5: Nochebuena var. “Red Prestige”. Carriles 6-8: plantas de Tehuilotepec, Guerrero. Carriles 9-11: plantas de Jiutepec, Morelos. Carriles 12-14: plantas del invernadero de la UACH). Carriles 15 y 16: plantas de Xilitla, San Luis Potosí. Carril 17: *N. clevelandii*. Carril 18: *N. benthamiana*. Carril 19: control negativo.

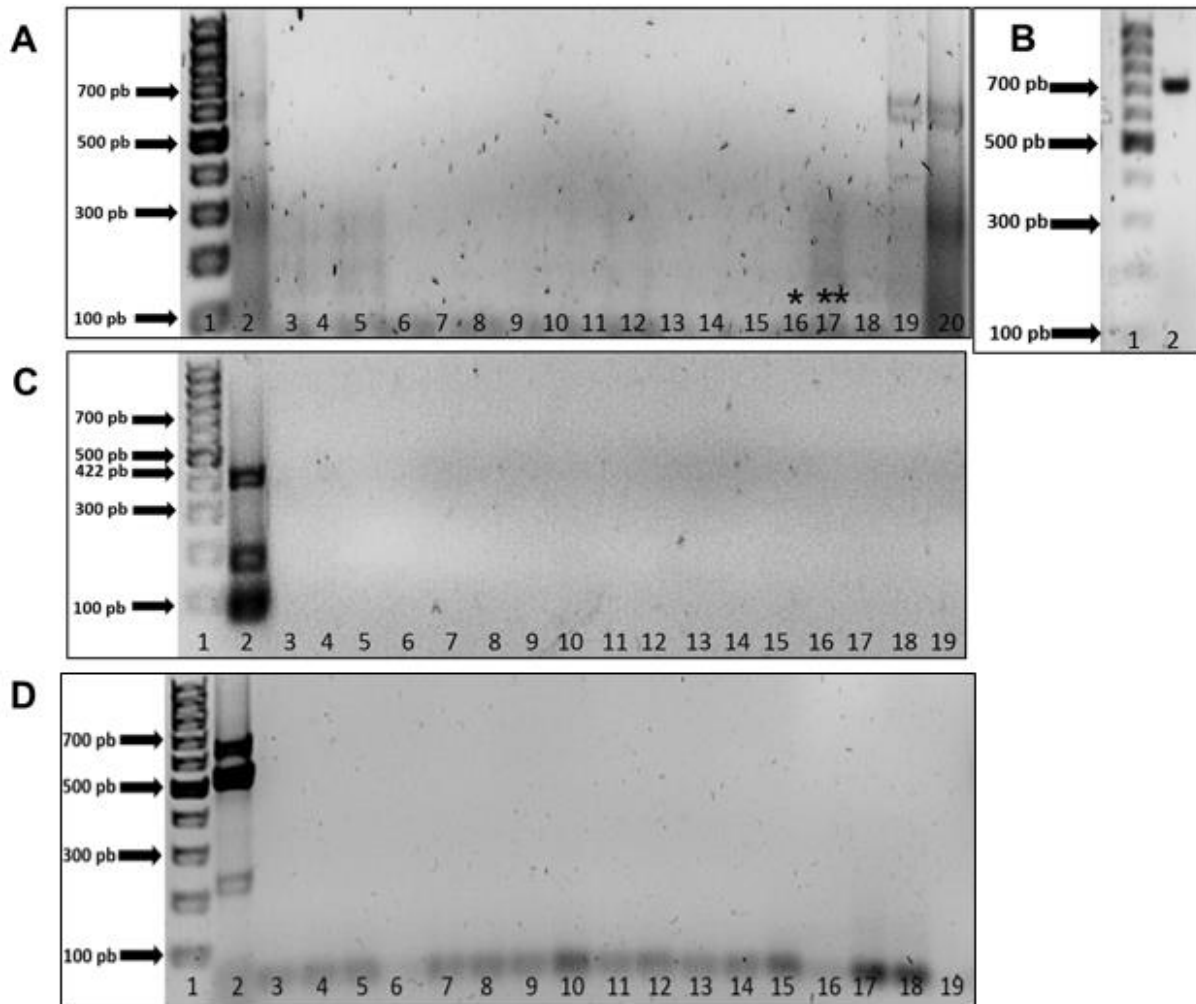


Figura 5. Productos de amplificación de las secuencias parciales del PnMV (A y B), TMV (C) y CMV (D) en ARN aislado de hojas de plantas silvestres de nochebuena (carriles 3-17). Carril 1: marcador molecular 100 pb (Thermo Scientific). Carriles 2 y 19 en panel A: Nochebuena var. “Freedom”. Carril 20 en panel A: Nochebuena. “Red Prestige”. Carril 2 en panel B: control positivo nochebuena var. “Red Prestige”. Carril 2 en panel C y D: control positivo *Agdia*[®] y control positivo *N. rustica*, respectivamente. Carriles 3-6: plantas asintomáticas (Tehuilotepic, Guerrero). Carriles 7 y 8: plantas sintomáticas (Jiutepec, Morelos). Carriles 9 y 10: plantas asintomáticas (Jiutepec, Morelos). Carriles 11 y 12: plantas asintomáticas (Xilitla, San Luis Potosí). Carriles 13 y 14: plantas sintomáticas (UACH). Carril 15: plantas asintomáticas (UACH). Carriles 16 y 17: plantas inoculadas y sin manifestación de síntomas. Carril 18 en panel A: control negativo. Carril 18 en panel C y D: Nochebuena var. “Red Prestige”. Carril 19 en panel C y D: control negativo. *Plantas inoculadas mecánicamente. ** Plantas inoculadas por injerto.

