



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS MOSAICO DE LA POINSETTIA
(TYMOVIRUS) EN VARIEDADES COMERCIALES DE *Euphorbia
pulcherrima* Y SU RELACIÓN CON FENOLES Y ALGUNAS
ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

OMAR JACOBO VILLEGAS

Bajo la supervisión de: MARÍA TERESA COLINAS LEÓN, Ph. D.



Instituto de Horticultura



APROBADA



Chapingo, Estado de México, julio de 2020

La presente tesis titulada: **Identificación del Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima* y su relación con fenoles y algunas enzimas antioxidantes**, realizada por el alumno: **Omar Jacobo Villegas**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

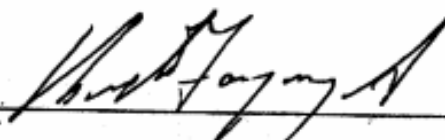
COMITÉ ASESOR

DIRECTOR



DRA. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN.

ASESOR:



DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



DR. IRÁN ALIA TEJACAL

Chapingo, Estado de México, julio de 2020.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 El cultivo de nochebuena.....	15
2.1.1 Valor histórico y cultural	16
2.1.2 Importancia económica	16
2.2 Virus reportados en nochebuena.....	17
2.3 Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP).....	17
2.3.1 Miembro putativo del género Tymovirus.....	17
2.3.2 Sintomatología.....	17
2.3.3 Dispersión.....	18
2.3.4 Transmisión	19
2.3.5 Daño celular	19
2.3.6 Estudio biológico	19
2.4 Otros virus que atacan al género Euphorbia.....	20
2.4.1 Virus del Enrollamiento de las Hojas de las Euforbias (VEHE)	20
2.4.2 Virus Latente de la Poinsettia (VLP).....	21
2.4.3 Virus Mosaico de las Cucurbitáceas (VMC)	21
2.4.4 Virus Mosaico del Tabaco (VMT)	23
2.5 Respuestas de defensa en plantas.....	24
2.5.1 Proteínas	25
2.5.2 Compuestos fenólicos	25
2.5.3 Peroxidasa (EC 1.11.1.7, POX).....	26

2.5.4	Catalasa (EC.1.11.1.6, CAT)	27
2.5.5	Fenilalanina amonio-liasas (EC 4.3.1.5, PAL)	27
2.6	LITERATURA CITADA	29
3.	Identificación del Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus) en variedades comerciales de <i>Euphorbia pulcherrima</i>	35
3.1	Resumen	35
3.2	<i>Abstract</i>	36
3.3	INTRODUCCIÓN	36
3.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.4.1	Adquisición del material vegetal	38
3.4.2	Análisis serológico	38
3.4.3	Análisis molecular.....	39
3.4.4	Inoculación mecánica del VMP.....	40
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.5.1	Sintomatología.....	41
3.5.2	Análisis serológico y molecular.....	43
3.5.3	Inoculación mecánica del VMP.....	47
3.6	CONCLUSIONES	50
3.7	LITERATURA CITADA	51
4.	Fenoles y enzimas en variedades de nochebuena infectadas con el Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus)	54
4.1	Resumen	54
4.2	<i>Abstract</i>	55
4.3	INTRODUCCIÓN	55
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	57

4.4.1	Material vegetal	57
4.4.2	Análisis serológico y molecular.....	57
4.4.3	Variables evaluadas	57
4.4.4	Polvo de acetona.....	58
4.4.5	Proteínas solubles totales.....	58
4.4.6	Fenoles totales	59
4.4.7	Peroxidasa (EC 1.11.1.7, POX).....	59
4.4.8	Catalasa (EC.1.11.1.6, CAT)	59
4.4.9	Fenilalanina amonio-liasas (EC 4.3.1.5, PAL)	60
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.5.1	Sintomatología.....	61
4.5.2	Análisis serológico y molecular.....	61
4.5.3	Proteínas solubles totales.....	62
4.6	Fenoles totales	65
4.7	Actividad de POX.....	67
4.8	Actividad de CAT	68
4.9	Actividad de PAL	68
4.10	Correlaciones.....	69
4.11	CONCLUSIONES	71
4.12	LITERATURA CITADA	72
5.	APÉNDICE	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 1).....	43
Cuadro 2. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 2).....	44
Cuadro 3. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 3).....	45
Cuadro 4. Resultados de las pruebas moleculares en la identificación del VMP en variedades comerciales de nochebuena.....	46
Cuadro 5. Comparación de las secuencias de ADN obtenidas en el análisis molecular con las registradas en el GenBank para el VMP.	47
Cuadro 6. Valores de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA en la detección del VMP en 'Red Prestige'.	62
Cuadro 7. Promedios de presencia y actividad de los metabolitos en variedades comerciales de nochebuena.	64
Cuadro 8. Correlación entre variables de las variedades comerciales de nochebuena.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas ocasionados por el VMP en nochebuena..	18
Figura 2. Síntomas putativos a virus en variedades comerciales de nochebuena	42
Figura 3. Síntomas observados en plantas diferenciales inoculadas con el VMP	49
Figura 4. Sintomatología viral en variedades de nochebuena.	61
Figura 5. Proteínas solubles totales en variedades de nochebuena.	63
Figura 6. Concentración de fenoles y actividad enzimática en variedades de nochebuena	66

LISTA DE APÉNDICE

Apéndice 1. Secuencias parciales obtenidas del Virus Mosaico de la Poinsettia en variedades comerciales de nochebuena.....	75
---	----

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres: Margarita Natalia Villegas Martínez y Tomás Jacobo Benítez, por sus consejos, motivación y apoyo incondicional.

A mis hermanos: Jenny, Norma, Mayra, Eduardo, por su apoyo y cariño.

A mis sobrinos, por su cariño incondicional.

A la familia Alvarado Villegas, por sus consejos y apoyo.

A mis abuelitos, Domingo y Soledad, y Catalina Martínez, por todo el cariño y apoyo.

A la familia Soto Garcilaso por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, por todos los conocimientos aprendidos, por las facilidades y apoyos brindados durante el proceso de formación doctoral.

Al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF), y al Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH, por las facilidades brindadas en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. María Teresa Colinas León, por su compromiso y acertada asesoría en la investigación.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por sus acertadas observaciones y sugerencias en la investigación.

Al Dr. Irán Alia Tejacal por su asesoría y disponibilidad en la investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por las facilidades brindadas para la realización de las pruebas moleculares.

Al Dr. Moisés Camacho Tapia, por su disponibilidad en la investigación y asesoría en los análisis serológicos y moleculares.

Al M.C. Juventino Cuevas Ojeda, por la disponibilidad mostrada en el apoyo de la investigación.

Al Ing. Cecilio Bautista Bañuelos, por su asesoría en los ensayos enzimáticos.

Al C. Mario Salazar, por su apoyo incondicional y facilidades brindadas para realizar el estudio biológico del virus.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Omar Jacobo Villegas
Fecha de nacimiento	24 de marzo de 1987
Lugar de nacimiento	Cuicatlán, Oaxaca
No. Cartilla militar	D-1505858
CURP	JAVO870324HOCCLM06
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola.
Cédula profesional:	6968603

Desarrollo académico

Bachillerato	2003-2006. Preparatoria Agrícola Chapingo. UACH. Texcoco, México.
Licenciatura	2006-2010. Licenciatura. Ingeniero Agrónomo especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Maestría	2012-2015. Maestría en ciencias, Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México.

RESUMEN GENERAL

Identificación del Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima* y su relación con fenoles y algunas enzimas antioxidantes

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) es la principal planta ornamental de maceta comercializada en el mundo, no obstante, una de las limitantes en la producción del cultivo es la infección por el Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP), el cual ocasiona mosaicos y deformaciones foliares, demeritando el valor comercial de la planta. En México el estudio de la interacción nochebuena-VMP es reciente, se desconocen las variedades comerciales que pudieran estar infectadas con el virus, y no se han evaluado las respuestas de defensa que expresa la planta en presencia del patógeno. Contar con estos estudios permitirá su incorporación en programas de mejoramiento genético, para generar variedades resistentes al virus. Los objetivos de esta investigación fueron: identificar la presencia del Virus Mosaico de la Poinsettia en 20 variedades comerciales de nochebuena; y, cuantificar algunas respuestas de defensa de tres variedades comerciales de nochebuena infectadas con el VMP. La identificación del virus se realizó con pruebas serológicas y moleculares. Se identificó al VMP mediante DAS-ELISA en las 20 variedades analizadas, en 13 de ellas se corroboró la presencia del virus por RT-PCR, las secuencias de ADN obtenidas de los amplicones tuvieron porcentajes de similitud del 95-98 % con las registradas en el GenBank. Se determinó el contenido de proteínas solubles totales, fenoles totales, actividad de las enzimas peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio-liasa (PAL), y se estimaron las correlaciones de estos metabolitos en las variedades 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Prestige Red'. Se detectó al VMP en el 100 % de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas, aunque solo el 35 % de la población muestreada mostró síntomas característicos de la infección viral. En las tres variedades hubo correlación positiva significativa entre CAT/proteínas solubles totales y POX/PAL. En 'Primero Red Glitter' hubo correlación positiva significativa entre PAL/fenoles totales. Se concluye que el 100 % de las variedades comerciales de nochebuena fueron positivas al VMP mediante DAS-ELISA. En la variedad 'Red Prestige' se registró el mayor contenido de proteínas solubles totales, fenoles y actividad de peroxidasa, mientras que en 'Primero Red Glitter' se presentó la mayor actividad de catalasa y fenilalanina amonio-liasa.

Palabras clave: PnMV, proteínas solubles, POX, CAT, PAL.

GENERAL ABSTRACT

Identification of the *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima* and its relationship with phenols and some antioxidant enzymes

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) is the main ornamental pot plant commercialized in the world, however, one of the limitations in the production of the crop is infection by the *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), which causes mosaics and foliar deformations, demeriting the commercial value of the plant. In Mexico, the study of the poinsettia-PnMV interaction is recent, the commercial varieties that could be infected with the virus are unknown, and the defense responses expressed by the plant in the presence of the pathogen have not been evaluated. These studies will support the genetic improvement programs, to generate varieties resistant to the virus. The objectives of this investigation were identifying the presence of the *Poinsettia mosaic virus* in 20 commercial varieties of poinsettia as well as to quantify some defense responses of three commercial varieties of poinsettia infected with PnMV. Virus identification was possible with serological and molecular tests. The PnMV was identified by DAS-ELISA in the 20 varieties analyzed. In 13 of them the presence of the virus was corroborated by RT-PCR. The DNA sequences obtained from the amplicons showed 95-98% similarity with those registered in GenBank. Total soluble protein content, total phenols, peroxidase (POX), catalase (CAT) and phenylalanine ammonium lyase (PAL) activity were determined, and the correlations of these metabolites in the varieties 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' and 'Prestige Red' were estimated. VMP was detected in 100% of the commercial varieties of poinsettia tested, although only 35% of the sampled population showed characteristic symptoms of viral infection. In all three varieties there was a significant positive correlation between CAT/total soluble proteins and POX/PAL. In 'Primero Red Glitter' there was a significant positive correlation between PAL/total phenols. It is concluded that 100% of the commercial varieties of poinsettia were positive for VMP by DAS-ELISA. In the variety 'Red Prestige' the highest content of total soluble proteins, phenols and peroxidase activity was registered, while in 'Primero Red Glitter' the highest activity of catalase and phenylalanine ammonium-lyase was registered.

Key words: PnMV, soluble proteins, POX, CAT, PAL.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Omar Jacobo Villegas.

Advisor: María Teresa Colinas León. Ph.D.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) es una planta que pertenece a la familia Euphorbiaceae (Martínez *et al.*, 2002). Es originaria de México, donde se puede encontrar en su estado silvestre, como plantas de traspatio y variedades comerciales (Galindo-García *et al.*, 2019; Trejo *et al.*, 2012; Trejo *et al.*, 2018). Esta planta es la ornamental de maceta más comercializada en el mundo, principalmente en la época decembrina, apreciada por el color, tamaño y forma de sus brácteas (Canul *et al.*, 2010).

El cultivo de nochebuena se encuentra amenazado por la infección recurrente del Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP). Las variedades comerciales de nochebuena infectadas con este virus presentan síntomas de mosaico, deformación foliar y alteraciones en la pigmentación de las brácteas, lo cual pone en riesgo la producción y demerita el valor comercial de la planta (Bertaccini *et al.*, 1996; Brunt *et al.*, 1996a; Fulton & Fulton, 1980). El VMP se encuentra diseminado mundialmente. En México este virus infecta a las variedades 'Freedom' y 'Red Prestige', no obstante, se desconoce la presencia del patógeno en otras variedades que se comercializan en el país (Jacobo *et al.*, 2015; Lebas *et al.*, 2007; Okano *et al.*, 2010).

En presencia de patógenos como son los virus, las plantas tienen la capacidad de activar mecanismos de defensa. Estos mecanismos incluyen la síntesis de proteínas, compuestos fenólicos e incremento en la actividad enzimática de defensa (Díaz, 2016; Herrera *et al.*, 2018; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006; Ojito-Ramos y Portal, 2010).

En la infección, las plantas sintetizan proteínas como quitinasas y glucanasas que son tóxicas a los patógenos, y glicoproteínas que fortalecen la pared celular (Ebrahim *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014). La concentración de compuestos fenólicos se incrementa llegando a niveles tóxicos para el patógeno y son responsables de la inhibición de las infecciones en variedades resistentes (Agrios, 2005; Bidwell, 1995). Asimismo, se incrementa la actividad de las

enzimas peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio-liasa (PAL). La POX aumenta la polimerización de los fenoles en lignina, la cual se deposita en las paredes celulares, interfiriendo con el crecimiento y desarrollo de patógenos. La CAT cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, participa en la síntesis de glicina y regula el contenido de ácido indolacético. La PAL es precursora de la biosíntesis de compuestos fenólicos como fitoalexinas, ligninas, cumarinas, flavonas y antocianinas (Agrios, 2005; Ardila *et al.*, 2007; Bidwell, 1995; Peteira y León, 2011; Robledo-Esqueda *et al.*, 2012).

Dilucidar los mecanismos de defensa de las plantas ha contribuido en el mejoramiento genético de los cultivos, para la creación de variedades resistentes (Peteira y León, 2011). En nochebuena se desconocen las respuestas de defensa ante la infección del VMP. Contar con esta información permitirá su incorporación en programas de mejoramiento genético de nochebuena, y generar variedades resistentes al VMP.

Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: capítulo 1: Identificar la presencia del Virus Mosaico de la Poinsettia en 20 variedades comerciales de nochebuena, mediante pruebas serológicas (DAS-ELISA), moleculares (RT-PCR) e inoculación de plantas diferenciales; capítulo 2: Cuantificar algunas respuestas de defensa de tres variedades comerciales de nochebuena infectadas con el VMP, mediante el análisis del contenido de proteínas solubles totales, fenoles y actividad enzimática con la correlación respectiva.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de nochebuena

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) pertenece a la familia Euphorbiaceae, se caracteriza por la presencia de látex en hojas y tallos (Martínez *et al.*, 2002). Las poblaciones silvestres de nochebuena se encuentran distribuidas en las costas del océano Pacífico, desde el estado de Sinaloa en México hasta Guatemala, y en el norte del estado de Guerrero y Morelos (Trejo *et al.*, 2012).

La nochebuena de traspatio o nochebuena de sol se encuentra distribuida ampliamente en el territorio mexicano, tiene uso ornamental en la jardinería, se cultiva de manera convencional en viveros a campo abierto en el estado de Morelos, México y se comercializa en la época decembrina. La nochebuena de traspatio comparte la misma variante genética que las poblaciones silvestres y presentan una diversidad genética más alta que las variedades comerciales de nochebuena (Galindo-García *et al.*, 2015; Galindo-García *et al.*, 2019; Trejo *et al.*, 2018).

Las variedades comerciales de nochebuena se cultivan en diversas partes del mundo, son producto del mejoramiento genético de las plantas silvestres de nochebuena del norte del estado de Guerrero, las cuales han sido mejoradas principalmente en Estados Unidos de América. Actualmente en México se están generando variedades comerciales a partir de materiales silvestres (Canul-Ku *et al.*, 2018; Taylor *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2012).

La nochebuena como planta ornamental de maceta es apreciada por el color, forma y tamaño de sus brácteas. Las variedades más comercializadas son las de color rojo, otras presentan tonalidades de color rosa, amarillo, blanco, morado, salmón y variegados (Canul *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2011). Las variedades comerciales de nochebuena se cultivan en macetas de diferente tamaño y presentación. Las plantas se propagan de forma vegetativa a través de esquejes

(obtenidos de planta madre) lo que ha propiciado la diseminación de patógenos (Cabrera *et al.*, 2006; Canul *et al.*, 2014).

2.1.1 Valor histórico y cultural

La planta de nochebuena fue cultivada por los aztecas, quienes la denominaban Cuetlaxóchitl “flor que se marchita” y era considerada símbolo de pureza. La nochebuena fue utilizada para teñir telas y cuero, y el látex de la planta era empleado en la medicina tradicional para curar afecciones de la piel. A la llegada de los españoles a México, los misioneros franciscanos utilizaron esta planta para decorar las ceremonias religiosas durante la temporada navideña. En 1825, Robert Poinsett embajador de los Estados Unidos de América en México, recolectó material vegetal de nochebuena en Taxco, Guerrero, y lo llevó a su país, donde dio inicio el mejoramiento genético de la planta. Actualmente la nochebuena está presente en todo el mundo, y es reconocida por ser el símbolo floral de la navidad (Rodríguez, 2010; Taylor *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2015).

2.1.2 Importancia económica

La nochebuena es la planta ornamental de maceta con mayor valor económico en el mundo (Trejo *et al.*, 2012). La producción mundial del cultivo es de 500 millones de plantas en maceta anualmente. De las cuales México comercializa 30 millones de plantas y ocupa el cuarto lugar como productor de esta ornamental (García *et al.*, 2019).

En México la producción de nochebuena se ha incrementado considerablemente en los últimos 10 años. En 2008 se destinó una superficie de 218 ha para el cultivo de nochebuena, con un valor de producción de 291 millones de pesos, los estados productores fueron Ciudad de México, Morelos, Puebla, Michoacán y Estado de México. En el 2018 se destinaron 275 ha para este cultivo, con un valor de producción de más de 718 millones de pesos, en este año se sumaron a la producción los estados de Jalisco y Oaxaca. El valor de la producción y la

superficie destinada al cultivo de nochebuena se incrementaron 146 y 26 %, respectivamente, del 2008 al 2018 en el país (SADER, 2019).

2.2 Virus reportados en nochebuena

La nochebuena es una planta susceptible a la infección por patógenos de origen viral, la presencia de virus en esta especie se ha reportado en plantas silvestres, de traspatio y variedades comerciales. Los virus que infectan a las plantas silvestres y de traspatio son: Virus Mosaico del Tabaco (VMT), Virus Mosaico de las Cucurbitáceas (VMC) y Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP) (Ocampo *et al.*, 2013). Las variedades comerciales son hospedantes del Virus Latente de las Poinsettias (VLP) (aus dem Siepen *et al.*, 2005; Koenig & Leseman 1980), Virus del Enrollamiento de las Hojas de las Euforbias (VEHE) (Ma *et al.*, 2004), VMT y VMP (García *et al.*, 2009; Lebas *et al.*, 2007).

2.3 Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP)

2.3.1 Miembro putativo del género Tymovirus

El VMP se agrupa dentro del género Tymovirus con base en su morfología y propiedades virales (Fulton & Fulton 1980). Sin embargo, la secuencia y organización del genoma viral presenta una relación más estrecha con el género Marafivirus. No obstante, es considerado un posible miembro del género Tymovirus (Bradel *et al.*, 2000).

2.3.2 Sintomatología

El VMP es considerado el principal patógeno viral en la nochebuena por los daños y pérdidas económicas que ocasiona en el cultivo (Bertaccini *et al.*, 1996). Los síntomas ocasionados por este virus son mosaico, moteado y deformación foliar principalmente (Carballo *et al.*, 2001; Fulton & Fulton, 1980), otros síntomas asociados a la infección son clorosis, variegado, amarillamiento de nervaduras, retraso en el crecimiento y deformación de flores y brácteas (Bertaccini *et al.*, 1996; Chung *et al.* 2004; Ocampo *et al.*, 2013).

La manifestación de síntomas en plantas de nochebuena infectadas con el VMP está en función de las condiciones de temperatura y fotoperiodo a que sea sometido el cultivo. Las plantas infectadas también pueden comportarse como asintomáticas (Bradel *et al.*, 2000; Fulton & Fulton, 1980; Lebas *et al.*, 2007; Koenig & Leseman, 1980). En infecciones severas el patógeno interfiere en la diferenciación de las brácteas, las cuales no pigmentan en su totalidad y no exhiben el color esperado (Clarke *et al.*, 2008; Guy, 1985). La nochebuena es apreciada por el color y forma de las brácteas, particulares de cada variedad (Canul *et al.*, 2010), de tal forma que la presencia del virus puede demeritar su valor económico.

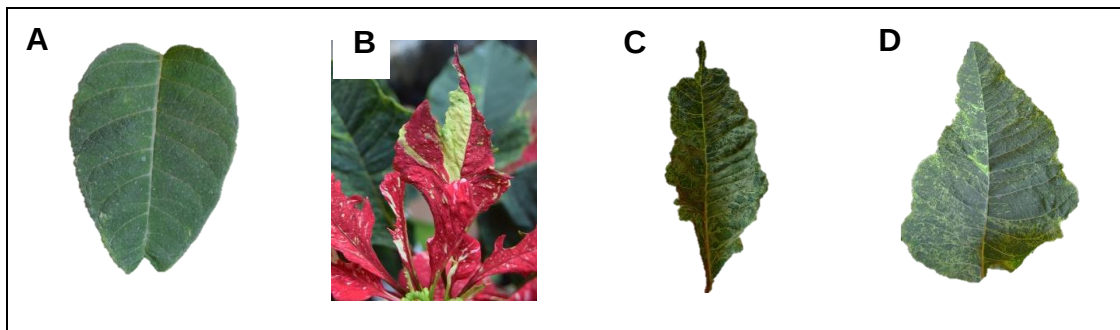


Figura 1. Síntomas ocasionados por el VMP en nochebuena. (A) mosaico; (B) deformación de brácteas; (C y D): mosaico clorótico y deformación foliar.

2.3.3 Dispersión

El VMP infecta variedades de nochebuena cultivadas en Estados Unidos de América (Fulton & Fulton 1980), Koenig and Leseman (1980) identificaron al virus infectado variedades comerciales de nochebuena en Alemania. Adicionalmente, Chiko (1983) reportó la presencia del patógeno en Canadá, analizó 65 muestras, de las cuales el 94% fueron positivas al virus, sugiere que el virus puede estar ampliamente distribuido en este país. La presencia del virus en Australia fue reportada por Guy (1985), Bertaccini *et al.* (1996) determinaron la presencia del VMP y fitoplasmas coinfectando variedades de nochebuena en Italia.

Carballo *et al.* (2001) detectaron al VMP en diferentes variedades de nochebuena en Miranda, Venezuela. Chung *et al.* (2004) identificaron por RT-PCR al VMP en variedades de nochebuena en Korea. Lebas *et al.* (2007) detectaron al VMP en

materiales importados en Nueva Zelanda. Clarke *et al.* (2008) realizaron mejoramiento genético en la variedad 'Millenium', hospedante del virus en Noruega. Okano *et al.* (2010) determinaron la secuencia del VMP en variedades de nochebuena en Japón.

Ocampo *et al.* (2013) reportaron al VMP infectando plantas de nochebuena silvestre y de traspatio en México, adicionalmente Jacobo *et al.* (2015) identificaron al virus en este país en las variedades de nochebuena 'Freedom' y 'Red Prestige'.

2.3.4 Transmisión

El VMP se transmite a través de material vegetativo. Las variedades de nochebuena se propagan por esquejes, de tal forma que las plantas obtenidas de material infectado (plantas madre) seguirán propagando el patógeno (Carballo *et al.*, 2001). En el estudio biológico del virus, éste se transmite mecánicamente en plantas de nochebuena y especies diferenciales. El VMP se inactiva a temperaturas entre 60 y 65 °C (Fulton & Fulton 1980).

2.3.5 Daño celular

En plantas infectadas con el VMP los cloroplastos de las células son redondos, agrupados y conspicuamente vacuolados, se presenta una alta concentración de partículas virales en el citoplasma de las células del parénquima, y en los núcleos celulares se observan inclusiones virales paracristalinas (Guy, 1985). De acuerdo con Leseman *et al.* (1983) y Carballo *et al.* (2001) las partículas virales también se alojan las vacuolas de las células.

2.3.6 Estudio biológico

Una especie diferencial confiable en el estudio biológico del VMP es *Nicotiana benthamiana*, esta especie es adecuada para propagar el patógeno al no ser susceptible a la infección por el Virus Latente de la Poinsettia (VLP) que también

infecta a la nochebuena (Leseman *et al.* 1983). Carballo *et al.* (2001) emplearon plantas de *N. benthamiana* para purificar y caracterizar al VMP.

2.4 Otros virus que atacan al género Euphorbia

2.4.1 Virus del Enrollamiento de las Hojas de las Euforbias (VEHE)

Miembro del género Begomovirus

El VEHE es un begomovirus monopartito, las partículas virales miden 16-18 x 30-32 nm. Este virus de ADN contiene 2,746 nucleótidos (Tsai *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010).

Sintomatología

El VEHE ocasiona síntomas de enrollamiento de las hojas, engrosamiento y endurecimiento de nervaduras, torcedura del peciolo y retraso en el crecimiento en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima* (Ma *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010).

Dispersión

El VEHE infecta variedades comerciales de *E. pulcherrima* cultivadas en China. Fue detectado por primera vez en Tianyang, provincia de Guangxi, China (Ma *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010).

Transmisión

El VEHE se transmite por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) a variedades comerciales de *E. pulcherrima* (Ma *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010).

Estudio biológico

EL VEHE se transmite a través de moscas blancas a plantas de *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *Solanum lycopersicum*, *Datura stramonium* y *Petunia hybrida*. Con esta última especie se han infectado plantas sanas de *E. pulcherrima*, a través de moscas blancas, para estudios del virus (Ma *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010).

2.4.2 Virus Latente de la Poinsettia (VLP)

Miembro putativo del género Polemovirus

El VLP forma icosaedros estables de 34 nm de diámetro, es un virus híbrido de 4652 bases, de ARN de cadena sencilla, muestra una relación estrecha con los Polerovirus en sus primeros tres cuartos de su genoma, pero en el último cuarto con los Sobemovirus. Las similitudes de las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos en el extremo 5' y 3' de su ARN sugieren un modo de replicación como el de los Polerovirus, mientras que las secuencias de las proteínas de la cubierta están estrechamente relacionadas con la de los Sobemovirus (aus dem Siepen *et al.*, 2005).

Sintomatología

El VLP es un virus asintomático en variedades de *Euphorbia pulcherrima* (aus dem Siepen *et al.*, 2005).

Dispersión

El VLP se propaga en todo el mundo en plantas comerciales de *Euphorbia pulcherrima*. Se ha reportado la presencia del VLP, VMP y fitoplasmas coinfectando plantas de las variedades 'Angelika', 'Preduza' y 'Brillant' en Alemania (aus dem Siepen *et al.*, 2005; Preil *et al.*, 1982). Bertaccini *et al.* (1996) mencionan que el VLP está presente en Italia y se encuentra asociado al VMP.

Transmisión

El VLP puede transmitirse de forma vegetativa y por semilla (aus dem Siepen *et al.*, 2005; Koenig & Lesemann, 1980).

2.4.3 Virus Mosaico de las Cucurbitáceas (VMC)

Género Cucumovirus

El VMC es la especie tipo del género Cucumovirus en la familia Bromoviridae. Este virus se compone de tres partículas isométricas, cada una de

aproximadamente 28 nm de diámetro. El genoma del VMC consta de tres moléculas de ARN monocatenario (Zitter & Murphy, 2009).

Sintomatología

El VMC ocasiona infección sistémica, los síntomas varían de acuerdo con el hospedante y la edad de la planta en que se produce la infección. En cucurbitáceas se presentan síntomas de mosaico, epinastia y deformación de hojas y frutos. En cultivos como la alfalfa la infección puede ser asintomática (Zitter & Murphy, 2009; Brunt *et al.*, 1996b). En *E. pulcherrima* silvestre y de traspatio la coinfección del VMC, VMT y VMP inducen mosaicos, manchas cloróticas, variegado y deformación foliar (Ocampo *et al.*, 2013).

Dispersión

El VMC se encuentra distribuido mundialmente, infecta 1,200 especies en más de 100 familias de plantas (Zitter & Murphy, 2009).

Transmisión

El VMC puede transmitirse por semilla en 20 especies de plantas, no se ha determinado su presencia en semillas de *E. pulcherrima*. Este virus puede ser transmitido por más de 80 especies de pulgones (Hemiptera: Aphidoidea) de manera no persistente, también se transmite de forma mecánica (Zitter & Murphy, 2009; Brunt *et al.*, 1996b).

Estudio biológico

El CMV puede transmitirse a plantas de *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* (produce lesiones locales cloróticas), *Cucumis sativus* (mosaico sistémico), *Vigna unguiculata* (lesiones locales necróticas), *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* (los síntomas dependen de la cepa del virus) (Brunt *et al.*, 1996b).

2.4.4 Virus Mosaico del Tabaco (VMT)

Género Tobamovirus

El VMT es el miembro tipo del género Tobamovirus. Las partículas presentan forma de varilla rígida y miden aproximadamente 300 nm x 15 nm. Una partícula del VMT está compuesta por 2,130 copias de la proteína de recubrimiento que envuelve a la molécula de ARN de aproximadamente 6,400 nucleótidos. Este ARN monocatenario codifica cuatro genes: dos proteínas asociadas a replicasa, la proteína de movimiento y una proteína de cubierta (Agrios, 2005; Scholthof, 2000; Brunt *et al.*, 1996c).

Sintomatología

Los síntomas inducidos por el VMT dependen del hospedante, edad de la planta, condiciones ambientales y cepa del virus. Se pueden presentar mosaicos, moteados, necrosis, retraso del crecimiento, deformaciones en hojas y amarillamientos (Scholthof, 2000). En *E. pulcherrima* silvestre y de traspatio, el VMT en coinfección con el VMP y Virus Mosaico de las Cucurbitáceas (VMC) ocasiona síntomas de mosaico, manchas cloróticas, variegado y deformación foliar (Ocampo *et al.*, 2013). En variedades comerciales de *E. pulcherrima* el VMT ocasiona clorosis y amarillamiento en hojas (García *et al.*, 2009).

Dispersión

El VMT es un virus distribuido en todo el mundo, este virus infecta de manera natural plantas de diferentes familias como Chenopodiaceae, Compositas, Cucurbitaceae, Leguminosae, Papaveraceae y Solanaceae (Brunt *et al.*, 1996c). En México se reportó la presencia del VMT infectando plantas silvestres, de traspatio y variedades comerciales de *E. pulcherrima* (García *et al.*, 2009; Ocampo *et al.*, 2013).

Transmisión

El VMT se transmite de forma mecánica, por injerto, por contacto entre plantas, debido a que este virus es muy estable también se puede transmitir a través de herramientas contaminadas. Este virus puede permanecer sobre la cubierta de

las semillas y las plantas que germinan a partir de estas pueden infectarse. El VMT no se transmite a través del embrión de la semilla, tampoco se transmite por polen (Scholthof, 2000; Brunt *et al.*, 1996c).

Estudio biológico

El VMT se puede transmitir a diferentes especies diferenciales, las más empleadas en el estudio biológico del virus son: *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv, Samsun y *N. tabacum* cv.Xanthii (Brunt *et al.*, 1996c).

2.5 Respuestas de defensa en plantas

En la naturaleza las plantas están sometidas a estrés biótico y abiótico, que generan condiciones desfavorables para su desarrollo. Estas condiciones alteran el metabolismo de las plantas, desencadenando diversas respuestas bioquímicas de defensa que les permiten crecer, reproducirse y defenderse de plagas y enfermedades (Ajithkumar & Panneerselvam, 2014; Vivanco *et al.*, 2005).

En presencia de patógenos como los virus, las plantas tienen la capacidad de activar mecanismos de defensa, entre los que se encuentran la síntesis de proteínas, compuestos fenólicos y activación de enzimas de defensa (Díaz, García, 2016; Herrera *et al.*, 2018; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006; Ojito-Ramos y Portal, 2010). Las enzimas que se asocian a defensas de la planta son peroxidasas, catalasas, fenilalanina amonio-liasa, entre otras. Las variedades resistentes a patógenos presentan una mayor síntesis de proteínas, concentración de fenoles y actividad enzimática en comparación con variedades susceptibles. El éxito en el control del patógeno radica en la activación oportuna de las respuestas de defensa al inicio de la infección y el mantenimiento de éstas durante el desarrollo de la enfermedad. Cada mecanismo involucrado en la defensa de la planta presenta un efecto particular sobre el patógeno, de manera directa o indirecta (Agrios, 2005; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2010; Peteira y León, 2011).

2.5.1 Proteínas

Las plantas resistentes a enfermedades tienen la capacidad de activar genes de respuesta de defensa para controlar la infección. Estos genes codifican la producción de diversas proteínas tóxicas para los patógenos como quitinasas, glucanasas, proteínas activas de lisozima o proteínas que fortalecen la pared celular como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. Estas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) también pueden ser enzimas en vías biosintéticas para la lignificación de las paredes celulares o la producción de fitoalexinas (Ebrahim *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014).

Uno de los mecanismos de defensa en las plantas para reconocer y restringir el movimiento de los virus son las denominadas proteínas R, estas proteínas específicas reconocen componentes virales de cualquier supresor y lo silencian. Además, las proteínas R son capaces de reconocer otras proteínas que se acumulan en la planta como resultado de la replicación viral. Estas proteínas de resistencia se expresan de manera constitutiva en las células (Ojito-Ramos y Portal, 2010).