4.3 Inoculación mecánica

4.3.1 Plantas silvestres de nochebuena

No hubo transmisión mecánica de los virus; las plantas inoculadas se mantuvieron en observación durante un periodo de 9 a 13 meses y ninguna desarrolló síntomas (Figura 6). Los análisis serológicos y molecular fueron negativos (Figura 5 A, C y D carriles 16 y 17) (Apéndice 5).

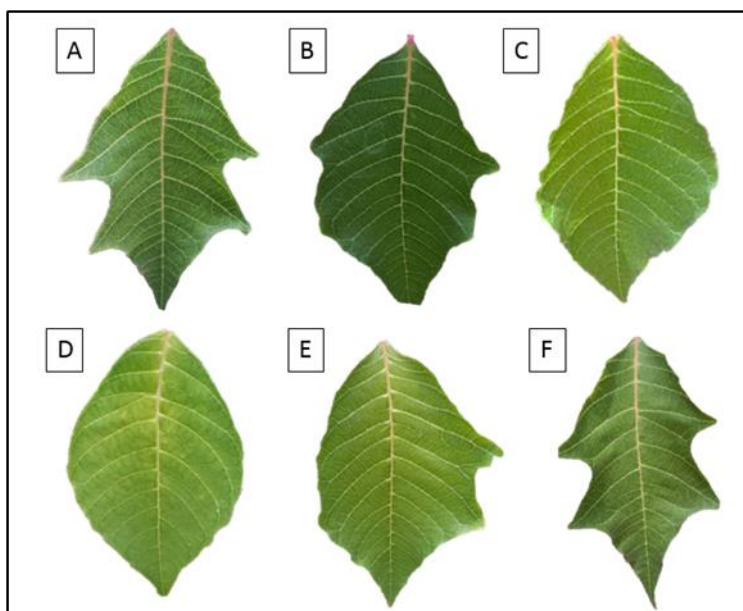


Figura 6. Hojas de plantas silvestres de nochebuena después de haberse inoculado con el PnMV (A y B), TMV (C) o CMV (D). Las hojas en E y F corresponden a plantas de controles negativos.

4.3.2 Plantas indicadoras

En el primer ensayo no hubo transmisión mecánica del PnMV a ninguna de las plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii* que se inocularon (Apéndice 5).

Posteriormente, en una segunda inoculación, todas las plantas de *N. rustica*, *N. occidentales*, *N. tabacum* cv. Xanthi y *N. virginia* mostraron síntomas de posible origen viral (moteado clorótico) a los 34 días después de haberlas inoculado (Figura 7), pero los resultados serológicos no lo confirmaron (Apéndice 5). En *N. benthamiana* se desarrollaron pequeños puntos necróticos que podrían corresponder a daños mecánicos (Figura 7 E).

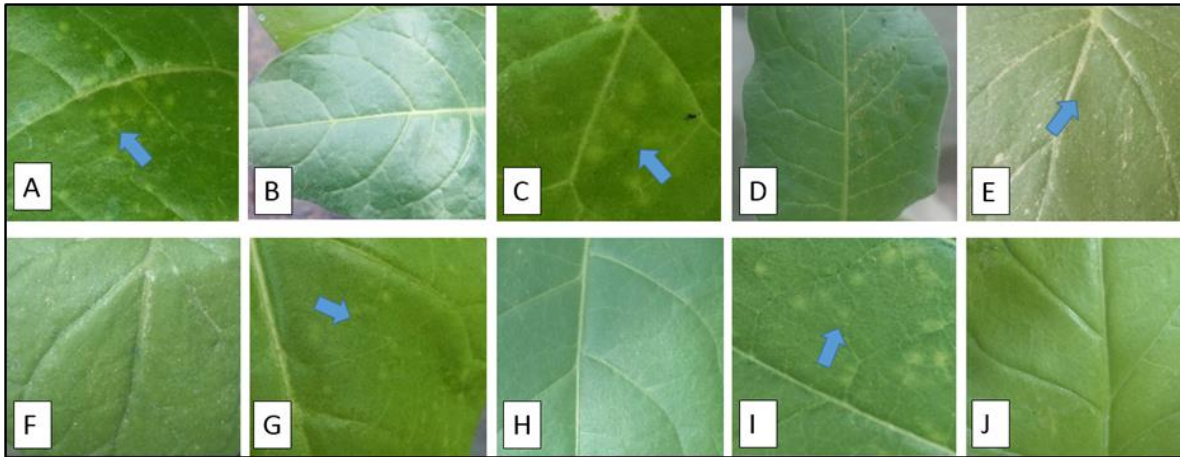


Figura 7. Hojas de *Nicotiana rustica* (A y B), *N. occidentales* (C y D), *N. benthamiana* (E y F), *N. tabacum* cv. Xanthi (G y H) y *N. virginia* (I y J) a los 34 días después de haberse inoculado con el PnMV. En todas las plantas se desarrollaron moteados cloróticos (flechas), a excepción de *N. benthamiana* en donde se presentaron pequeños puntos necróticos. B, D, F, H y J corresponden a hojas de controles negativos.

4.3.3 Inoculación por injerto

No fue posible determinar la transmisión del PnMV debido a que el injerto de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” sobre las plantas silvestres de nochebuena se deshidrató entre los 5 y 7 días posteriores a su establecimiento (Figura 8) (Apéndice 5).



Figura 8. Injertos de nochebuena variedades Freedom y Red Prestige sobre plantas de nochebuena silvestre generadas a partir de esquejes recolectados en Tehuilotepec, Guerrero.