2.5.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos denominados simples o “comunes” se derivan de los intermediarios en las transformaciones que llevan el ácido shikímico, de la fenilalanina o tirosina. Estos compuestos se encuentran en plantas sanas y enfermas, sin embargo, en plantas enfermas se presentan en mayor concentración llegando a niveles tóxicos para el patógeno y son responsables de la inhibición de las infecciones en variedades resistentes. Los compuestos fenólicos simples incluyen al ácido clorogénico, cafeico, cinámico, cumárico, ferúlico, protocatecuico, quínico y escopoletina. Algunos de los cuales presentan propiedades antifúngicas y antibacterianas (Agrios, 2005; Bidwell, 1995).

Otro tipo de compuestos fenólicos son las fitoalexinas, las cuales son compuestos químicos sintetizados por las plantas como respuesta a la presencia de patógenos (hongos, virus, bacterias y nemátodos), daño químico o mecánico.

La resistencia a patógenos se presenta cuando una o más fitoalexinas presentan concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo del patógeno (Agrios, 2005; Vivanco *et al.*, 2005).

La concentración de compuestos fenólicos en frutos de chile Mirasol (*Capsicum annuum*) se incrementa como consecuencia de la infección por Begomovirus. Los frutos procedentes de plantas enfermas presentan mayor concentración de fenoles totales, taninos y antocianinas en comparación con los frutos de plantas sanas (Herrera *et al.*, 2018).

2.5.3 Peroxidasa (EC 1.11.1.7, POX)

La enzima peroxidasa es responsable de la oxidación de compuestos fenólicos hasta quinonas, las cuales presentan una mayor toxicidad a los microorganismos en comparación con los compuestos fenólicos originales. Esta enzima aumenta la polimerización de los fenoles en lignina, la cual se deposita en las paredes celulares, interfiriendo con el crecimiento y desarrollo del patógeno. En plantas enfermas y genotipos resistentes se presenta un incremento en la actividad de esta enzima antioxidante (Agrios, 2005; Peteira y León, 2011; Robledo-Esqueda *et al.*, 2012). En condiciones de estrés biótico y abiótico se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son tóxicas a las plantas y las peroxidasas son las encargadas de eliminar las ROS y reducir daños (Ajithkumar and Panneerselvam, 2014).

La actividad de peroxidasa, polifenoloxidasa y fenilalanina amonio-liasa se incrementa en genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes al Virus del Encrespamiento Amarillo de la Hoja del Tomate (TYLCV). La determinación de la actividad de estas enzimas se emplea como marcadores isoenzimáticos, que permiten el estudio bioquímico del efecto de los patógenos sobre el metabolismo de las plantas (Arias *et al.*, 2011; Azofeifa-Delgado, 2006).

2.5.4 Catalasa (EC.1.11.1.6, CAT)

La catalasa es una enzima antioxidante presente en las plantas, que incrementa su actividad en condiciones de estrés, como un mecanismo de defensa para minimizar los daños. En presencia de patógenos se registra una mayor actividad de esta enzima (Ajithkumar and Panneerselvam, 2014; Peteira y León, 2011). Esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. El H_2O_2 se forma durante la oxidación del glicolato producido en la fotosíntesis y es tóxico a la planta por ser un poderoso oxidante. La catalasa participa en la síntesis de glicina y regula el contenido de ácido indolacético en las plantas. La mayor concentración de catalasa se localiza en los peroxisomas de la célula (Bidwell, 1995). La actividad de CAT y enzimas de defensa se incrementan mediante la aplicación de moléculas químicas que promuevan respuestas de defensa en la planta (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016).

2.5.5 Fenilalanina amonio-liasa (EC 4.3.1.5, PAL)

La enzima fenilalanina amonio-liasa cataliza la desaminación de la fenilalanina generando ácido cinámico, el cual es precursor de los compuestos flavonoides. Esta enzima presenta una mayor actividad o nueva síntesis en plantas enfermas. La PAL es precursora de la biosíntesis de compuestos fenólicos como fitoalexinas, ligninas, cumarinas, flavonas y antocianinas. La actividad de la PAL se puede inducir por la presencia de elicitores en los patógenos, que al ser reconocidos por la planta se activan mecanismos de defensa, presentándose una mayor concentración de esta enzima (Agrios, 2005; Ardila *et al.*, 2007; Bidwell, 1995). Los compuestos fenólicos que se forman a partir de la actividad de la PAL incluyen compuestos bactericidas y precursores de lignina para reparar heridas en la planta (Bidwell, 1995).

En papa (*Solanum tuberosum*), en la interacción de la infección mixta tizón tardío (*Phytophthora infestans*)-Virus X de la Papa (PVX), sobre la actividad enzimática en variedades susceptibles y resistentes al tizón tardío, se observó que la actividad de la POX y de la PAL en plantas resistentes, sin fungicidas y con virus, mostraron una mayor correlación con los mecanismos de defensa, y se presentó

mayor actividad metabólica y resistencia temporal temprana en presencia del virus, independientemente de la resistencia genética del hospedante (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2006).

En plantas de tomate infectadas con el Geminivirus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) o el Tobamovirus Mosaico del Tabaco (TMV), se observó mayor síntesis y actividad de enzimas y metabolitos en comparación con plantas sanas. El TMV fue el mayor inductor para PAL y superóxido dismutasa (SOD), mientras que el TYLCV indujo mayor actividad de fenoles, POX y proteínas totales (PRO). Los genotipos resistentes mostraron mayor síntesis y actividad de los metabolitos, los cuales actuaron con mayor rapidez, en comparación con los genotipos susceptibles a los virus (Díaz, 2016).

La resistencia de las plantas a un patógeno dependerá de la velocidad y el grado de síntesis de una o varias enzimas que inducen los patógenos sobre las plantas (Agrios, 2005).

2.6 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- Ajithkumar, I. P., & Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* Roth. Under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 587-595, doi: 10.1007/s12013-013-9746-x.
- Ardila, H., Baquero, B., & Martínez, S. (2007). Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. *Revista Colombiana de Química*, 36 (2): 151-167.
- Arias, Y., González, I., Pino, O., Sánchez, Y., Miranda, I., Martínez, Y., & Peteira, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis genotipos promisorios de tomate obtenidos en programas de mejoramiento genético para la resistencia al TYLCV. *Revista Protección Vegetal*, 26 (1): 40-44.
- 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, doi: 10.1016/j.virol.2005.03.020
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17 (2): 221-242.
- Bertaccini, A., Vibio, M., & Bellardi, M. G. (1996). Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 35 (2), 129-132.
- Bidwell, R. G. S. (1995). Fisiología vegetal. AGT Editor, S. A. México. 805 p.
- Bradel, B. G., Preil, W., & Jeske, H. (2000). Sequence analysis and genome organisation of *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) reveal closer relationship to marafiviruses than to tymoviruses. *Virology*, 571 (12), 289-297, doi: 10.1006/viro.2000.0335
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996a). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Poinsettia mosaic tymovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr633.htm> (consulta, mayo 2020).
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996b). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Cucumber mosaic cucumovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr267.htm> (consulta, julio 2020).
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996c). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Tobacco mosaic tobamovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr803.htm> (consulta, julio 2020).

- Cabrera, R. J., Morán, M. F., Torres, Q. R., Pellón, B. A., & Granada, C. L. (2006). Producción de Nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. en Morelos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico No. 23. Zacatepec, Mor., México. 20 p.
- Canul, K. J., García, P. F., Barrios, G. E. J., Osuna, C. F. J., Ramírez, R. S., Alia, T. I., & Montoya, C. R. E. (2014). Caracterización morfológica de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2 (2), 16-23.
- Canul, K. J., García, P. F., Osuna, C. F. J., & Ramírez, R. S. (2012). Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico No.64. Zacatepec, Mor., México. 32 p.
- Canul, K. J., García, P. F., Ramírez, R. S., & Osuna, C. F. J. (2010). Programa de mejoramiento genético de nochebuena en Morelos. Campo Experimental Morelos, INIFAP. Folleto Técnico No. 49. Zacatepec, Mor., México. 39 p.
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Barrios-Gómez, E. J., Osuna-Canizalez, F. J., Rangel-Estrada, S. E., & Ramírez-Rojas, S. G. (2018). Rubí, nueva variedad Mexicana de nochebuena para interior. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41 (1), 91-92.
- Carballo, O., Izaguirre, M. L., & Marys, E. (2001). Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting *Poinsettias* (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *The American Phytopathological Society*, 85 (11), 1208, doi: 10.1094/PDIS.2001.85.11.1208D
- Chiko A., W. (1983). *Poinsettia mosaic virus* in British Columbia. *Plant Disease*, 67 (4): 427-428.
- Chung, B. N., Lee, E. K., Jeong, M. I., & Kim, H. R. (2004). First Report on *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 20 (3), 220-223, doi: 10.5423/PPJ.2004.20.3.220
- Clarke J. L., Spetz, C., Haugslien, S., Xing, S., Dees, M. W., Moe, R., & Blystad, D. R. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia mosaic virus*. *Plant Cell Reports*, 27, 1027–1038, doi: 10.17660/ActaHortic.2006.722.40
- Díaz, G. G. (2016). Sobreexpresión de enzimas de defensa en tomate por infección viral. Tesis de Maestría. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México.
- Ebrahim, S., Kalidindi, U., and Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2: 1043-1054.

- Flores-Torres, L. M., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., López-Arroyo, J. I., Olalde-Portugal, V., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., & Zamora-Villa, V. M. (2017). Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35: 314-325, doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1608-2
- Fulton, R. W., & Fulton, J. L. (1980). Characterization of a Tymo-like Common in Poinsettia. *The American Phytopathological Society*, 70 (4), 321-324.
- Galindo-García, D. V., Alia-Tejacal, I., Colinas-León, M. T. B., & Valdez-Aguilar, L. A. (2015). Caracterización agronómica de la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Galindo-García, D. V., Alia-Tejacal, I., Núñez-Colin, C. A., Andrade-Rodríguez, M., Canul-Ku, J., Colinas-León, M. T., & Sainz-Aispuro, M. J. (2019). Genetic diversity of sun poinsettia (*Euphorbia* spp.) in Morelos, Mexico, with RAPD molecular markers. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 25 (2), 113-127, doi: 10.5154/r.rchsh.2018.06.012
- García V. A. G. Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri*. (2014). Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias de la Floricultura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco, México.
- García, P. F., Ramírez, R. S., Osuna, C. F. J., & Ocampo, O. T. (2009). Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. Folleto Técnico No. 39. Zacatepec, Mor., México. 30 p.
- García, P. F., Rangel, E. S. E., Barrios, G. E. J., Ramírez, R. S. G., Portas, F. B., & Canul, K. J. (2019). Leticia: nueva variedad mexicana de nochebuena para interiores. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10 (2), 461-466, doi: 10.29312/remexca.v10i2.1366
- Guy P. (1985). New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *The Australasian Plant Pathology*, 14 (1): 12-13.
- Herrera, M. D., Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Reveles-Torres, L. R., & Salas-Muños, S. (2018). Efecto de fitopatógenos sobre la síntesis de compuestos fenólicos en frutos de chile Mirasol. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 252-257.
- Jacobo, V. O., Valdovinos, P. G., Ramírez, R. S., & Hernández, J. C. (2015). Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (2), 219-231.
- Koenig, R., & Lesemann, D. E. (1980). Two isometric viruses in poinsettias. *Plant Disease*, 64 (8): 782-784.

- Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, J. Z., & Alexander, B. J. R. (2007). Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *American Phytopathological Society*, 91 (1), 110, doi: 10.1094/PD-91-0110A
- Leseman, D. E., Koenig, R., Huth, W., Brunt, A. A., Phillips, S., & Barton, R. J. (1983). *Poinsettia mosaic virus*: A Tymovirus? *Phytopathology*, 107, 250-262.
- Lozoya, S. H., Juárez, C. A., Colinas, L. M. T., & Bamberg, J. (2010). Activación enzimática de especies de *Solanum* contra *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary). *Interciencia*, 35 (8), 586-591.
- Lozoya-Saldaña, H., Almanza-Serrano, M. G., & Colinas-León, M. T. (2006). Infección mixta *Phytophthora infestans*-Virus X de la papa (PVX) y mecanismos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agrociencia*, 40, 753-764.
- Lozoya-Saldaña, H., Rivera-Hinojosa, R., & Colinas-León M. T. (2007). Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia*, 41, 479-489.
- Ma, X. Y., Cai, J. H., Li, G. X., Qin, B. X., & Zhou, X. P. (2004). Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal of Phytopathology*, 152 (4), 215–218, doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00832
- Martínez, G. M., Jiménez, R. J., Cruz, D. R., Juárez, A. E., García, R., Cervantes, A., & Mejía, H.R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México, Serie Botánica*, 73 (2), 155-281.
- Ocampo, O. T., Ochoa, M. D. L., Ramírez, R. S., Valdovinos, P. G., & Nava, D. C. (2013). Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 82, 235-241.
- Ojito-Ramos, K., & Portal, O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Bioteología Vegetal*, 10 (1), 3-19.
- Okano, Y., Maejima, K., Shiraishi, T., Hashimoto, M., Senshu, H., Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Yamaji, Y., & Namba, S. (2010). Genetic heterogeneity found in the replicase gene of *Poinsettia mosaic virus* isolates. *Archives of virology*, 155 (8), 1367-1370, doi: 10.1007/s00705-010-0708-y
- Peteira, B., & León, O. (2011). Interacciones hospedante–patógeno: logros y perspectivas en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 26 (3), 137-143.
- Preil, W., Koenig, R., Engelhardt, M., Meier-Dinkel, A. (1982). Eliminierung von *Poinsettia mosaic virus* (PoiMV) und *Poinsettia cryptic virus* (PoiCV)

aus *Euphorbia pulcherrima* Willd. durch Zellsuspensionskultur
Phytopathology Z, 105, 193-197, doi: 10.1111/j.1439-
0434.1982.tb00678.x

- Robledo-Esqueda, M. N., Lozoya-Saldaña, H., & Colinas-León, M. T. (2012). Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. de Bary por fungicidas. *Interciencia*, 37 (9), 689-695.
- Rodríguez, C. F. Flor de nochebuena. *Claridades Agropecuarias*, 208: 44-46.
- SADER. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, mayo 2020).
- Serrano-Cervantes R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas-León, M. T., & Leyva-Mir, S. G. (2016). Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39 (1): 25 – 31.
- Scholthof, K. B. G. (2000). *Tobacco mosaic virus*. The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/TobaccoMosaic.aspx> (consulta, julio 2020).
- Taylor, J. M., Lopez, R. G., Currey, C. J., & Janick, J. (2011). The Poinsettia: History and Transformation. *Chronica Horticulturae*, 51 (23), 23-28.
- Trejo, E. L., Olson, Z. M. E., & Bye, B. R. A. (2015). Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 478-485, doi: 10.1016/j.rmb.2015.04.033
- Trejo, L., Briones-Dumas, E., Gómez-Bermejo, R., & Olson, M. E. (2018). Molecular evidence for repeated recruitment of wild Christmas poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) into traditional horticulture in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, 481–490, doi: 10.1007/s10722-018-0727-1
- Trejo, L., Ferial, A. T. P., Olsen, K. M., Eguiarte, L. E., Arroyo, B., Gruhn, J. A., & Olson, M. E. (2012). Poinsettia's wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany*, 99, 1146–1157, doi: 10.3732/ajb.1200072
- Tsai, M. C., Liu, C. S., & Su, H. J. (1997). Poinsettia leaf curl, a new disease caused by a Geminivirus. *Journal of Phytopathology*, 145, 347-350.
- Vivanco, J. M., Cosío, E., Loyola-Vargas V. M., & Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 341: 68-75
- Wu, J., Zulfiqar, A., & Huang, C. (2010). Infectivity of *Euphorbia leaf curl virus* and interaction with *Tomato yellow leaf curl* China betasatellite, *Archives of Virology*, doi: 10.1007/s00705-010-0873-z

Zitter, T. A., & Murphy, J. F. (2009). *Cucumber mosaic virus*. The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/Cucumbermosaic.aspx> (consulta, julio 2020).

3. Identificación del Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima*

3.1 Resumen

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) es la principal planta ornamental de maceta comercializada en el mundo, no obstante, una de las limitantes en la producción del cultivo es la infección por el Virus Mosaico de las Poinsettia (VMP), que ocasiona deformaciones en hojas y brácteas, demeritando el valor comercial de la planta. En México el VMP infecta a las variedades 'Freedom' y 'Red Prestige', sin embargo, se desconoce la presencia de este patógeno en otras variedades comercializadas en el país. Conocer el estado fitosanitario del cultivo permitirá implementar un manejo adecuado de la enfermedad viral. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia del VMP en 20 variedades comerciales de nochebuena. Se analizaron variedades de color rojo (8), rosa (8), amarillo (3) y salmón (1). La identificación del virus se realizó con pruebas serológicas y moleculares. Se identificó al VMP mediante DAS-ELISA en las 20 variedades comerciales. En 13 de ellas se corroboró la presencia del virus por RT-PCR, las secuencias de ADN obtenidas de los amplicones tuvieron porcentajes de similitud del 95-98 % con las registradas en el GenBank. Se detectó el Virus Mosaico de la Poinsettia en el 100 % de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas, aunque solo el 35 % de las plantas analizadas mostró síntomas característicos de la infección viral.

Palabras clave: VMP, virus-nochebuena, RT-PCR.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Omar Jacobo Villegas.

Director de tesis: Dra. María Teresa Colinas León.

3.2 Abstract

Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) is the main ornamental pot plant marketed in the world, however, one of the limitations in the production of the crop is infection with the *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), which causes leaf and bract deformation, demeriting the commercial value of the plant. In Mexico, PnMV infects 'Freedom' and 'Red Prestige' varieties, however, the presence of this pathogen in other varieties marketed in the country is unknown. The knowledge of the phytosanitary state of the crop may lead to the implementation of adequate management of the disease. The objective of this research was to identify the presence of PnMV in 20 commercial varieties of poinsettia. Varieties of red (8), pink (8), yellow (3) and salmon (1) colors were analyzed. Virus identification was conducted with serological and molecular tests. PnMV was identified by DAS-ELISA in the 20 commercial varieties. In 13 of them the presence of the virus was corroborated by RT-PCR. The DNA sequences obtained from the amplicons had percentages of similarity of 95-98% with those registered in The GenBank. *Poinsettia mosaic virus* was detected in 100% of the commercial varieties of poinsettia tested, however, only 35% of the analyzed plants showed characteristic symptoms of viral infection.

Key words: PnMV, poinsettia-virus, RT-PCR.

3.3 INTRODUCCIÓN

En México se puede encontrar a la nochebuena en su estado silvestre, variedades de dominio público (plantas de traspatio) y como variedades comerciales (Canul *et al.*, 2012). La nochebuena es la planta ornamental de maceta más vendida en todo el mundo, existen más de 300 variedades mejoradas en esta especie y en México se cultivan 100 aproximadamente, apreciadas por la amplia gama de colores, tamaño y forma de las brácteas (Canul *et al.*, 2010; Trejo *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2015; García *et al.*, 2019). Las variedades con brácteas de color rojo engloban 90% de la demanda del cultivo tanto en el mercado mundial como nacional (Canul *et al.*, 2012).

En el 2018 en Estados Unidos de América el valor de la producción del cultivo de nochebuena fue superior a los 148 millones de dólares (USDA, 2018). En este

mismo año en México se produjeron 19 millones de plantas, con un valor de producción de 718 millones de pesos, los principales estados productores de nochebuena son Morelos, Michoacán, Ciudad de México, Estado de México, Puebla, Jalisco y Oaxaca (SADER, 2019).

La sanidad de la nochebuena se encuentra amenazada por plagas y enfermedades, donde los virus tienen mayor importancia (Bertaccini *et al.*, 1996). Las variedades comerciales de nochebuena son hospedantes del Virus Latente de la Poinsettia (VLP) (Koenig & Leseman 1980; Bertaccini *et al.*, 1996; aus dem Siepen *et al.*, 2005), Virus del Enrollamiento de Hojas de las Euphorbias (VEHE) (Ma *et al.*, 2004), y el Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP), siendo este último el principal patógeno viral del cultivo y el más diseminado, presente en Estados Unidos, Alemania, Canadá, Australia, Venezuela, Corea, Noruega, Nueva Zelanda, Dinamarca, Italia, y Japón (Fulton & Fulton, 1980; Koenig & Leseman, 1980; Chiko, 1983; Guy, 1985; Bech & Rasmussen 1996; Bradel *et al.*, 2000; Carballo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2006; Lebas *et al.*, 2007; Okano *et al.*, 2010).

Las variedades comerciales de nochebuena infectadas con el VMP (Tymovirus) presentan comúnmente síntomas de mosaico y moteado en las hojas, así como deformación foliar incluyendo brácteas (Fulton & Fulton, 1980), otros síntomas asociados a la infección por el virus son amarillamiento de nervaduras, clorosis, manchas blancas y variegados en las hojas, o por el contrario las plantas pueden comportarse asintomáticas (Bertaccini *et al.*, 1996; Lebas *et al.*, 2007; Ocampo, *et al.*, 2013). El VMP interfiere en el proceso de pigmentación de las brácteas de la nochebuena, atractivo principal en esta planta, poniendo en riesgo la producción del cultivo (Brunt *et al.*, 1996; Bertaccini *et al.*, 1996).

En México, de acuerdo con Ocampo *et al.* (2013) el VMP infecta plantas de nochebuena silvestre y variedades de dominio público, adicionalmente Jacobo *et al.* (2015) determinaron la presencia de este patógeno en las variedades comerciales 'Freedom' y 'Red Prestige', sin embargo, se desconoce la presencia del virus en otras variedades que se comercializan en el país.

Por lo anterior mencionado, el objetivo de esta investigación fue identificar el Virus Mosaico de la Poinsettia en 20 variedades comerciales de nochebuena.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Adquisición del material vegetal

En invierno de 2016-2018, se adquirieron plantas asintomáticas y con síntomas putativos a virus de 20 variedades comerciales de nochebuena (100 % pigmentadas), en un vivero ubicado en Texcoco, Estado de México. El material vegetal (esquejes enraizados) cultivado en dicho vivero provenía de las empresas florícolas Floraplan® y Vivero internacional de México®. Las variedades y número de plantas adquiridas en cada año fueron: 2016: 'Silverstar Marble' (3), 'Silverstar Red' (2), 'Sparkling Punch' (1), 'Ice Punch' (3), 'Marblestar' (2), 'Cortez Electric Fire' (1), 'Carousel Dark Red' (1) y 'Primero White' (6); 2017: 'Cortez Red' (2), 'Enduring Marble' (2), 'Freedom Pink' (2), 'Monet Early' (2), 'Polar Bear' (2), 'Premier Pink' (2), 'Viking Cinnamon' (2), 'Winter Rose Early Red' (2) y 'Winter Rose White' (2); 2018: 'Amaris Hot Pink' (11), 'Primero Red Glitter' (6) y 'Orange Spice' (6). Las plantas se establecieron en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, fueron manejadas agronómicamente como lo indica Cabrera *et al.* (2006).

3.4.2 Análisis serológico

Las pruebas serológicas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF). Se realizó el diagnóstico con el método DAS-ELISA utilizando anticuerpos policlonales para la detección del Virus Mosaico de la Poinsettia, adquiridos con la empresa Agdia® (número de catálogo SRA 90700/0500). En cada variedad de nochebuena se realizó el análisis por duplicado, de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Las muestras consistieron en 0.5 g de hojas jóvenes, maceradas individualmente en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido. Las muestras depositadas en

las placas sensibilizadas con el conjugado enzimático se incubaron a 4°C durante 12 h. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' (proporcionada por el Laboratorio de Virología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo) y como control negativo una planta de nochebuena silvestre (recolectada en Tehuilotepic, Guerrero).

Los valores de absorbancia se midieron a 405 nm en un lector de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific® a los 60 min de incubación. De acuerdo con Ruiz *et al.* (2009) se consideraron positivas las muestras con valores mayores a tres veces la media del testigo negativo.

3.4.3 Análisis molecular

Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Virología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH. La extracción del ARN total se realizó con el reactivo PureLink™ Plant RNA Reagent (número de catálogo 12322012) de la empresa ThermoFisher Scientific®. De cada variedad de nochebuena se tomaron muestras de 0.1 g de tejido vegetal en hojas jóvenes, tallos y/o brácteas, se maceraron individualmente con nitrógeno líquido en morteros estériles, cada macerado se depositó en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) adicionando 500 µL de la solución de lisis, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante dos min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se mezclaron con 100 µL de cloruro de sodio 5 M y 300 µL de cloroformo, se centrifugaron durante 10 min y se recuperó la parte superficial, se adicionaron 1.5 volúmenes de isopropanol (en relación al recuperado) y se incubaron a -4 °C durante 12 h, se centrifugaron nuevamente durante 10 min, la limpieza del ARN se realizó con etanol al 70 %, finalmente la pastilla del ARN se diluyó en agua libre de nucleasas (Promega®) y se almacenó a -20 °C.

Se determinó la concentración del ARN total en un espectrofotómetro NanoDrop ThermoFisher Scientific®, y se corroboró su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v (120V/60 min), visualizado en un fotodocumentador Quantum Studio®. Para determinar la viabilidad del ARN se amplificó un

fragmento del gen ribosomal 18S, con los iniciadores 18S-F (5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3') y 18S-R (5'-ACCAGACTTGCCCTCCAATGG-3') de acuerdo con las condiciones de RT-PCR señaladas por Zamboni *et al.* (2008).

Para la detección del Virus Mosaico de la Poinsettia en las variedades de nochebuena, se amplificó un fragmento de la proteína de la cápside del virus, con los iniciadores específicos PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCCGTTCTTCT-3') y PnMV-R (5'-GAGCCGGCGACTCCAT CCA-3') de acuerdo con las condiciones de RT-PCR señaladas por Ocampo *et al.* (2013). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v (120V/60 min). Los iniciadores utilizados en las pruebas moleculares (18S-F, 18S-R, PnMV-F y PnMV-R) se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' y como control negativo una planta de *Nicotiana clevelandii*, en ambos casos se utilizó tejido foliar para el análisis.

Los productos de RT-PCR que amplificaron un fragmento de 700 pb, tamaño esperado de acuerdo con Ocampo *et al.* (2013), se secuenciaron en la empresa Macrogen en Corea. Las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las registradas en el GenBank para el VMP, usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.4.4 Inoculación mecánica del VMP

Se realizó inoculación mecánica del VMP en plantas diferenciales de *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, y *Chenopodium amaranticolor*. El inóculo se obtuvo de las variedades comerciales positivas al VMP analizadas por RT-PCR, exceptuando 'Amaris Hot Pink', por lo que se tuvieron 12 fuentes de inóculo. Se utilizaron dos soluciones amortiguadoras: Amortiguador de Fosfatos + DIECA (ácido dietilditiocarbámico), pH 8.6; y Amortiguador de Fosfatos de Na (mono y dibásico), pH 7.8. Para preparar las soluciones virales se maceraron individualmente hojas jóvenes de cada fuente de inóculo en un mortero estéril y

se adicionó el amortiguador respectivo en relación 1/10 p/v. Se inocularon 24 plantas por especie diferencial: dos plantas por fuente de inóculo (una para cada solución amortiguadora). Se establecieron dos plantas como testigos negativos en cada especie, inoculadas únicamente con cada una de las soluciones amortiguadoras. Utilizando un hisopo estéril embebido con la solución viral o solución amortiguadora (testigos negativos) se frotaron de 4 a 5 hojas jóvenes por planta diferencial, asperjadas previamente con carborundum de 600 mallas.

Los materiales inoculados se establecieron en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la UACH, y se mantuvieron en observación. Posteriormente, a los 60 días después de la inoculación (ddi) todos los materiales se analizaron molecularmente para determinar la transmisión del VMP (de acuerdo con la metodología antes descrita para la extracción de ARN y RT-PCR en las variedades comerciales de nochebuena).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Sintomatología

Las variedades comerciales de nochebuena que se comportaron asintomáticas a la infección viral representaron el 65 % de la población evaluada, las variedades fueron: 'Silverstar Marble', 'Silverstar Red', 'Ice Punch', 'Marblestar', 'Cortez Electric Fire', 'Carousel Dark Red', 'Primero White', 'Freedom Pink', 'Monet Early', 'Premier Pink', 'Viking Cinammon', 'Winter Rose White' y 'Orange Spice'. De acuerdo con Fulton and Fulton (1980), Koenig and Leseman (1980) y Lebas *et al.* (2007) el Virus Mosaico de la Poinsettia en ocasiones no induce síntomas en las plantas infectadas, lo que explicaría la “apariencia sana” en estas variedades. El 35 % de la población de nochebuenas: 'Sparkling Punch', 'Amaris Hot Pink', 'Cortez Red', 'Polar Bear', 'Enduring Marble', 'Primero Red Glitter' y 'Winter Rose Early Red', presentaron síntomas de mosaico, moteado, clorosis y deformación foliar (Figura 1). Carballo *et al.* (2001), Chung *et al.* (2004) y Lebas *et al.* (2007) mencionan que estos síntomas son característicos en variedades de nochebuena infectadas con el VMP. En 'Enduring Marble' adicionalmente se presentó

amarillamiento de nervaduras, Bertaccini *et al.* (1996) asocia este síntoma secundario a la infección por el virus. En 'Primero Red Glitter' las brácteas presentaron deformaciones severas y no pigmentaron en su totalidad, de acuerdo con Brunt *et al.* (1996) estos síntomas se asocian a la infección del VMP.

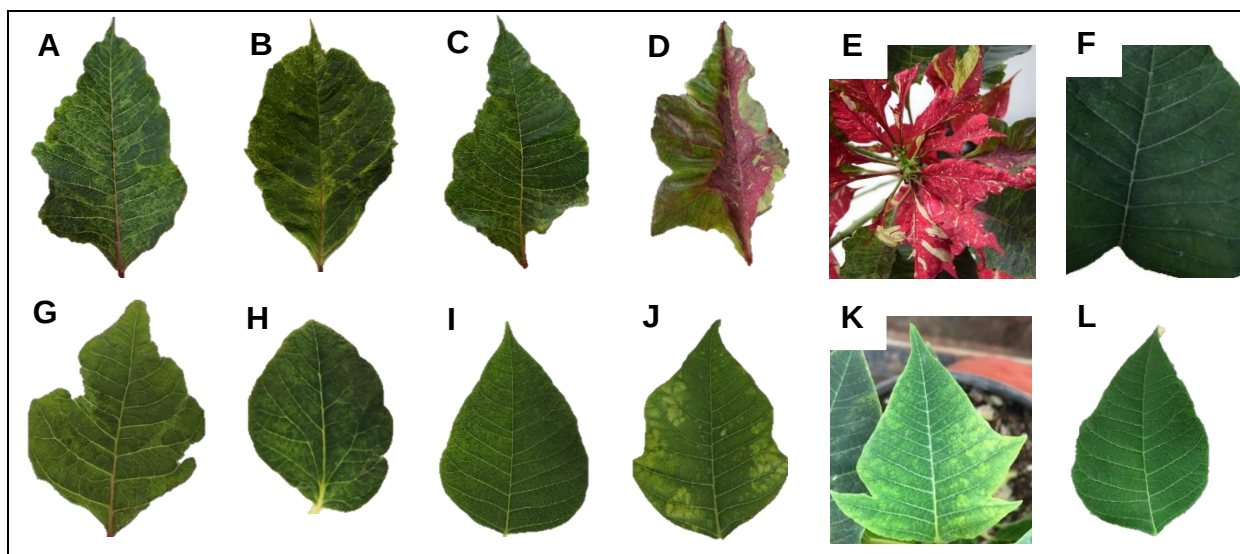


Figura 2. Síntomas putativos a virus en variedades comerciales de nochebuena. (A-E): 'Primero Red Glitter'; (A-C): deformación de la lámina foliar y mosaico clorótico; (D): bráctea deforme (en proceso de diferenciación); (E): conjunto de brácteas con deformación severa; (F): 'Winter Rose Early Red', mosaico; (G): 'Cortez Red', deformación y mosaico; (H): 'Enduring Marble', clorosis y amarillamiento de nervaduras; (I y J): 'Polar Bear'; (I): clorosis; (J): moteado; (K): 'Sparkling Punch', manchas cloróticas; (L): 'Primero White', hoja asintomática.

Se considera que la temperatura y luminosidad son factores determinantes en el comportamiento de la nochebuena como respuesta a la infección viral, Bradel *et al.* (2000) propiciaron la manifestación de síntomas en plantas infectadas con el virus, manteniéndolas a temperaturas de 18 °C en el día y 12 °C en la noche, con un fotoperiodo de 16 h. En la investigación las variedades de nochebuena se mantuvieron a temperaturas de 22 °C en el día y 15 °C en la noche, con un fotoperiodo de 11-12 h, en estas condiciones el 35 % de las variedades presentaron síntomas característicos del VMP. No se descarta la posibilidad de que las variedades comerciales pudieran haber estado infectadas con el Virus Latente de la Poinsettia (VLP), de acuerdo con Koenig and Leseman (1980) este

virus asintomático se ha identificado en conjunto con el VMP infectando variedades de nochebuena.

3.5.2 Análisis serológico y molecular

El análisis serológico (DAS-ELISA) para la detección del VMP en las 20 variedades comerciales de nochebuena se realizó en 3 ensayos. Los valores de absorbancia (lecturas a 405 nm) presentados en todas las variedades comerciales fueron superiores al límite de detección (LD) calculado de acuerdo con Ruiz *et al.* (2009). Se obtuvieron valores en el LD entre 0.408 y 0.450, valores promedios de absorbancia en las variedades entre 0.908 y 1.837 en cada ensayo, respectivamente (Cuadros 1, 2 y 3). 'Monet Early' presentó los valores mayores de absorbancia en el ensayo 3 (Cuadro 3), mientras que 'Sparkling Punch' presentó los valores menores en el ensayo 1 (Cuadro 1). Los resultados indicaron que el 100 % de las plantas estuvieron infectadas.

Cuadro 1. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 1).

Variedad comercial	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Blanco	0.127	0.129	0.128	
Control (-)	0.137	0.134	0.136	
Control (+)	1.002	0.902	0.952	
'Silverstar Marble'	1.018	0.998	1.008	(+)
'Silverstar Red'	0.898	0.968	0.933	(+)
'Sparkling Punch'	0.638	0.644	0.641	(+)
'Ice Punch'	0.920	0.952	0.936	(+)
'Marblestar'	0.953	0.980	0.967	(+)
'Cortez Electric Fire'	0.955	0.954	0.955	(+)
'Carousel Dark Red'	0.931	0.918	0.925	(+)
'Primero White'	0.886	0.920	0.903	(+)
Promedio			0.908	

Límite de detección (LD): $3 (0.136) = 0.408$. Control (+): 'Red Prestige'; Control (-): *E. pulcherrima* silvestre.