V. DISCUSIÓN

En algunas plantas silvestres de nochebuena recolectadas en Jiutepec y en el invernadero de la UACH se observaron síntomas de moteado, deformación foliar, mosaico y manchas anulares. El moteado y la deformación de hojas coincide con los síntomas inducidos por el PnMV en plantas de nochebuena producidas en viveros comerciales del estado de Miranda, Venezuela (Carballo *et al.*, 2001) y en plantas importadas por Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), pero los análisis serológico y molecular que se realizaron en la presente investigación no detectaron al virus.

Los resultados tampoco concuerdan con lo reportado por Ocampo *et al* (2013) en plantas de “nochebuena de sol” (nochebuena semicultivada) recolectadas en Michoacán y Oaxaca. Ocampo y colaboradores detectaron nueve de 24 plantas infectadas con el PnMV y con síntomas asociados a los inducidos por virus (clorosis, mosaico, variegado, deformación foliar y manchas blancas), los cuales se expresaron después de que las plantas se habían establecido en instalaciones del INIFAP (Campo Experimental Zacatepec) a partir de varetas recolectadas en las entidades señaladas. Estos síntomas no coinciden con los inducidos por el PnMV en plantas mejoradas de nochebuena y pudieron haber sido causados por otros factores; sin embargo, el hecho de que en la savia se haya detectado al PnMV sugiere que pudo haber ocurrido contaminación con los controles positivos o que las infecciones causadas por este virus son latentes.

Si las infecciones son latentes, entonces las plantas silvestres de nochebuena asintomáticas que se recolectaron en Tehuilotepic, Jiutepec y aquellas que se desarrollaron a partir de varetas recolectadas en Xilitla, podrían constituir una fuente de resistencia al PnMV, pero todas estas plantas fueron ELISA negativas y los iniciadores específicos solo amplificaron la banda esperada en los controles positivos (nochebuenas “Freedom” y “Red Prestige”).

En plantas mejoradas de nochebuena, el PnMV puede no inducir síntomas o bien causar moteado foliar, y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001;

Lebas *et al.*, 2007). Las plantas de nochebuena “Freedom” y “Red Prestige” que se utilizaron en la presente investigación presentaron mosaicos y fueron positivas al PnMV según los resultados de ELISA y RT-PCR. Para determinar si las plantas silvestres de nochebuena son o no hospedantes del virus, la savia de las hojas de la var. “Freedom” se inoculó mecánicamente en las hojas de plantas silvestres, pero no hubo expresión de síntomas y el virus no se detectó con las técnicas utilizadas. Tampoco se determinó si los injertos de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” transmitieron al PnMV a las plantas de nochebuena silvestre debido a que los injertos abortaron.

Son diferentes factores (condiciones ambientales, condiciones biológicas de la planta donante y receptora, características de los amortiguadores que se utilizaron para preparar el inóculo) los que pudieron haber inhibido o evitado la transmisión mecánica y por injerto del PnMV a plantas silvestres de nochebuena. Sin embargo, a reserva de repetir los ensayos, es probable que la nochebuena silvestre no sea hospedante de este virus, de tal manera que podría considerarse como fuente de resistencia para la generación de variedades mexicanas que puedan entrar a un sistema de mejoramiento genético que favorezca sus características comerciales.

Los resultados de las pruebas de transmisión del PnMV a plantas indicadoras no son concluyentes. De acuerdo con Lebas *et al* (2007) y Chung *et al* (2004), este virus induce clorosis, arrugamiento foliar, mosaico y aclaramiento de nervaduras en *N. benthamiana*. Sin embargo, en nuestros ensayos, las hojas de esta planta presentaron pequeños puntos necróticos, que más que un síntoma de origen viral pudiera tratarse de un daño mecánico generado durante la inoculación, aunque en las hojas del tratamiento testigo no se presentaron.

En las hojas de *N. rustica*, *N. occidentalis* y en *N. virginia* se presentó moteado clorótico, pero la identificación serológica y molecular no detectaron al virus.

De acuerdo con Guy (1985), el PnMV no se transmitió mecánicamente a *N. benthamiana* ni a otras especies indicadoras para el género Tymovirus, al cual pertenece este patógeno, pero sí a plantas de *E. cyathophora* con inóculo obtenido de plantas comerciales (0-10%).

En contraste a los resultados observados en las plantas de nochebuena silvestre, las variedades “Freedom” y “Red Prestige” fueron positivas al PnMV, aun cuando los síntomas que mostraron no fueron severos. Como se indicó anteriormente, la nochebuena mejorada infectada con este virus puede ser asintomática o desarrollar moteado, y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007).

El PnMV es un patógeno cosmopolita; está reportado en Queensland, Australia (Spetz *et al.*, 2008), en Corea (Chung *et al.* 2004), Dinamarca (Bech, 1996), Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), Venezuela (Carballo *et al.*, 2001), entre otros países. En México, éste es el primer reporte del virus en plantas de nochebuena variedades “Freedom” y “Red Prestige”. Considerando que estas variedades son de importación, existe la posibilidad de que este patógeno se encuentre en todas las zonas productoras del país.

Respecto a la identificación del TMV, los resultados obtenidos en la presente investigación no corroboran los datos publicados por Ocampo y colaboradores en el 2013. De acuerdo con sus resultados, 37 de 105 plantas de “nochebuena de sol” con síntomas asociados a virus fueron ELISA positivas al TMV; mientras que en dos de 19 plantas detectaron al virus por RT-PCR. Nuestros datos muestran que las plantas silvestres asintomáticas y las que presentaron síntomas asociados a virus fueron serológica y molecularmente negativas al TMV. Por otro lado, las plantas silvestres que se inocularon mecánicamente con la savia de las hojas de *Physalis floridana* (infectada con TMV) no desarrollaron síntomas y tampoco se detectó al virus.