Cuadro 2. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 2).

Variedad comercial	No. planta	Repeticiones		Promedio	Resultado
		I	II		
Blanco		0.072	0.080	0.076	
Control (-)		0.174	0.126	0.150	
Control (+)		1.543	1.528	1.535	
'Primero White'	2	1.512	1.618	1.565	(+)
	3	1.471	1.459	1.465	(+)
	4	1.449	1.557	1.503	(+)
	5	1.592	1.702	1.647	(+)
	6	1.418	1.329	1.374	(+)
'Polar Bear'	1	1.443	1.433	1.438	(+)
'Primero Red Glitter'	1	1.197	1.139	1.168	(+)
	2	1.376	1.305	1.341	(+)
	1	1.531	1.512	1.522	(+)
	2	1.141	1.145	1.143	(+)
	3	1.124	1.115	1.119	(+)
'Orange Spice'	4	1.189	1.144	1.166	(+)
	5	1.334	1.331	1.332	(+)
	6	1.534	1.523	1.529	(+)
	2	1.376	1.371	1.373	(+)
	2	1.451	1.575	1.513	(+)
'Silverstar Red'	2	1.277	1.321	1.299	(+)
'Marblestar'	3	0.965	1.112	1.039	(+)
	1	1.186	1.114	1.150	(+)
	2	1.363	1.245	1.304	(+)
'Ice Punch'	1	0.870	0.987	0.928	(+)
'Amaris Hot Pink'	1	1.175	1.167	1.171	(+)
	2	1.272	1.190	1.231	(+)
	3	1.171	1.242	1.207	(+)
'Freedom Pink'	1	1.114	1.228	1.171	(+)
	2	1.191	1.120	1.156	(+)
	1	1.153	1.202	1.178	(+)
'Viking Cinammon'	2	1.201	1.112	1.157	(+)
	1	1.214	1.224	1.219	(+)
	2	1.171	1.131	1.151	(+)
Promedio				1.285	

Límite de detección (LD): $3 (0.150) = 0.450$. Control (+): 'Red Prestige';
Control (-): *E. pulcherrima* silvestre.

Cuadro 3. Valores de absorbancia (405 nm) en las pruebas DAS-ELISA en la detección del VMP en variedades comerciales de nochebuena (Ensayo 3).

Variedad comercial	No. planta	Repeticiones		Promedio	Resultado
		I	II		
Blanco		0.105	0.105	0.105	
Control (-)		0.143	0.149	0.146	
Control (+)		2.467	2.215	2.341	
'Amaris Hot Pink'	3	2.227	2.016	2.122	(+)
	4	2.212	1.895	2.054	(+)
	5	2.024	1.639	1.832	(+)
	6	2.393	2.228	2.311	(+)
	7	2.329	2.035	2.182	(+)
	8	2.169	2.021	2.095	(+)
	9	1.861	1.390	1.626	(+)
	10	1.808	1.900	1.854	(+)
'Primero Red Glitter'	11	1.898	1.447	1.673	(+)
	3	2.413	1.270	1.842	(+)
	4	1.035	1.460	1.248	(+)
	5	1.926	1.655	1.791	(+)
'Freedom Pink'	6	1.464	1.148	1.306	(+)
	2	2.025	1.822	1.924	(+)
'Polar Bear'	2	0.813	0.639	0.726	(+)
'Monet Early'	1	2.396	2.347	2.372	(+)
	2	2.366	2.252	2.309	(+)
'Viking Cinammon'	2	1.862	1.953	1.908	(+)
'Winter Rose Early Red'	1	1.427	1.514	1.471	(+)
'Whinter Rose White'	2	1.715	1.798	1.757	(+)
	1	2.109	2.104	2.107	(+)
	2	1.972	1.867	1.920	(+)
Promedio				1.837	

Límite de detección (LD): $3 (0.146) = 0.438$. Control (+): 'Red Prestige'; Control (-): *E. pulcherrima* silvestre.

La amplificación del fragmento del gen ribosomal 18S con el ARN obtenido en las variedades comerciales fue de 300 pb, tamaño reportado por Zamboni *et al.* (2008), lo que garantizó la viabilidad del ARN en las pruebas moleculares. Se realizó RT-PCR con los iniciadores específicos para la detección del VMP corroborándose la presencia del virus en 13 de ellas (Cuadro 4), mediante la amplificación de un fragmento de 700 pb correspondiente a la proteína de la

cápside (Ocampo *et al.*, 2013). Se logró identificar al virus en hojas jóvenes, brácteas y tallos.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas moleculares en la identificación del VMP en variedades comerciales de nochebuena.

	Variedad comercial	Tejido analizado	Plantas analizadas	RT-PCR
1	'Silverstar Marble'	HJ	3	(+)
2	'Silverstar Red'	HJ	2	(+)
3	'Sparkling Punch'	HJ	1	(+)
4	'Ice Punch'	HJ, T	3	(+)
5	'Marblestar'	HJ, T	2	(+)
6	'Cortez Electric Fire'	HJ	1	(+)
7	'Carousel Dark Red'	HJ	1	(+)
8	'Primero White'	HJ	6	3* (+)
9	'Amaris Hot Pink'	HJ	11	7* (+)
10	'Cortez Red'	HJ	2	(-)
11	'Enduring Marble'	HJ	2	(-)
12	'Freedom Pink'	HJ, T	2	(-)
13	'Monet Early'	HJ	2	(+)
14	'Polar Bear'	HJ, BR	2	(+)
15	'Premier Pink'	HJ, BR	2	(-)
16	'Primero Red Glitter'	HJ	6	3* (+)
17	'Viking Cinammon'	HJ	2	(-)
18	'Winter Rose Early Red'	HJ	2	(+)
19	'Whinter Rose White'	HJ	2	(-)
20	'Orange Spice'	HJ, BR, T	6	(-)

Abreviaturas en la tabla. Tejido analizado. HJ: Hojas Jóvenes; T: Tallo; BR: Brácteas. Resultados. (+): positivo; (-): negativo; *: indica el número de plantas positivas en relación con el número total de plantas analizadas. Variedad comercial. (1, 2, 4-7, 10, 12): Material vegetal de la empresa Vivero Internacional de México®; (3, 8, 9, 11, 13-20): Material vegetal de la empresa Floraplant®.

Los amplicones de ADN del VMP obtenidos en las variedades comerciales positivas se secuenciaron en la empresa MacroGen en Corea, a excepción del amplicón obtenido en 'Amaris Hot Pink', que también amplificó el fragmento esperado. Las secuencias de ADN del VMP obtenidas en 11 de las variedades comerciales tuvieron porcentajes de similitud del 95-98 % con la secuencia del virus reportado en Japón con número de acceso AB550788.1. De acuerdo con Jacobo *et al.* (2015) las secuencias de ADN obtenidas del virus en las variedades

'Freedom' y 'Red Prestige' se alinearon a esta misma secuencia con porcentajes de similitud del 92 %. En 'Marblestar' se obtuvo un porcentaje de similitud del 97 % con la secuencia de ADN del virus reportado en Alemania con número de accesoión AJ271595.1 (Cuadro 5; Apéndice 1).

Cuadro 5. Comparación de las secuencias de ADN obtenidas en el análisis molecular con las registradas en el GenBank para el VMP.

	Variedad comercial	% de similitud	No. de accesoión	País del reporte
1	'Silverstar Marble'	97	AB550788.1	Japón
2	'Silverstar Red'	96	AB550788.1	Japón
3	'Sparkling Punch'	96	AB550788.1	Japón
4	'Ice Punch'	96	AB550788.1	Japón
5	'Marblestar'	97	AJ271595.1	Alemania
6	'Cortez Electric Fire'	97	AB550788.1	Japón
7	'Carousel Dark Red'	96	AB550788.1	Japón
8	'Primero White'	98	AB550791.1	Japón
9	'Monet Early'	96	AB550788.1	Japón
10	'Polar Bear'	96	AB550788.1	Japón
11	'Primero Red Glitter'	96	AB550788.1	Japón
12	'Winter Rose Early Red'	95	AB550788.1	Japón

3.5.3 Inoculación mecánica del VMP

Las plantas de *N. benthamiana* que se inocularon con el VMP empleando el amortiguador de Fosfatos + DIECA, pH 8.6, presentaron verrugas, clorosis sistémica, deformación, y puntos cloróticos en las hojas, estos síntomas coinciden con los descritos por Lebas *et al.* (2007) quienes al inocular plantas de esta especie con el virus observaron verrugas y clorosis sistémica en hojas. Las plantas inoculadas con el Amortiguador de Na (mono y dibásico) pH. 7.8, se mostraron asintomáticas.

A diferencia de lo observado en *N. benthamiana*, en el caso particular de *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Ch. amaranticolor*, no se presentaron diferencias en la manifestación de síntomas con respecto a la utilización de una u otra solución amortiguadora. En *N. glutinosa* se observó deformación de la lámina foliar, sin

embargo, este síntoma estuvo ligado al daño mecánico que sufrieron las hojas al ser inoculadas, también se presentaron manchas irregulares de color blanco, que pudieron ser ocasionadas por insectos, no obstante, se observaron síntomas de mosaico ligero atribuibles a la transmisión del virus. Las plantas de *N. clelandii* presentaron síntomas de clorosis en las hojas, posiblemente como respuesta a infección viral. En *Ch. amaranticolor* las plantas inoculadas con el virus se mostraron asintomáticas. Las cuatro especies de plantas diferenciales empleadas en la investigación mostraron en mayor o menor grado daño mecánico tanto en plantas inoculadas con el virus como en los testigos negativos, ocasionado por la manipulación de las plantas durante la inoculación (Figura 2).

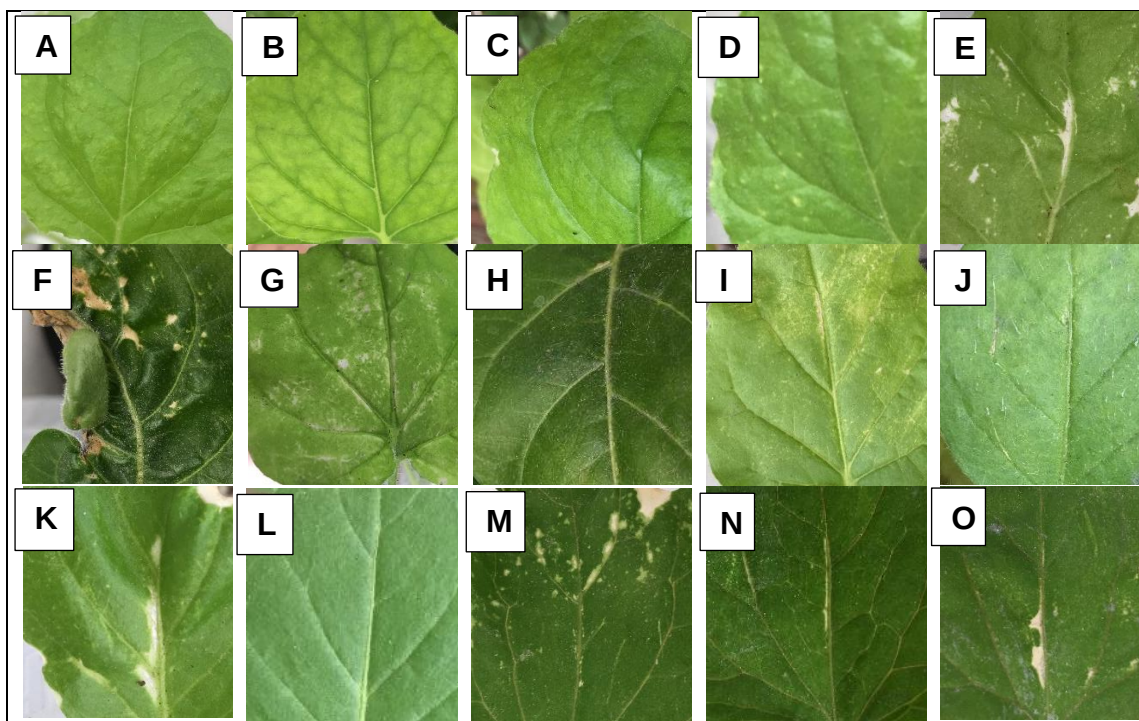


Figura 3. Síntomas observados en plantas diferenciales inoculadas con el VMP. (A-E): *N. benthamiana*; (A): verrugas; (B): clorosis sistémica; (C): deformación; (D): puntos cloróticos; (E): Testigo (-), daño mecánico; (F-I): *N. glutinosa*; (F): deformación; (G): manchas blancas; (H): mosaico ligero; (I): Testigo (-), daño mecánico; (J-L): *N. clevelandii*; (J): clorosis; (K): daño mecánico; (L): Testigo (-), hoja sana; (M-O): *Ch. amaranticolor*; (M y N): daño mecánico; (O): Testigo (-), daño mecánico.

Todas las plantas diferenciales inoculadas con el virus se analizaron por RT-PCR, los resultados obtenidos mostraron que no hubo transmisión del virus en ninguna especie inoculada (independientemente del amortiguador utilizado). Las plantas diferenciales de *N. benthamiana*, *N. glutinosa* y *N. clevelandii* están reportadas como hospedantes del VMP, mientras que *Ch. amaranticolor* no es susceptible a la infección por este patógeno (Brunt *et al.*, 1996). De acuerdo con Jacobo *et al.* (2015) la transmisión del VMP en plantas diferenciales puede resultar incompatible debido a las condiciones de temperatura y luminosidad en las pruebas, así como las características propias de las plantas y la solución amortiguadora que se utilice.

En el caso particular de *N. benthamiana* se esperaba la trasmisión exitosa del VMP, ya que de acuerdo con Floeistad and Blystad (1999) y Lebas *et al.* (2007) en esta especie se ha podido inocular mecánicamente y volver a aislar el virus,

Brunt *et al.* (1996) señalan esta especie diferencial como adecuada para el diagnóstico del patógeno, ya que las plantas inoculadas con el virus se infectan sistémicamente y muestran síntomas de manchas irregulares cloróticas en las hojas. Sin embargo, en la investigación la falta de transmisión del patógeno pudo deberse a las características intrínsecas del virus, ya que de acuerdo con Guy (1985) este presenta un porcentaje de éxito en la transmisión mecánica del 0-10 %. Bech and Rasmussen (1996) lograron transmitir el VMP en variedades de nochebuena mediante inoculación por injerto, utilizando este mismo método de inoculación Floeistad and Blystad (1999) infectaron plantas de *Euphorbia cornastra* y *E. bubalina* con el virus, de acuerdo con estos estudios la inoculación por injerto podría ser una alternativa a la transmisión mecánica del virus.

El análisis de las plantas diferenciales debió realizarse adicionalmente con pruebas de DAS-ELISA, ya que los resultados obtenidos en las variedades comerciales, indican que en las pruebas serológicas se obtienen resultados positivos que en ocasiones no se pueden corroborar molecularmente, Lebas *et al.* (2007) mencionan que las causas probables pueden ser la presencia de inhibidores y látex que dificultan la extracción de ARN, sugieren la identificación del virus mediante RT-PCR para caracterizar aislamientos, y las pruebas DAS-ELISA para detección del patógeno.

3.6 CONCLUSIONES

Se detectó el Virus Mosaico de las Poinsettia en el 100 % de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas, aunque solo el 35 % mostró síntomas característicos de la infección viral.