Considerando estos resultados, y que el TMV es altamente estable, “que prevalece en muchas plantas (incluyendo ornamentales) como resultado de su transmisión a través de productos del tabaco” o herramientas contaminadas, y que se transmite fácilmente de manera mecánica (Agrios, 2005), tenemos elementos que sugieren que las plantas de nochebuena silvestre no son hospedantes naturales de este patógeno. Es posible que las plantas de “nochebuena de sol”

evaluadas por Ocampo *et al.* (2013) se hayan infectado por contaminación en las instalaciones del INIFAP-Zacatepec.

Finalmente, nuestros análisis por ELISA y RT-PCR tampoco detectaron al CMV en las plantas silvestres de nochebuena que se evaluaron, por lo que no se corroboran las observaciones de Ocampo (2012), en donde el virus se detectó serológicamente en “nochebuena de sol”. Este virus es uno de los patógenos de mayor distribución mundial e infecta a más de 1200 especies, incluyendo cultivos de importancia agrícola, malezas y plantas no cultivadas (Dubey *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Dragich *et al.*, 2014).

El CMV incluye numerosas variantes con marcadas diferencias en patogenicidad, virulencia y en los síntomas que inducen en sus hospedantes; se transmite de manera mecánica, por semilla y por insectos (escarabajos del pepino y más de 60 especies de áfidos) (Zitter and Murphy, 2009; Dragich *et al.*, 2014).

VI. CONCLUSIONES

Las plantas silvestres de nochebuena no son hospedantes del PnMV, por lo que podrían considerarse como una fuente de resistencia para este virus; tampoco son hospedantes naturales del TMV ni del CMV.

El PnMV induce mosaico en plantas de nochebuena variedades “Freedom” y “Red Prestige”.

Se reporta por primera vez en México al PnMV en las variedades “Freedom” y “Red Prestige”.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- aus dem Siepen M., Pohl J. O., Koo B., Jeske H. 2005. *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but a natural polerovirus–sobemovirus hybrid. *Virology* 336 (2):240-250.
- Bech K. 1996. Methods to eliminate *Poinsettia mosaic virus* in *Euphorbia pulcherrima* and reinfection by different methods to reveal the nature of the branching factor. International Society for Horticultural Science (ISHS). *Phytoparasitica* 24 (4): 346.
- CABI/EPPO. http://www.eppo.int/QUARANTINE/virus/Euphorbia_mosaic_virus/EUMV00_ds.pdf (consulta 1 mayo 2015).
- Canul K. J., García P. F., Ramírez R. S. y Osuna C. F de J. 2010b. Estrategias para el mejoramiento genético de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) *Investigación Agropecuaria* 7(1):44-54.
- Canul K. J., García P. F., Ramírez R. S., Osuna C. F. J. 2010a. Programa de mejoramiento genético de nochebuena en Morelos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México. Publicación especial No. 49. 36 p.
- Canul KJ, García PF, Barrios GEJ, Osuna CFJ, Ramírez RS, Alía TI y Montoya CRE. 2014. Caracterización morfológica de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México* 2:16-23.
- Carballo O., Izaguirre M. L. and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting *Poinsettias* (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant disease* 85 (11):1208.
- Colinas L. M. T., Mejía M. J. M., Espinoza, F. A., Alía, T.I., Martínez, M. F., Rodríguez E. F. y Flores E. C. 2009. La Nochebuena de sol o de jardín. SNICS, SINAREFI, UACH. 15 p.
- Collins A.M., Brown J.K., Reuman M.M, and Roye M. E. 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.
- Chung B. N., Lee E. K., Jeong M. I. and Kim H. R. 2004. First Report on *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20 (3): 220-223.
- Dragich M., Melzer M. and Nelson S. 2014. *Cucumber mosaic virus* in Hawaii. University of Hawaii at Manoa college of Tropical Agriculture and Human Resources. *Plant Disease* 10p.
- Dubey V.K., Aminuddin and Singh V.P. 2008. First report of a subgroup 1A *Cucumber mosaic virus* isolate from gladiolas in India. *Australian Plant Disease Notes* 3(1):35-37.

- Fernandes F. R., Albuquerque L. C., Oliveira C. L., Cruz A. R. R., Rocha W. B., Pereira T. G., Naito F. Y. B, Dias N., Nagata T., Faria J. C., Zerbini F. M., Aragao F., Inoue-Nagata A. K. 2011. Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, *Euphorbia yellow mosaic virus* (EuYMV) infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology* 156 (11): 2063–2069.
- Galindo-García D. B., Alia-Tejacal I., Andrade-Rodríguez M., Colinas-León M. T., Canul-Ku J., Sainz-Aispuro M. J. 2012. Producción de nochebuena de sol en Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (4): 751-763.
- García-Rodríguez O. G., Pérez-Moreno L., Navarro-León M. J., Salas-Araiza M. D., Martínez J. O. A., León-Galván M. F., Nuñez-Palenius H. G. 2014. Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. Nota científica. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 20(2): 147-156.
- Gregorio J. J., Bernal A. A., Bañuelos H. B., Alpuche S. A., Hernández Z. C., Moreno V. O., Frías T. G., Argüello A. G. R. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal* 7(1): 275-289.
- Guy P. 1985. New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *The Australasian Plant Pathology* 14 (1): 12-13.
- Hernández Z. C., Idris A. M., Carnevali G., Brown J. K., Moreno V. 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 (5): 763–770.
- Jayasinghe U. y Chuquillanqui C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus de papa. Guía de investigación. CIP 21. Lima, Perú. 30 p.
- Kim M.K., Kawak HR, Lee SH., Kim JS, Kim KH., Cha B.J. and Choi Hong-Soo. 2011. Characteristics of *Cucumber mosaic virus* isolate from *Zea mays* in Korea. *Plant Pathology Journal* 27(4):372-377.
- 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(1):110.
- Martins D.R., Rodrigues S.E., Pedroso J.C., Arakava R., Rodrigues A.A.M, Lazarini B.A.A., Batista V.J. 2008. Detection and Identification of TMV Infecting Tomato Under Protected Cultivation in Paraná State. *Brazilian archives of biology and technology* 51(5): 903-909.
- Mejía-Muñoz J. M., Colinas-León M. T., Espinosa-Flores A., Martínez-Martínez, F., Gaytán-Acuña, A., Alia-Tejacal, I. 2006. Manual gráfico para la descripción varietal de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Will. ex Klotzsch). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SNICS-SAGARPA) y Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. 60 p.

- Ocampo O. T. 2012. Identificación de virus asociados a la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 47 p.
- Ocampo O. T., Ochoa M. D. L., Ramírez R. S., Valdovinos P. G. y Nava D. C. 2013. Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 235-241.
- Rodríguez C. F. 2010. Flor de nochebuena. *Revista Claridades Agropecuarias de Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA/SAGARPA)* 208: 44-46.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo (consulta, mayo 2015).
- SINAREFI. 2010. Red Nochebuena. Diagnóstico. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). SAGARPA. 124 p.
- 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(7):713–716.
- Spetz C., Moe R. and Blystad DR. 2008. Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of *Poinsettia mosaic virus*. *Archives of virology* 153 (7): 1347-1351.
- Steinmann V.W. 2012. *Euphorbia mayfieldii*, a New Species of Section Poinsettia from Bolivia. *Systematic Botany* 37(4): 960–963.
- Trejo L., Feria A. T. P., Olsen K. M., Eguiarte L. E., Arroyo B., Gruhn J. A., and Olson M. E. 2012. Poinsettia's wild ancestor in the mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany* 99(7): 1146–1157.
- USDA. 2104. Floriculture Crops 2013 Summary (June 2014). USDA, National Agricultural Statistics Service. 59 p.
- Vidalie H. 2001. Producción de flores y plantas ornamentales. Tercera Edición. España. pp 33-38.
- Zamboni A., Pierantoni L., De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woodyplants. *iForest – Biogeosciences and Forestry* 1: 12.
- Zitter, T. A. and Murphy J. F. 2009. Cucumber mosaic. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0518-01.

APÉNDICE 1

Condiciones de retrotranscripción

Virus	Retrotranscripción	PCR		
<i>Poinsettia mosaic virus</i> (PnMV)	Paso 1	Buffer KCl	0.5X	
	ARN total	3 µL	Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5X
	Primer PnMV-F	0.5 mM	MgCl ₂	1.5 mM
	Primer PnMV-R	0.5 mM	dNTP's	0.2 mM
	Agua de PCR		Primer PnMV-F	0.5 mM
			Primer PnMV-R	0.5 mM
	Incubar a 65°C durante 10 min.		Taq polimerasa 5U (Thermo Scientific)	5 U
	Paso 2		ADNc	5 µL
	Buffer RT	1X	Mezcla total	25 µL
	DTT	0.01 M		
	dNTP's	0.5 mM		
	Reversa transcriptasa M-MLV (Promega)	200 U		
Mezcla total				
Incubar a 42°C y 70°C durante 60 y 10 min respectivamente.				
Fuente: Ocampo <i>et al.</i> , 2013.				
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Paso 1	Buffer KCl	0.5X	
	ARN total	3 µL	Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5X
	Primer TMV1	0.5 mM	MgCl ₂	1.25 mM
	Primer TMV-2	0.5 mM	dNTP's	0.2 mM
	Agua de PCR		Primer TMV1	0.5 mM
			Primer TMV-2	0.5 mM
	Incubar a 72°C durante 10 min.		Taq polimerasa 5U (Thermo Scientific)	2.5 U
	Paso 2		ADNc	2 µL
	Buffer RT	1X	Mezcla total	25 µL
	DTT	0.01 M		
	dNTP's	0.5 mM		
	Reversa transcriptasa M-MLV (Promega)	200 U		
Mezcla total				
Incubar a 42°C y 65°C durante 60 y 10 min respectivamente.				
Fuente: Martins <i>et al.</i> , 2008.				

Virus	Retrotranscripción		PCR	
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Paso 1		Buffer KCl	0.4X
	ARN total	3 μ L	Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	0.4X
	Primer CMV1	0.5 mM	MgCl ₂	1.3 mM
	Primer CMV2	0.5 mM	dNTP's	0.7 mM
	Agua de PCR		Primer CMV1	0.5 mM
			Primer CMV2	0.5 mM
	Incubar a 70°C durante 10 min.		Taq polimerasa 5U (Thermo Scientific)	1.25 U
	Paso 2		ADNc	9 μ L
	Buffer RT	1X	Mezcla total	58 μ L
	DTT	0.01 M		
dNTP's	1 mM			
Reversa transcriptasa M-MLV (Promega)	200 U			
	Mezcla total	20 μ L		
Incubar a 42°C y 70°C durante 60 y 10 min respectivamente.				
Fuente: Singh <i>et al.</i> , 1995; Zitikaité <i>et al.</i> , 2011.				