3.7 LITERATURA CITADA

- 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, doi: 10.1016/j.virol.2005.03.020
- Bech, K., & Rasmusse, K. (1996). *Euphorbia pulcherrima*. Methods to eliminate *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) and reinfection by different methods to reveal the nature of the branching factor. *Acta Horticulturae*, 24, 346, doi: 10.17660/ActaHortic.1996.432.22
- Bertaccini, A., Vibio, M., & Bellardi, M. G. (1996). Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 35 (2), 129-132.
- Bradel, B. G., Preil, W., & Jeske, H. (2000). Sequence analysis and genome organisation of *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) reveal closer relationship to marafiviruses than to tymoviruses. *Virology*, 571 (12), 289-297, doi: 10.1006/viro.2000.0335
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. *Poinsettia mosaic tymovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr633.htm> (consulta, mayo 2020).
- Cabrera, R. J., Morán, M. F., Torres, Q. R., Pellón, B. A., & Granada, C. L. (2006). Producción de Nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. en Morelos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico No. 23. Zacatepec, Mor., México. 20 p.
- Canul, K.J., García, P. F., Barrios, G. E. J., Campos, B. E., Osuna, C. F. J., Ramírez, R. S., & Rangel, E. S. E. (2015). Técnica para producir híbridos en Nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch). *Agroproductividad*, 8 (2), 32-37.
- Canul, K. J., García, P. F., Osuna, C. F. J., & Ramírez, R. S. (2012). Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico No.64. Zacatepec, Mor., México. 32 p.
- Canul, K. J., García, P. F., Ramírez, R. S., & Osuna, C. F. J. (2010). Programa de mejoramiento genético de nochebuena en Morelos. Campo Experimental Morelos, INIFAP. Folleto Técnico No. 49. Zacatepec, Mor., México. 39 p.
- Carballo, O., Izaguirre, M. L., & Marys, E. (2001). Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting Poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *The American Phytopathological Society*, 85 (11), 1208, doi: 10.1094/PDIS.2001.85.11.1208D

- Chiko A., W. (1983). *Poinsettia mosaic virus* in British Columbia. *Plant Disease*, 67 (4): 427-428.
- Chung, B. N., Lee, E. K., Jeong, M. I., & Kim, H. R. (2004). First Report on *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 20 (3), 220-223, doi: 10.5423/PPJ.2004.20.3.220
- Clarke J. L., Spetz, C., Haugslien, S., Xing, S., Dees, M. W., Moe, R., & Blystad, D. R. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus-derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia mosaic virus*. *Plant Cell Reports*, 27, 1027–1038, doi: 10.17660/ActaHortic.2006.722.40
- Floeistad, E., & Blystad, D. R. 1999. Two new hosts for *Poinsettia mosaic virus*. *Plant Disease*, 83 (4), 399.
- Fulton, R. W., & Fulton, J. L. (1980). Characterization of a Tymo-like Common in Poinsettia. *The American Phytopathological Society*, 70 (4), 321-324.
- García, P. F., Rangel, E. S. E., Barrios, G. E. J., Ramírez, R. S. G., Portas, F. B., & Canul, K. J. (2019). Leticia: nueva variedad mexicana de nochebuena para interiores. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10 (2), 461-466, doi: 10.29312/remexca.v10i2.1366
- Guy P. (1985). New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *The Australasian Plant Pathology*, 14 (1), 12-13.
- Jacobo, V. O., Valdovinos, P. G., Ramírez, R. S., & Hernández, J. C. (2015). Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (2), 219-231.
- Koenig, R., & Lesemann, D. E. (1980). Two isometric viruses in poinsettias. *Plant Disease*, 64 (8), 782-784.
- Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, J. Z., & Alexander, B. J. R. (2007). Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *American Phytopathological Society*, 91 (1), 110, doi: 10.1094/PD-91-0110A
- Ma, X. Y., Cai, J. H., Li, G. X., Qin, B. X., & Zhou, X. P. (2004). Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal of Phytopathology*, 152 (4), 215-218, doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00832
- Ocampo, O. T., Ochoa, M. D. L., Ramírez, R. S., Valdovinos, P. G., & Nava, D. C. (2013). Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 82, 235-241.
- Okano, Y., Maejima, K., Shiraishi, T., Hashimoto, M., Senshu, H., Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Yamaji, Y., & Namba, S. (2010). Genetic

heterogeneity found in the replicase gene of *Poinsettia mosaic virus* isolates. *Archives of virology*, 155 (8), 1367-1370, doi: 10.1007/s00705-010-0708-y

- Ruiz, G. N., Mora, A. G., Rivas, V. P., Gongora, C. C., Loeza, K. E., Martínez, O. D., Ramírez, V. G., Gutiérrez, E. A., & Álvarez, R. R. (2009). Sensibilidad de inmunopresión - ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15 (1), 41-47.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, mayo 2020).
- Trejo, L., Fera, A. T. P., Olsen, K. M., Eguiarte, L. E., Arroyo, B., Gruhn, J. A., & Olson, M. E. (2012). *Poinsettia's* wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany*, 99, 1146–1157, doi: 10.3732/ajb.1200072
- United States Department of Agriculture (USDA). (2019). Floriculture Crops 2018. National Agricultural Statistics Service. 88 p. https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/floran19.pdf (consulta, mayo 2020)
- Zamboni, A., Pierantoni, L., & De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 1, 122-125, doi: 10.3832/for0465-0010122

4. Fenoles y enzimas en variedades de nochebuena infectadas con el Virus Mosaico de la Poinsettia (Tymovirus)

4.1 Resumen

Las plantas tienen la capacidad de activar mecanismos de defensa como respuesta a la infección de patógenos. En la resistencia genética, la síntesis de compuestos fenólicos y la actividad de enzimas de defensa que expresen las plantas durante la infección pueden determinar el grado de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. En nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) no se ha estudiado la participación de estos mecanismos ante la infección del Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP), un patógeno importante en el cultivo. Contar con estos estudios permitirá su futura incorporación en programas de mejoramiento genético, para generar variedades resistentes al virus. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue cuantificar algunas respuestas de defensa de tres variedades comerciales de nochebuena infectadas con el VMP. Se determinó la concentración de proteínas solubles totales, fenoles totales, actividad de las enzimas peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio-liasa (PAL) y la correlación de estos metabolitos en las variedades comerciales de nochebuena 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Prestige Red'. La variedad 'Prestige Red' presentó la mayor concentración de proteínas solubles totales y fenoles totales. Las actividades enzimáticas de CAT, POX y PAL no mostraron diferencia significativa entre variedades, aunque se observó mayor actividad de POX en 'Red Prestige', mientras que en 'Primero Red Glitter' se registraron las mayores actividades de CAT y PAL. En la variedad 'Red Prestige' se registró el mayor contenido de proteínas solubles totales, fenoles y actividad de POX, mientras que en 'Primero Red Glitter' se presentó la mayor actividad de CAT y PAL. En las tres variedades hubo correlación positiva significativa entre CAT/proteínas solubles totales y POX/PAL. En 'Primero Red Glitter' hubo correlación positiva significativa entre PAL/fenoles totales.

Palabras clave: *Euphorbia pulcherrima*, proteínas solubles totales, CAT, POX, PAL.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Omar Jacobo Villegas.

Director de tesis: Dra. María Teresa Colinas León

4.2 Abastract

Phenols and enzymes in poinsettia varieties infected with the *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus)

Plants can activate defense mechanisms in response to pathogen infection. In genetic resistance, the synthesis of phenolic compounds and the activity of defense enzymes expressed by plants during infection can determine the degree of resistance or susceptibility to the disease. On poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) the participation of these mechanisms in infection with the *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), an important pathogen in culture, has not been studied. Having these studies will allow their future incorporation in genetic improvement programs, to generate varieties resistant to the virus. Therefore, the objective of this research was to quantify some defense responses of three commercial varieties of poinsettia infected with PnMV. Total soluble protein content, total phenols, peroxidase (POX), catalase (CAT) and phenylalanine ammonium lyase (PAL) activity were determined, and the correlations of these metabolites in the varieties 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' and 'Prestige Red'. The 'Prestige Red' variety presented the highest concentration of total soluble proteins and total phenols. The enzymatic activities of CAT, POX and PAL did not show a significant difference between varieties, although greater POX activity was observed in 'Red Prestige', while in 'Primero Red Glitter' the highest activities were recorded CAT and PAL. In the 'Red Prestige' variety, the highest content of total soluble proteins, phenols and POX activity was recorded, while in 'Primero Red Glitter', the highest activity of CAT and PAL was presented. In all three varieties there was a significant positive correlation between CAT/total soluble proteins and POX/PAL. In 'Primero Red Glitter' there was a significant positive correlation between PAL/total phenols.

Key words: *Euphorbia pulcherrima*, total soluble proteins, CAT, POX, PAL.

4.3 INTRODUCCIÓN

El cultivo de nochebuena es altamente susceptible a la infección por el Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP), el cual presenta distribución mundial y ocasiona pérdidas económicas en la producción (Brunt *et al.*, 1996; Lebas *et al.*, 2007; Okano *et al.*, 2010). El VMP demerita el valor comercial de las variedades de nochebuena al ocasionar mosaicos y deformaciones foliares, en infecciones severas interfiere con la pigmentación normal de las brácteas, principal atractivo

de esta especie ornamental (Bertaccini *et al.*, 1996; Chiko, 1983; Fulton and Fulton, 1980).

En la interacción planta-patógeno, las plantas tienen la capacidad de activar mecanismos de defensa que pueden inhibir el establecimiento y desarrollo de patógenos (Peteira y León, 2011). Estos mecanismos están asociados a la síntesis de proteínas, compuestos fenólicos y actividad de enzimas de defensa que brindan protección a la planta (Agrios *et al.*, 2005). Ante la presencia de patógenos las plantas sintetizan proteínas como quitinasas, glucanasas, proteínas activas de lisozima o proteínas que fortalecen la pared celular como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (García *et al.*, 2014).

La acumulación de compuestos fenólicos como las fitoalexinas se incrementa en plantas enfermas, llegando a niveles tóxicos para el patógeno. Las peroxidasas (POX) intervienen en la lignificación de las paredes celulares para detener el avance de la infección. Las catalasas (CAT) participan en la síntesis de glicina, regulan el contenido de ácido indolacético y en conjunto con las POX descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, evitando la oxidación de tejidos vegetales. La fenilalanina amonio-liasa (PAL) es precursora de la biosíntesis de compuestos fenólicos y ligninas, éstas últimas participan en la reparación de heridas en las plantas. La PAL presenta mayor actividad o nueva síntesis en plantas enfermas (Agrios, 2005; Ajithkumar and Panneerselvam, 2014; Bidwell, 1995; Flores-Torres *et al.*, 2017; Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). En la resistencia genética, las variedades resistentes expresan mayor concentración de fenoles y actividad enzimática en comparación con variedades susceptibles (Lozoya *et al.*, 2010; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2007; Peteira y León, 2011).

Los mecanismos de defensa contra patógenos se han estudiado principalmente en cultivos con valor alimenticio (Arias *et al.*, 2011; Flores-Torres *et al.*, 2017; Lozoya-Saldaña *et al.*, 2007; Peteira y León, 2011; Robledo-Esqueda *et al.*, 2012). Sin embargo, en nochebuena se desconoce la participación de proteínas, fenoles y enzimas como respuestas de defensa ante la infección del VMP. Contar

con estos estudios permitirá su incorporación futura en programas de mejoramiento genético de nochebuena, para generar variedades resistentes al virus.

Por lo anterior mencionado, el objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de proteínas solubles totales, fenoles y actividad enzimática en tres variedades comerciales de nochebuena infectadas con el Virus Mosaico de la Poinsettia.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

En diciembre de 2018 se adquirieron plantas de nochebuena en maceta de las variedades 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Prestige Red' (100 % pigmentadas), en un vivero ubicado en Texcoco, Estado de México. De cada variedad se analizaron seis plantas con síntomas putativos al Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP). Las plantas se mantuvieron en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, a temperaturas de 22 °C en el día y 15 °C en la noche, se manejaron agronómicamente de acuerdo con Cabrera *et al.* (2006).

4.4.2 Análisis serológico y molecular

Se realizaron pruebas serológicas (DAS-ELISA) y moleculares (RT-PCR) para determinar la presencia del Virus Mosaico de la Poinsettia (VMP) en las tres variedades comerciales de nochebuena (la metodología se describe en el capítulo anterior).

4.4.3 Variables evaluadas

En enero de 2019, de cada planta de nochebuena en maceta se tomaron muestras de hojas maduras: 10-15 g de tejido foliar, se etiquetaron individualmente y se almacenaron a -20 °C. Se realizó un segundo y tercer muestreo a los 30 y 60 días respectivamente. Se analizaron seis plantas de

nochebuena por variedad comercial, de cada planta se tomaron tres muestras foliares, de tal manera que se obtuvieron 18 muestras para cada una de las tres variedades de nochebuena.

Las variables evaluadas fueron el contenido de proteínas solubles totales, fenoles totales y la actividad enzimática de peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio-liasa (PAL). El análisis de varianza se hizo bajo un diseño completamente al azar en el programa Minitab Statistical Software y Excel, con comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se calcularon las correlaciones entre las variables evaluadas con el coeficiente de correlación de Pearson ($p \leq 0.05$).

4.4.4 Polvo de acetona

Se obtuvo polvo de acetona de todas las muestras empleando el procedimiento establecido por Alia-Tejacal (2003). Se molieron 10-15 g de hojas jóvenes con 50 mL de acetona fría (4 °C) y se filtraron al vacío, este procedimiento se repitió tres veces. Los polvos de acetona obtenidos se secaron en cajas Petri (acondicionadas con papel filtro), se pesaron y etiquetaron individualmente, y se almacenaron a -20 °C. La acetona recuperada en los procesos de filtrado de cada muestra se vertió individualmente en frascos de vidrio y se mantuvo a 4 °C.

4.4.5 Proteínas solubles totales

La concentración de proteínas solubles totales se determinó con base en el método establecido por Bradford (1976). De cada muestra se pesaron 0.05 g de polvo de acetona, se homogeneizaron con 5 mL de amortiguador frío (4 °C) Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1 y se centrifugaron a 16,000 x *g* por 20 min a 4°C. Para el ensayo, del sobrenadante mantenido a temperatura ambiente, se tomaron 0.1 mL, se adicionaron 0.9 mL de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1 y 5 mL del reactivo de Bradford (1 L: 100 mg de Coomassie blue + 50 mL etanol 95 % + 100 mL ácido fosfórico), se agitaron y dejaron reposar por 12 min. Las muestras se analizaron por duplicado. La absorbancia se cuantificó a 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific® (utilizado en la

cuantificación de fenoles y de enzimas). La curva de calibración se realizó con albúmina de bovino con amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1. La concentración se reportó en mg de proteínas totales por g⁻¹ peso fresco de tejido.

4.4.6 Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó con el método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). De cada muestra se tomaron 0.05 mL del extracto para el polvo de acetona, se mezclaron con 3.95 mL de agua destilada y 0.25 mL de Folin-Ciocalteu, se agitó manualmente y se dejó reposar por ocho min, se adicionaron 0.75 mL de carbonato de sodio al 20 % y se agitó vigorosamente, se dejó reposar en condiciones de oscuridad durante 2 h. Las muestras se analizaron por triplicado. La absorbancia se cuantificó a 760 nm. Para la cuantificación de fenoles totales se empleó una curva patrón de ácido tánico. La concentración se reportó en mg fenoles totales g⁻¹ peso fresco de tejido.

4.4.7 Peroxidasa (EC 1.11.1.7, POX)

La actividad de peroxidasa se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Flurkey and Jen (1978). Se pesaron 0.05 g de polvo de acetona de cada muestra, se homogenizaron individualmente con 5 mL de amortiguador frío Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1 adicionado con Polivinilpirrolidona (PVP) al 1 %, y se centrifugaron a 12,500 x g durante 20 min a 4°C. Para el ensayo las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, del sobrenadante se tomaron 0.05 mL, y se mezclaron con 2.6 mL de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1, 0.25 mL de guaiacol 0.1 M y 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 0.25 %. La absorbancia se cuantificó a los 30, 60, 90 y 120 s a 470 nm. La concentración de peroxidasa se reportó en U g⁻¹ de peso fresco, donde U = Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μmol de tetraguaiacol min⁻¹.

4.4.8 Catalasa (EC.1.11.1.6, CAT)

La actividad de catalasa se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Lück, citada por Blackwell *et al.* (1990). Se pesaron 0.05 g de polvo de

acetona de cada muestra, se agregaron 5 mL de amortiguador frío Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 (+ PVP 1 %), se homogenizaron y centrifugaron a 17,000 x *g* durante 30 min a 4 °C. Para el ensayo, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, se mezclaron 2.8 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.5, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno y 0.1 mL de extracto crudo. Se cuantificó la absorbancia a 240 nm a los 10, 30, 60, 90 y 120 s. La actividad enzimática se reportó en U g⁻¹ de peso fresco, donde U = Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la descomposición 1 μmol de peróxido de hidrógeno.

4.4.9 Fenilalanina amonio-liasa (EC 4.3.1.5, PAL)

La actividad de fenilalanina amonio-liasa se determinó de acuerdo al método establecido por Martínez-Téllez y Lafuente (1997). De cada muestra se pesaron 0.1 g de polvo de acetona, se agregaron 5 mL de amortiguador frío (4 °C) borato sódico 0.1 M, pH 8.8 (adicionado con B-mercaptoetanol 20 mM + PVP 1 %), se homogenizaron y centrifugaron a 17,000 x *g* por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, para precipitar la enzima se adicionaron 0.46 g de sulfato amónico por cada mL recuperado. Se centrifugó a 17,000 x *g* por 30 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 5 mL de amortiguador acetato de amonio 0.1 M, pH 7.7 (β-mercaptoetanol 20 mM + PVP 1 %). El ensayo de la actividad enzimática se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Arz y Grambow (1995). Se tomaron 2 mL del extracto final y se añadieron 3.4 mL de agua desionizada, se incubaron por 5 min a 40 °C, se añadieron 0.6 mL de L-fenilalanina 100 mM, se cuantificó la absorbancia a 290 nm. Las muestras permanecieron en incubación a 40 °C durante 2 h, y se cuantificó el cambio de absorbancia a 290 nm. Cada muestra se analizó considerando un blanco, compuesto por 2 mL del extracto final y 4 mL de agua desionizada. La actividad enzimática se reportó como U g⁻¹ de peso fresco, donde U = incremento (absorbancia) a 290 nm h⁻¹.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Sintomatología

En las variedades comerciales 'Amaris Hot Pink' y 'Prestige Red' se observaron síntomas de mosaico en los tejidos foliares. En 'Primero Red Glitter' se observó mosaico clorótico en hojas, deformaciones severas de hojas y brácteas, y estas últimas no pigmentaron en su totalidad (Figura 3). De acuerdo con Lebas *et al.* (2007) y Brunt *et al.* (1996) los síntomas observados en las tres variedades son característicos de la infección del VMP en variedades comerciales de nochebuena.