APÉNDICE 2

Condiciones de amplificación

- **Secuencia parcial del gen 18S ribosomal (Zamboni *et al.*, 2008)**

Etapa	Ciclos	Duración	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	3 min	94
Desnaturalización	30	30 s	94
Alineamiento		30 s	55
Extensión		1 min	72
Extensión final	1	2 min	70

- **Secuencia parcial del PnMV (Ocampo *et al.*, 2013)**

Etapa	Ciclos	Duración	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	2 min	94
Desnaturalización	35	30 s	94
Alineamiento		30 s	55
Extensión		60 s	72
Extensión final	1	7 min	72

- **Secuencia parcial del TMV (Martins *et al.*, 2008)**

Etapa	Ciclos	Duración	Temperatura °C)
Desnaturalización inicial	1	3 min	94
Desnaturalización	35	30 s	94
Alineamiento		45 s	62
Extensión		60 s	72
Extensión final	1	5 min	72

- **Secuencia parcial del CMV (Singh *et al.*, 1995)**

Etapa	Ciclos	Duración	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	3 min	92
Desnaturalización	35	1 min	95
Alineamiento		1 min	60
Extensión		1.5 min	72
Extensión final	1	7 min	72

APÉNDICE 3

Resultados ELISA en plantas mejoradas de nochebuena

- *Poinsettia mosaic virus* (PnMV)

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Freedom"	Hoja	1.160	1.160	1.160	+
2			0.344	0.368	0.356	+
3			0.534	0.628	0.581	+
4			0.451	0.558	0.505	+
5			0.446	0.450	0.448	+
Promedio					0.610	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.113	0.108	0.110	-
	Agdia®	Testigo +	1.280	1.232	1.256	+

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Red Prestige"		0.246	0.234	0.240	+
2			0.408	0.416	0.412	+
3			0.235	0.221	0.228	+
4			0.275	0.253	0.264	+
Promedio					0.286	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.113	0.108	0.110	-
	Agdia®	Testigo +	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = **0.221**

- Tobacco mosaic virus (TMV)

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Freedom"	Hoja	0.110	0.130	0.120	-
2			0.106	0.110	0.108	-
3			0.117	0.109	0.113	-
4			0.100	0.100	0.100	-
Promedio					0.110	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.108	0.101	0.1045	-
	Agdia®	Testigo +	1.026	0.994	1.010	+

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Red Prestige"		0.110	0.110	0.110	-
2			0.119	0.113	0.116	-
3			0.110	0.110	0.110	-
4			0.102	0.100	0.101	-
Promedio					0.109	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.108	0.101	0.104	-
	Agdia®	Testigo +	1.026	0.994	1.010	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1045 x 2 = **0.209**

- Cucumber mosaic virus (CMV)

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Freedom"	Hoja	NA	NA		
2			0.102	0.102	0.102	-
3			0.101	0.113	0.107	-
4			0.102	0.106	0.104	
5			0.109	0.103	0.106	-
Promedio					0.104	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.174	0.150	0.162	-
	Agdia®	Testigo +	1.274	1.200	1.237	+

Número de planta	Variedad	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	"Red Prestige"		0.119	0.127	0.123	-
2			0.157	0.249	0.203	-
3			0.102	0.101	0.101	-
4			0.172	0.167	0.1695	-
Promedio					0.149	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.174	0.150	0.162	-
	Agdia®	Testigo +	1.274	1.200	1.237	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.162 x 2 = **0.324**

APÉNDICE 4

Resultados ELISA en plantas silvestres de nochebuena

- *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) / hoja

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepec	Hoja	0.109	0.109	0.109	-
2			0.114	0.118	0.116	-
3			0.119	0.126	0.123	-
4			0.112	0.101	0.107	-
5			0.109	0.104	0.107	-
6			0.108	0.107	0.108	-
7			0.120	0.110	0.115	-
8			0.124	0.112	0.118	-
9			0.192	0.190	0.191	-
1	Jutepec		0.107	0.109	0.108	-
2			0.102	0.117	0.110	-
3			0.100	0.107	0.104	-
4			0.101	0.111	0.106	-
5			0.107	0.108	0.108	-
6			0.105	0.117	0.111	-
7			0.104	0.115	0.110	-
8			0.114	0.107	0.111	-
9			0.114	0.111	0.113	-
10		0.115	0.114	0.115	-	
1	Xilitla	0.114	0.118	0.116	-	
2		0.111	0.210	0.161	-	
1	UACH	0.107	0.103	0.107	-	
2		0.102	0.104	0.102	-	
3		0.103	0.107	0.103	-	
4		0.101	0.103	0.101	-	
5		0.106	0.106	0.106	-	
6		0.106	0.280	0.106	-	
7		0.107	0.118	0.107	-	
8		0.104	0.107	0.104	-	
9		0.108	0.110	0.108	-	
10		0.116	0.116	0.116	-	
11		0.105	0.106	0.105	-	
Promedio				0.113		
<i>N. benthamiana</i>		Testigo -	0.113	0.108	0.110	-
Agdia®		Testigo +	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = **0.221**

- *Poinsettia mosaic virus* / raíz

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepic	Raíz	0.110	0.194	0.152	-
2			0.102	0.106	0.104	-
3			0.103	0.102	0.103	-
4			0.193	0.187	0.190	-
5			0.195	0.194	0.195	-
6			0.128	0.190	0.159	-
7			0.199	0.116	0.158	-
8			0.194	0.150	0.172	-
9			0.189	0.198	0.194	-
1	Jiutepec		0.107	0.105	0.106	-
2			0.111	0.106	0.109	-
3			0.106	0.114	0.110	-
4			0.113	0.116	0.115	-
5			0.103	0.117	0.110	-
6			0.115	0.120	0.118	-
7			0.109	0.118	0.114	-
8			0.106	0.119	0.113	-
9			0.111	0.112	0.112	-
10	UACH		0.116	0.116	0.116	-
11		0.180	0.102	0.141	-	
Promedio					0.1345	-
<i>N. benthamiana</i>		Testigo -	0.113	0.108	0.1105	-
Agdia®		Testigo +	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = **0.221**