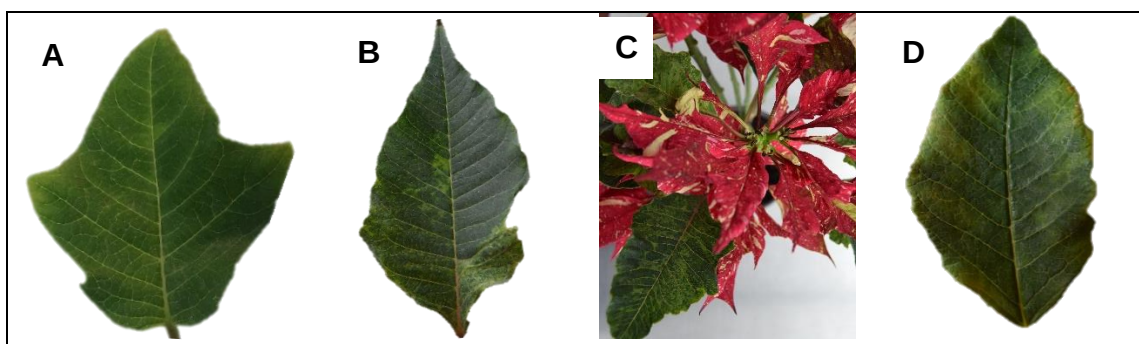


Figura 4. Sintomatología viral en variedades de nochebuena. (A) 'Amaris Hot Pink', mosaico foliar; (B y C) 'Primero Red Glitter', (B) mosaico clorótico foliar, (C) deformación severa de hojas y brácteas; (D) 'Prestige Red', mosaico foliar.

4.5.2 Análisis serológico y molecular

Mediante las pruebas serológicas se determinó la presencia del VMP en 100 % de las plantas analizadas, mientras que en las pruebas moleculares la presencia del virus se corroboró en 50 % de la población total analizada (tres plantas de cada variedad comercial). Lebas *et al.* (2007) mencionan que la identificación molecular del VMP se dificulta por la presencia de inhibidores y el alto contenido de látex en la nochebuena.

Los valores de absorbancia (lecturas a 405 nm) en las pruebas DAS-ELISA se muestran en el Capítulo 2 (Resultados): 'Amaris Hot Pink', plantas 6-11, ensayo 3 (Cuadro 3); 'Primero Red Glitter', plantas 1-6, ensayos 2 y 3 (Cuadros 2 y 3); 'Red Prestige' (Cuadro 6), estos valores corresponden a datos complementarios

del ensayo 3 (Cuadro 3), en el Capítulo 3 no se consideró pertinente mostrar la evaluación de esta variedad por estar reportada anteriormente como hospedante del VMP por Jacobo *et al.* (2015).

Cuadro 6. Valores de absorbancia (405 nm) en la prueba DAS-ELISA en la detección del VMP en 'Red Prestige'.

Planta	Repeticiones		Promedio	Resultado
	I	II		
Blanco	0.105	0.105	0.105	
Control (-)	0.143	0.149	0.146	
Control (+)	2.467	2.215	2.341	
1	1.765	1.864	1.814	(+)
2	1.625	1.573	1.599	(+)
3	1.698	1.763	1.730	(+)
4	1.876	1.467	1.671	(+)
5	2.023	1.892	1.957	(+)
6	1.617	1.735	1.676	(+)
Promedio			1.715	

Límite de detección (LD): $3 (0.146) = 0.438$. Control (+): 'Red Prestige'; Control (-): *E. pulcherrima* silvestre.

4.5.3 Proteínas solubles totales

La concentración de proteínas solubles totales en el muestreo inicial fue similar en las tres variedades de nochebuena, en el segundo muestreo se presentó un decremento en la concentración en 'Amaris Hot Pink' y 'Primero Red Glitter', en contraste, en 'Red Prestige' la concentración se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$), registrándose la mayor concentración (2.182 mg g^{-1} peso fresco). En el muestreo final la concentración en 'Amaris Hot Pink' y 'Primero Red Glitter' se incrementó superando a las registradas en el muestro inicial, en 'Red Prestige' hubo un decremento en la concentración y se obtuvieron valores similares a los registrados en 'Primero Red Glitter' (Cuadro 7; Figura 4). De acuerdo con Flores-Torres *et al.* (2017) y García *et al.* (2014) la síntesis de proteínas tóxicas para patógenos como glucanasas y quitinasas puede incrementarse como respuesta a la infección. Sin embargo, la mayor concentración de proteínas en el estudio se

registró en 'Red Prestige', mientras que los mayores daños por el virus se presentaron en 'Primero Red Glitter'. Los resultados obtenidos corresponden al contenido de proteínas solubles totales, no solo a las relacionadas a defensa, lo que podría explicar que en 'Primero Red Glitter' no se hayan obtenido las mayores concentraciones de proteínas. De acuerdo con Ojito-Ramos y Portal (2010) las proteínas R pueden reconocer componentes virales y otras proteínas acumuladas en las plantas por la replicación de los virus y llevar a cabo el silenciamiento génico de estos patógenos, no obstante, en las variedades evaluadas de nochebuena el PnMV se replicó exitosamente, de acuerdo con la sintomatología observada en las plantas.

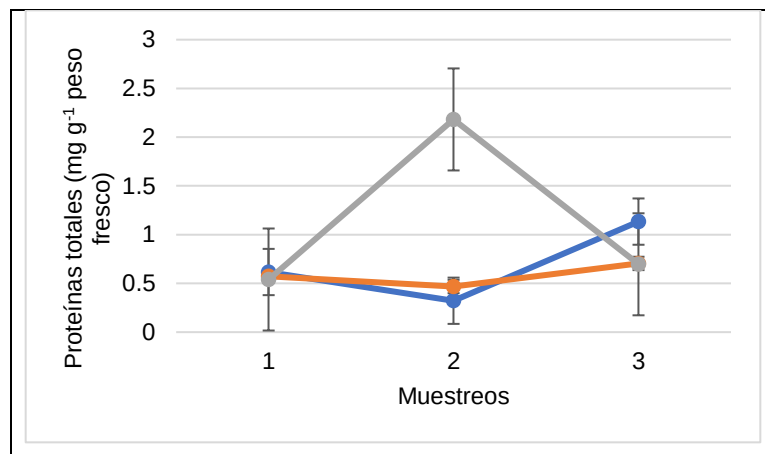


Figura 5. Proteínas solubles totales en variedades de nochebuena. 'Amaris Hot Pink' —●—; 'Primero Red Glitter' —●—; 'Red Prestige' —●—. Cada punto representa la media de seis observaciones $\pm$ error estándar.

Cuadro 7. Promedios de presencia y actividad de los metabolitos en variedades comerciales de nochebuena.

Metabolito	Variedad	Muestreo						Promedio
		1	**	2	**	3	**	
PROTEÍNAS SOLUBLES TOTALES	'Amaris Hot Pink'	0.617	a	0.322	b	1.134	a	0.691
	'Primero Red Glitter'	0.574	a	0.468	ab	0.705	a	0.582
	'Red Prestige'	0.540	a	2.182	a	0.696	a	1.139
FFENOLES TOTALES	'Amaris Hot Pink'	0.218	a	0.162	a	0.150	b	0.177
	'Primero Red Glitter'	0.213	a	0.305	a	0.133	b	0.217
	'Red Prestige'	0.414	a	0.300	a	0.304	a	0.339
POX	'Amaris Hot Pink'	24,895	a	65,273	a	10,545	a	33,571
	'Primero Red Glitter'	45,151	a	63,773	a	30,537	a	46,487
	'Red Prestige'	144,292	a	7,199	a	27,752	a	59,747
CAT	'Amaris Hot Pink'	16.42	a	21.93	a	4.62	a	14.32
	'Primero Red Glitter'	39.80	a	25.70	a	16.10	a	27.20
	'Red Prestige'	11.37	a	3.21	a	25.60	a	13.39
PAL	'Amaris Hot Pink'	0.143	a	0.262	a	0.386	a	0.263
	'Primero Red Glitter'	0.352	a	0.217	a	0.892	a	0.487
	'Red Prestige'	0.237	a	0.041	a	0.539	a	0.272

*Ver unidades de cuantificación en Materiales y Métodos. **Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). POX: peroxidasa; CAT: catalasa; PAL: fenilalanina amonio-liasa. Los valores representan la media de seis observaciones $\pm$ error estándar.

4.6 Fenoles totales

En la variedad 'Amaris Hot Pink' la concentración de fenoles presentó un ligero decremento en cada muestreo. En 'Primero Red Glitter' la concentración de fenoles en el muestreo inicial fue similar al presentado en 'Amaris Hot Pink', en el segundo muestreo se presentó un incremento y en el muestreo final se presentó una disminución por debajo del muestreo inicial, en este muestreo se registró la menor concentración de fenoles en el ensayo (0.133 mg g^{-1} peso fresco). En 'Red Prestige' en el muestreo inicial se presentó la mayor concentración de fenoles en el ensayo (0.414 mg g^{-1} peso fresco), en el segundo muestreo se tuvo una concentración similar a 'Primero Red Glitter' y en el muestreo final nuevamente se presentó la mayor concentración de fenoles y fue diferente estadísticamente ($p \leq 0.05$) de las otras variedades (Cuadro 7; Figura 5, A). De acuerdo con Lozoya-Saldaña *et al.* (2007) el desempeño de los compuestos fenólicos en relación con el grado de resistencia o susceptibilidad a un determinado patógeno está en función de la presencia cuantitativa y en la dinámica de síntesis. En esta investigación no fue posible determinar la dinámica de síntesis de fenoles en variedades de nochebuena ante la infección del VMP, debido a que se analizaron únicamente plantas adultas. Agrios (2005) menciona que la resistencia a patógenos se presenta cuando los compuestos fenólicos como fitoalexinas alcanzan concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de patógenos. En las tres variedades de nochebuena analizadas la concentración de fenoles no fue suficiente para inhibir la replicación del VMP. Herrera *et al.* (2018) determinaron que la concentración de fenoles totales se incrementa como respuesta a la infección viral (Begomovirus) en el cultivo de chile (*Capsicum annuum*), por lo que el incremento en la concentración de fenoles totales en 'Primero Red Glitter' en el segundo muestreo, pudo deberse a que esta variedad presentaba daños severos por el VMP.

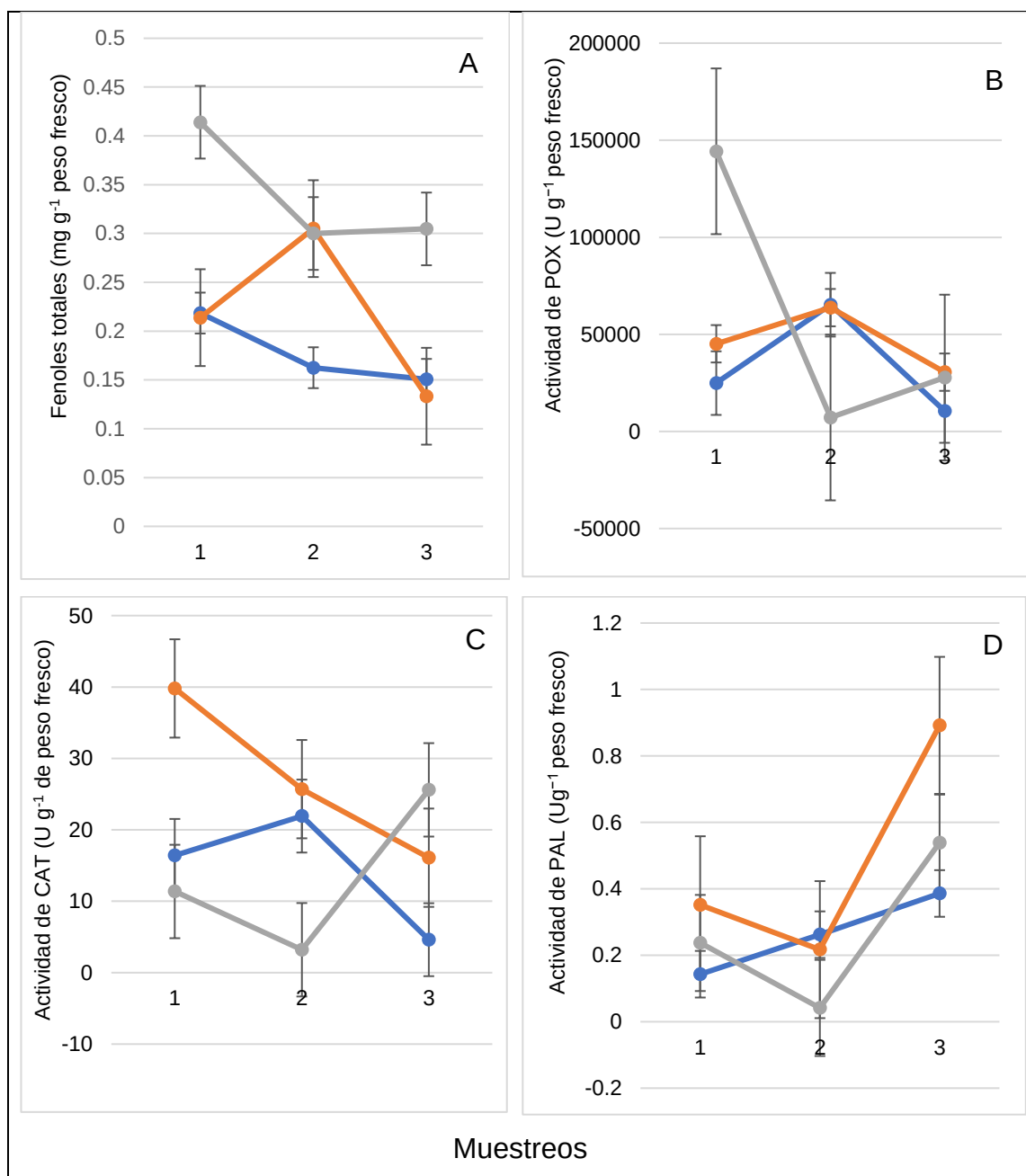


Figura 6. Concentración de fenoles y actividad enzimática en variedades de nochebuena. Concentración de fenoles totales (A), actividad de peroxidasa (B), catalasa (C) y fenilalanina amonio-liasa (D). 'Amaris Hot Pink' —●—; 'Primero Red Glitter' —●—; 'Red Prestige' —●—. Cada punto representa la media de seis observaciones $\pm$ error estándar.

4.7 Actividad de POX

El comportamiento de esta enzima fue similar en las variedades 'Amaris Hot Pink' y 'Primero Red Glitter': en el muestro inicial se presentó una actividad baja, la cual se incrementó en el segundo muestreo, mientras que en el muestreo final se presentó una disminución por debajo del muestreo inicial. En 'Red Prestige' se presentó una alta actividad de la enzima en el muestro inicial, registrándose la concentración más alta del ensayo ($144,292 \text{ U g}^{-1}$ peso fresco), en el segundo muestreo la actividad enzimática disminuyó drásticamente, se registró la concentración más baja en el ensayo ($7,199 \text{ U g}^{-1}$ peso fresco), en el muestreo final se registró una actividad similar a la presentada en 'Primero Red Glitter'. En la actividad de esta enzima no se presentó diferencia estadística ($p > 0.05$) entre variedades (Cuadro 7; Figura 5, B). De acuerdo con Peteira y León (2011) y Robledo-Esqueda *et al.* (2012) el incremento en la actividad de peroxidasas en las plantas puede evitar el desarrollo de patógenos. Sin embargo, en este estudio la actividad de POX no fue suficiente para evitar que el VMP se replicara en las variedades de nochebuena. Agrios (2005) menciona que esta enzima polimeriza los fenoles en lignina, la cual se deposita en la pared celular interfiriendo con el desarrollo del patógeno. No obstante, a pesar de que las variedades de nochebuena mostraron actividad de POX, se presentaron daños en las tres variedades por el VMP. Arias *et al.* (2011) observaron que la actividad de POX se incrementa en genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum*) resistentes al Virus del Encrespamiento Amarillo de la Hoja del Tomate (TYLCV), lo que explicaría la mayor actividad registrada en 'Red Prestige' en comparación con la actividad que presentó 'Primero Red Glitter', ya que en esta variedad se observó mayor severidad en la infección del VMP, sin embargo, en 'Amaris Hot Pink' se registró la menor actividad de esta enzima, por lo que los datos no son contundentes, y sería pertinente analizar la actividad de POX en etapas tempranas del cultivo.

4.8 Actividad de CAT

En la variedad 'Amaris Hot Pink' la actividad de catalasa en el muestreo inicial presentó un comportamiento intermedio respecto de las otras variedades, en el segundo muestreo se incrementó la actividad enzimática y en el muestro final se tuvo un decremento por debajo de la concentración inicial. En 'Primero Red Glitter' en el muestreo inicial se registró la mayor actividad de esta enzima en el ensayo (39.80 U g^{-1} de peso fresco), en el segundo y tercer muestreo se observó un decremento constante en la actividad enzimática. En 'Red Prestige' en el muestreo inicial se presentó una baja actividad enzimática, en el segundo muestreo se registró la menor actividad enzimática en el ensayo (3.21 U g^{-1} de peso fresco), y en el muestreo final esta actividad se incrementó superando la actividad que presentaron las otras variedades. La actividad de catalasa en las variedades de nochebuena no presentó diferencia estadística ($p > 0.05$) (Cuadro 7; Figura 5, C). De acuerdo con Bidwell (1995) y Peteira y León (2011) la actividad de catalasa se activa como respuesta de defensa a la infección de patógenos. Lo que podría explicar la mayor concentración de esta enzima en la variedad 'Primero Red Glitter', donde se presentaron los mayores daños por el VMP.