• Tobacco mosaic virus / hoja

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepc	Hoja	0.119	0.107	0.113	-
2			0.120	0.124	0.122	-
3			0.119	0.111	0.115	-
4			0.128	0.116	0.122	-
5			0.131	0.108	0.120	-
6			0.121	0.117	0.119	-
7			0.122	0.111	0.117	-
8			0.137	0.138	0.138	-
9			0.111	0.108	0.110	-
1	Jiutepec		0.120	0.123	0.122	-
2			0.106	0.106	0.106	-
3			0.106	0.102	0.104	-
4			0.101	0.113	0.107	-
5			0.107	0.110	0.109	-
6			0.105	0.107	0.106	-
7			0.106	0.103	0.105	-
8			0.101	0.114	0.108	-
9			0.116	0.122	0.119	-
10			0.100	0.100	0.100	-
1	Xilitla		0.115	0.116	0.116	-
2			0.117	0.114	0.116	-
1	UACH	0.112	0.119	0.116	-	
2		0.102	0.102	0.102	-	
3		0.102	0.104	0.103	-	
4		0.102	0.113	0.108	-	
5		0.106	0.108	0.107	-	
6		0.107	0.104	0.106	-	
7		0.100	0.113	0.107	-	
8		0.120	0.111	0.116	-	
9		0.102	0.104	0.103	-	
10		0.117	0.108	0.113	-	
11		0.111	0.100	0.106	-	
Promedio					0.111	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.108	0.101	0.104	-
	Agdia®	Testigo +	1.026	0.994	1.010	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1045 x 2 = **0.209**

- Tobacco mosaic virus / raíz

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepic	Raíz	0.193	0.195	0.194	-
2			0.108	0.106	0.107	-
3			0.127	0.118	0.123	-
4			0.131	0.125	0.128	-
5			0.131	0.118	0.125	-
6			0.122	0.127	0.125	-
7			0.144	0.166	0.155	-
8			0.131	0.145	0.138	-
9			0.131	0.139	0.135	-
1	Jiutepec		0.117	0.108	0.113	-
2			0.116	0.114	0.115	-
3			0.108	0.133	0.121	-
4			0.106	0.100	0.103	-
5			0.108	0.103	0.106	-
6			0.107	0.103	0.105	-
7			0.110	0.105	0.108	-
8			0.104	0.100	0.102	-
9			0.106	0.100	0.103	-
10		0.103	0.116	0.110	-	
11	UACH	0.104	0.118	0.111	-	
Promedio					0.1213	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.108	0.101	0.1045	-
	Agdia®	Testigo +	1.026	0.994	1.010	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1045 x 2 = **0.209**

- Cucumber mosaic virus / hoja

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepic	Hoja	0.104	0.112	0.108	-
2			0.174	0.158	0.166	-
3			0.143	0.119	0.131	-
4			0.143	0.132	0.138	-
5			0.135	0.138	0.137	-
6			0.137	0.128	0.133	-
7			0.136	0.124	0.130	-
8			0.145	0.122	0.134	-
9			0.153	0.143	0.148	-
1	Jiutepec		0.238	0.162	0.200	-
2			0.165	0.162	0.164	-
3			0.146	0.163	0.155	-
4			0.128	0.159	0.144	-
5			0.136	0.167	0.152	-
6			0.170	0.166	0.168	-
7			0.173	0.177	0.175	-
8			0.160	0.146	0.153	-
9			0.165	0.150	0.158	-
10			0.180	0.164	0.172	-
1	Xilitla		0.010	0.011	0.011	-
2			0.007	0.002	0.005	-
1	UACH		0.180	0.107	0.144	-
2			0.109	0.103	0.106	-
3			0.092	0.107	0.100	-
4			0.077	0.106	0.092	-
5			0.079	0.112	0.096	-
6			0.112	0.110	0.111	-
7		0.116	0.120	0.118	-	
8		0.104	0.096	0.100	-	
9		0.109	0.101	0.105	-	
10		0.121	0.107	0.114	-	
11		0.118	0.113	0.116	-	
Promedio				0.1276		
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.174	0.150	0.162	-
	Agdia®	Testigo +	1.274	1.200	1.237	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.162 x 2 = **0.324**

- *Cucumber mosaic virus* / raíz

Número de planta	Sitio de muestreo	Órgano	Repeticiones		Promedio	Resultado
			I	II		
1	Tehuilotepic	Raíz	0.150	0.108	0.129	-
2			0.103	0.101	0.102	-
3			0.101	0.105	0.103	-
4			0.143	0.160	0.152	-
5			0.146	0.147	0.147	-
6			0.164	0.176	0.170	-
7			0.174	0.199	0.187	-
8			0.116	0.134	0.125	-
9			0.110	0.129	0.120	-
1	Jiutepec		0.173	0.168	0.171	-
2			0.171	0.164	0.168	-
3			0.179	0.170	0.175	-
4			0.169	0.168	0.169	-
5			0.176	0.179	0.178	-
6			0.168	0.178	0.173	-
7			0.165	0.175	0.170	-
8			0.170	0.173	0.172	-
9			0.169	0.174	0.172	-
10			0.159	0.172	0.166	-
11	UACH	0.114	0.112	0.113	-	
Promedio					0.1531	
	<i>N. benthamiana</i>	Testigo -	0.174	0.150	0.162	-
	Agdia®	Testigo +	1.274	1.200	1.237	+

Límite de detección (**L. D.**) = Promedio testigo negativo x 2 = 0. 162 x 2 = **0.324**

APÉNDICE 5

Resultados ELISA en plantas inoculadas

- Plantas silvestres de nochebuena inoculadas mecánicamente con el PnMV

Sitio de muestreo	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Tehuilotepic, Guerrero	0.115	0.107	0.111	-
	0.110	0.131	0.121	-
Xilitla, San Luis Potosí	0.098	0.092	0.095	-
	0.099	0.096	0.098	-
Testigo negativo, Tehuilotepic, Guerrero	0.102	0.113	0.108	-
Testigo negativo, Xilitla, San Luis Potosí	0.101	0.113	0.107	-
Testigo negativo <i>N. benthamiana</i>	0.099	0.108	0.104	-
Testigo positivo (Agdia)	0.714	0.886	0.800	+

Límite de detección (L.D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.208

- Plantas silvestres y mejoradas de nochebuena inoculadas mecánicamente con el TMV

Sitio de muestreo / variedad mejorada	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Tehuilotepic, Guerrero	0.105	0.113	0.109	-
	0.106	0.114	0.110	-
"Freedom"	0.094	0.100	0.097	-
	0.093	0.097	0.095	-
	0.098	0.100	0.099	-
"Red Prestige"	0.111	0.109	0.110	-
	0.112	0.105	0.109	-
Testigo negativo Tehuilotepic, Guerrero	0.101	0.110	0.106	-

Testigo negativo "Freedom"	0.097	0.121	0.109	-
Testigo negativo "Red Prestige"	0.108	0.103	0.106	-
Testigo negativo <i>N. benthamiana</i>	0.103	0.107	0.105	-
Testigo positivo (Agdia)	0.684	0.888	0.786	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.210

- Plantas silvestres y mejoradas de nochebuena inoculadas mecánicamente con el CMV

Sitio de muestreo / variedad mejorada	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Tehuilopec, Guerrero	0.102	0.111	0.107	-
	0.104	0.119	0.112	-
"Freedom"	0.128	0.115	0.122	-
	0.123	0.116	0.120	-
	0.111	0.112	0.112	-
"Red Prestige"	0.113	0.123	0.118	-
	0.101	0.118	0.110	-
Testigo negativo Tehuilopec, Guerrero	0.105	0.120	0.113	-
Testigo negativo "Freedom"	0.102	0.110	0.106	-
Testigo negativo "Red Prestige"	0.107	0.111	0.109	-
Testigo negativo <i>N. benthamiana</i>	0.101	0.132	0.117	-
Testigo positivo (Agdia)	0.725	0.819	0.772	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.234

- Plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con el PnMV (primera inoculación)

Muestra	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0.110	0.109	0.110	-
	0.159	0.151	0.155	-
	0.160	0.149	0.155	-
<i>Nicotiana clevelandii</i>	0.110	0.110	0.110	-
	0.139	0.156	0.148	-
	0.114	0.130	0.122	-
<i>N. benthamiana</i> testigo negativo	0.120	0.118	0.119	-
Testigo Positivo (Agdia)	0.530	0.990	0.760	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.238

- Plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con el PnMV (segunda inoculación)

Muestra	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
<i>N. benthamiana</i>	0.133	0.192	0.163	-
	0.168	0.147	0.158	-
	0.152	0.139	0.146	-
<i>N. clevelandii</i>	0.162	0.129	0.146	-
	0.152	0.139	0.146	-
	0.111	0.130	0.121	-
<i>N. tabacum</i> cv. Xhanti	0.122	0.118	0.120	-
	0.140	0.153	0.147	-
	0.130	0.139	0.135	-

<i>N. glutinosa</i>	0.135	0.140	0.138	-
	0.128	0.138	0.133	-
	0.141	0.138	0.140	-
<i>N. occidentalis</i>	0.130	0.147	0.139	-
	0.135	0.132	0.134	-
	0.133	0.132	0.133	-
<i>N. virginia</i>	0.129	0.121	0.125	-
	0.115	0.132	0.124	-
	0.118	0.120	0.119	-
<i>N. rustica</i>	0.152	0.143	0.148	-
	0.147	0.164	0.156	-
	0.149	0.139	0.144	-
<i>D. stramonium</i>	0.149	0.148	0.149	-
	0.138	0.131	0.135	-
	0.138	0.141	0.140	-
<i>Ch. amaranticolor</i>	0.173	0.150	0.162	-
	0.144	0.166	0.155	-
	0.168	0.146	0.157	-
<i>Ch. quinoa</i>	0.159	0.159	0.159	-
	0.142	0.133	0.138	-
	0.167	0.153	0.160	-
<i>N. benthamiana</i> testigo negativo	0.119	0.105	0.112	-
Testigo positivo (Agdia)	0.422	1.200	0.811	+

PnMV: Límite de detección (L.D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.224

- Plantas silvestres de nochebuena inoculadas por injerto con el PnMV

Sitio de muestreo	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Tehuilotepec, Guerrero	0.114	0.132	0.123	-
	0.103	0.099	0.101	-
	0.099	0.100	0.099	-
Testigo negativo Tehuilotepec, Gro.	0.120	0.110	0.115	-
Testigo negativo <i>N. benthamiana</i>	0.105	0.115	0.110	-
Testigo positivo (Agdia)	0.670	0.796	0.733	+

Límite de detección (L.D.) = Promedio testigo negativo x 2=0.220