4.9 Actividad de PAL

En la variedad 'Amaris Hot Pink' la actividad de fenilalanina amonio-liasa presentó un incremento constante en los tres muestreos. En 'Primero Red Glitter' en el muestreo inicial la actividad de esta enzima fue mayor respecto de las otras variedades, en el segundo muestreo se presentó un decremento y en el muestro final se registró la mayor actividad de esta enzima durante el ensayo (0.892 U g^{-1} de peso fresco). En 'Red Prestige' se presentó un comportamiento enzimático similar al de 'Primero Red Glitter', en el muestreo inicial la actividad de la enzima tuvo un comportamiento intermedio en comparación con el de las otras variedades, en el segundo muestro se registró la actividad más baja en el ensayo (0.041 U g^{-1} de peso fresco), y en el muestro final se incrementó la actividad enzimática superando a la registrada en 'Amaris Hot Pink'. La actividad de fenilalanina amonio-liasa no presentó diferencia estadística ($p > 0.05$) entre

variedades (Cuadro 7; Figura 5, D). De acuerdo con Bidwell (1995) y Flores-Torres *et al.* (2017) la actividad enzimática de PAL se incrementa en presencia de patógenos como una respuesta de defensa, al ser precursora de fitoalexinas y ligninas. En el estudio la variedad 'Primero Red Glitter' presentó la mayor severidad por el virus y fue en esta variedad donde se registró la mayor actividad enzimática, probablemente como consecuencia de una mayor afectación de los tejidos foliares y activación de los mecanismos de defensa en las plantas, estos resultados concuerdan con Díaz (2010) quien observó mayor síntesis y actividad de PAL en plantas de tomate infectadas con Geminivirus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) o el Tobamovirus Mosaico del Tabaco (TMV).

4.10 Correlaciones

En las tres variedades comerciales: 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Prestige Red' hubo correlación positiva significativa entre la actividad de catalasa y el contenido de proteínas solubles totales (CAT/proteínas solubles totales) ($r=0.87$, $r=0.79$ y $r=0.89$; $p\leq 0.05$); también hubo correlación positiva significativa en las tres variedades entre la actividad de peroxidasa y fenilalanina amonio-liasas (POX/PAL) ($r=0.9$, $r=0.93$ y $r=0.96$; $p\leq 0.05$). Las correlaciones observadas evidencian la estrecha relación de la actividad de CAT y el contenido de proteínas solubles totales, y actividad de POX y PAL en las tres variedades de nochebuena ante la infección del VMP. De acuerdo con Lozoya-Saldaña *et al.* (2007) las correlaciones enzimáticas en presencia de patógenos indican paralelismo en su dinámica de síntesis como mecanismos de defensa ante la infección (Cuadro 8).

En 'Primero Red Glitter' hubo correlación positiva significativa entre la actividad de fenilalanina amonio-liasas y la concentración de fenoles totales (PAL/fenoles totales) ($r=0.74$, $p\leq 0.05$). En esta variedad se presentó mayor severidad del VMP, lo que explicaría una mayor acumulación conjunta de estos metabolitos como respuesta de defensa. Lozoya-Saldaña *et al.* (2006) observaron un comportamiento similar de estos metabolitos en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) infectadas con tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y virus X de la papa (PVX), donde la síntesis de fenoles y actividad de PAL estuvieron

estrechamente ligadas como respuesta simultánea de defensa en plantas susceptibles al tizón tardío infectadas con PVX (Cuadro 8).

Cuadro 8. Correlación entre variables de las variedades comerciales de nochebuena.

	Variables	Fenoles totales	Proteínas ^z	PAL	CAT
'Amaris Hot Pink'	Proteínas ^z	-0.23 ^{ns}			
	PAL	0.40 ^{ns}	-0.53 ^{ns}		
	CAT	-0.46 ^{ns}	0.87 *	-0.34 ^{ns}	
	POX	0.25 ^{ns}	-0.30 ^{ns}	0.90 *	-0.16 ^{ns}
'Primero Red Glitter'	Proteínas ^z	-0.37 ^{ns}			
	PAL	0.74 *	-0.61 ^{ns}		
	CAT	-0.48 ^{ns}	0.79 *	-0.50 ^{ns}	
	POX	0.52 ^{ns}	-0.49 ^{ns}	0.93 *	-0.37 ^{ns}
'Prestige Red'	Proteínas ^z	-0.02 ^{ns}			
	PAL	0.42 ^{ns}	-0.33 ^{ns}		
	CAT	-0.14 ^{ns}	0.89*	-0.21 ^{ns}	
	POX	0.36 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	0.96 *	-0.12 ^{ns}

Abreviaturas en la tabla: *Nivel de significancia $p \leq 0.05$; ns: no significativo.

^zProteínas solubles totales; PAL: fenilalanina amonio-liasa; CAT: catalasa; POX: peroxidasa.

No existen antecedentes sobre la resistencia o tolerancia que pudieran presentar las variedades comerciales de nochebuena 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Red Prestige' a la infección del VMP, no obstante, en 'Primero Red Glitter' la infección fue más severa, en esta variedad se presentaron mosaicos cloróticos, deformaciones en hojas y brácteas, y falta de pigmentación de brácteas, mientras que en las otras variedades se observaron solamente mosaicos foliares.

En 'Primero Red Glitter' se registró la mayor actividad de catalasa y fenilalanina amonio-liasa, con medias 27.20 y 0.487 U g⁻¹ de peso fresco respectivamente. De acuerdo con Flores Torres *et al.* (2017) y Peteira y León (2011) la actividad enzimática de CAT y PAL se incrementan como respuesta de defensa en plantas enfermas, de tal forma que la mayor actividad de estas enzimas en 'Primero Red Glitter' se puede atribuir a los daños presentados en los tejidos foliares por el virus. En contraste, el contenido de proteínas solubles totales, fenoles totales y actividad de peroxidasa fue mayor en la variedad 'Red Prestige', con medias de

1.139 y 0.339 mg g⁻¹ peso fresco, y 59,747 U g⁻¹ peso fresco respectivamente. A pesar de que esta variedad presentó menor severidad en la infección del VMP en comparación con 'Primero Red Glitter'. El comportamiento observado en la actividad de los metabolitos pudo deberse a otros factores que intervienen en la interacción planta-virus. Bidwell (1995) menciona que la concentración de fenoles y actividad de enzimas puede ser estimulada por diversas condiciones externas e internas de la planta y la actividad enzimática varía según el estado de desarrollo de la planta.

El contenido de proteínas solubles totales, fenoles totales, y actividad de enzimas de defensa, se evaluaron únicamente en plantas adultas, por lo que los resultados no reflejan el comportamiento de estos metabolitos en etapas tempranas del cultivo de nochebuena. Lozoya-Saldaña *et al.* (2007) mencionan que la cuantificación de los metabolitos (fenoles y enzimas) deben considerar la síntesis inicial, acción y permanencia durante el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, para obtener datos precisos sobre la dinámica de síntesis de metabolitos y actividad de las enzimas evaluadas, será necesario considerar en investigaciones futuras el análisis de muestras en cada etapa fenológica del cultivo de nochebuena.

4.11 CONCLUSIONES

En la variedad 'Red Prestige' se registró el mayor contenido de proteínas solubles totales, fenoles y actividad de peroxidasa, mientras que en 'Primero Red Glitter' se presentó la mayor actividad de catalasa y fenilalanina amonio-liasa. En las tres variedades 'Amaris Hot Pink', 'Primero Red Glitter' y 'Prestige Red' hubo correlación positiva significativa entre la actividad de CAT y proteínas solubles totales (CAT/proteínas solubles totales: $r=0.87$, $r=0.79$ y $r=0.89$) y en la actividad de peroxidasa y fenilalanina amonio-liasa (POX/PAL: $r=0.9$, $r=0.93$ y $r=0.96$, respectivamente). En 'Primero Red Glitter' hubo correlación positiva significativa entre la actividad de fenilalanina amonio-liasa y fenoles totales (PAL/fenoles totales: $r=0.74$).

4.12 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- Ajithkumar, I. P., & Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment, and growth status of *Panicum sumatrense* Roth. Under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 587-595, doi: 10.1007/s12013-013-9746-x.
- Alia-Tejacal I. (2003). Estudios postcosecha en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Arias, Y., González, I., Pino O., Sánchez, Y., Miranda, I., Martínez, Y., Peteira, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis genotipos promisorios de tomate obtenidos en programas de mejoramiento genético para la resistencia al TYLCV. *Revista Protección Vegetal*, 26 (1), 40-44.
- Arz, C. M., & Grambow, J. H. (1995). Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membranes correlate with alterations in phenylalanine ammonia-lyase activity of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology*, 146: 64-70, doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81969-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81969-3)
- Bertaccini, A., Vibio, M., & Bellardi, M. G. (1996). Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 35 (2), 129-132.
- Bidwell, R. G. S. (1995). Fisiología vegetal. AGT Editor, S. A. México. 805 p.
- Blackwell, R. D., Murray, A. J. S., & Lea, P. J. (1990). Enzymes of photorespiratory carbon pathway. In Lea P. J. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* (pp. 129-144). USA: Academic Press.
- Bradford, M. N. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., & Zurcher, E. J. (1996). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Poinsettia mosaic tymovirus. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr633.htm> (consulta, mayo 2020).
- Cabrera, R. J., Morán, M. F., Torres, Q. R., Pellón, B. A., & Granada, C. L. (2006). Producción de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. en Morelos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto Técnico No. 23. Zacatepec, Mor., México. 20 p.
- Chiko A., W. (1983). *Poinsettia mosaic virus* in British Columbia. *Plant Disease*, 67 (4): 427-428.

- Flores-Torres, L. M., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., López-Arroyo, J. I., Olalde-Portugal, V., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., & Zamora-Villa, V. M. (2017). Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35: 314-325, doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1608-2
- Fulton, R. W., & Fulton, J. L. (1980). Characterization of a Tymo-like Common in Poinsettia. *The American Phytopathological Society*, 70 (4), 321-324.
- Furkey, W. H., & Jen, J. (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43, 1828-1831.
- García V. A. G. Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri*. (2014). Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias de la Floricultura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco, México.
- Jacobo, V. O., Valdovinos, P. G., Ramírez, R. S., & Hernández, J. C. (2015). Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (2), 219-231.
- Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Elliott, D. R., Tang, J. Z., & Alexander, B. J. R. (2007). Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *American Phytopathological Society*, 91 (1), 110, doi: 10.1094/PD-91-0110A
- Lozoya, S. H., Juárez, C. A., Colinas, L. M. T., & Bamberg, J. (2010). Activación enzimática de especies de *Solanum* contra *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary). *Interciencia*, 35 (8), 586-591.
- Lozoya-Saldaña, H., Rivera-Hinojosa, R., & Colinas-León M. T. (2007). Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia*, 479-489.
- Martínez-Téllez, M. A., & Lafuente M. T. (1997). Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammoniolyase and polyphenol oxidase activities in flavedoff chilled fortune mandarin fruit. *Journal Plant Physiology*, 150, 674-678.
- Peteira, B., & León, O. (2011). Interacciones hospedante-patógeno: logros y perspectivas en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 26 (3), 137-143.
- Robledo-Esqueda, M. N., Lozoya-Saldaña, H., & Colinas-León, M. T. (2012). Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. de Bary por fungicidas. *Interciencia*, 37 (9), 689-695.

- Serrano-Cervantes R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas-León, M. T., & Leyva-Mir, S. G. (2016). Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39 (1): 25-31.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, UK: Blackwell Cientific Publicatons.

5. APÉNDICE

Apéndice 1. Secuencias parciales obtenidas del Virus Mosaico de la Poinsettia en variedades comerciales de nochebuena.

“Silverstar Marble” PnMV-F

```
GCCTCTCTATGTCTTTGCCACCCGTCATCGTCTAGTGCCTCAATCCGTG
TACAATGCCCTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCATCTC
CGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAACCAGAGCAGGCC
TGGGTTACGTCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCAC
CGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGGC
AGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTCA
GCCATCTTCACTTCTCCTCCATCACCACCTTCTCTTCTCTCTCCTTTTCCAG
TACTTCCGTCGGAAATCTGCCACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCGACCTCGG
ATTCCGGAATCTGGACGAGCAGCTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCGG
GCTGGTTTTCAGTTACACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGAG
ATTTCTACTATAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATCTCCGCCCTCGTT
CGTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCCCTGCTTGCCTTCGCCATCTACTCAA
GTGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTACCACAAT
TACCATCATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGTGCCCGGGGGGGGCAA
AAAAGCCGCCGGCCGCCGGCGGGGGGGG
```

“Silverstar Marble” PnMV-R

```
CCCACGAAGGCGATATAGGTATTGTGGTAGGATCATGAAGGCTCTGAGG
GGGCATGGGCTGCGTGCACTTGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAGGGG
GAGAGAGAGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGAGATGAATTTGAATCG
CTCAGCGGCCCTATAGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGGGAA
GTGTGTGTGTAAGTGAACAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCTTGA
CGTGCTCGTCCAGATTCCGGAATCCGAGGTCGCTAGGCAAAGACCTAGA
GGTGGCAGATTTCCGACGGAAGTACTGGAAGGAGAGAGAAGAGGAA
GGTGGTGTGAGGGAAGTGAAGATGGCTGAAGATTTCACTCAGCGGCC
ACTGTTTGCAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCAGG
AATATGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCGGTGAAGATACAAAACCTGCTC
CGAGATTGTCCCAGGCGTCAAGACATAACGCCAGGTCGTGCGTCTGCGT
TTTGTTGTGACTCGTGCTGCGGAACCGAATGCCCGACCTGCGCATCTGG
TAGTATCGCCGCCAGCATGTGCCCGTATACCGCGCCTTCCGTAGCTTGC
TCAGAGGTTAGACAACCAGGCGAGGCCACTCTAGGTGAACCAACCCGCG
CAACTTTTAGAAAGGCGGCCCAATCCCTTAACGGGAACCGGGAACCTC
CGCAAACCCGCCCGAGGCCTAGGAAGGTTTTTTTTTTTTTGGCCAAAATC
TCGGCCAAAAAAATTTCCGGGCCCCCCCTTTTGGGGGGGGCGCCTTTTG
GGGGGAGGGGATCTCTACGCGTTTGTGCCCCCAAATTTCCCCCGGCC
CGGTTATAATGGGGGGAAAGTAAAAAGGGGTAAAGGAAAGGCCAAAGGA
GGGTTCCCCGGGGGCCGGCCCCGCCCCCCCTCGGGGGGGGGCGGGGGC
CCCGTGAACCCCCCAAAAAACCCAAAACCAAATCTGCGTTGGGGCCCC
CTAAATTTATCCCCATAAAAAATTTTTTTTAATAATTGGGTAAATTGGGTAT
```

CCCCTTGGGTTAAAGGAGATTCTCAACCTTTAAAAAATTATATGGACCCA
GGGGGACCGTTAAAAAGATTTGAAAGGGCTGGGAACGGG

“Silverstar Red” PnMV-F

ACAAGAAAATGAAACTGGCCACCCGTCATCGTCTGGTGCCTCAATCCGT
GTACAATGCTCTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCATCT
CCGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAACCAGAGCACGC
CTGGGTTACGTCCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCA
CTGCCTCCAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGTAGCCTCTGG
CAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTC
AGCCATCTTCACTTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCCCTCCTTTTCCA
GTACCTCCGTCGGAAATCTGCTACCTCTAGGTCCTTGCCTAGCGACCTTG
GATTCCGGAATCTGGACGAGCACGTTAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCG
GGCTGGTTTTAGCTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGA
GATTTCTATCATAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTTATCTCCGCCCTCGT
TCGCTCTATCTCCCTTTCTCTCCCCCTGCTTGCCTTCGCCATCTACTCCA
AGTGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCCTACCACAA
TTACCATCATCCAAGCAAGTGGGTCCTTGGATGGATCCCCGGGGGCCAA
AAAAAGGGGGGGGGCGGGGGG

“Silverstar Red” PnMV-R

GGACGAGGAGACGTTGTAATGTGGTAGGATCCATGAAGGCTCTGAGGG
GGCATGGGCTGCGTGCACTTGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAGGGGG
AGAGAAAGGGAGATAGAGCGAACGAGGGCGGAGATAAATTTGAATCGCT
CAGCGGCCCTATGATAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGGGAAGT
GTGTGTATAGCTAAAACCAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCTTAACG
TGCTCGTCCAGATTCCGGAATCCAAGGTCGCTAGGCAAGGACCTAGAGG
TAGCAGATTTCCGACGGAGGTAAGTGGAAAAGGAGGGAGAAGAGGAAGG
TGGTGATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAAGATTTCACTCACCGGCCAC
TGTTTGCAGGCGACAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTACCATTCAGGAA
TAGGAGTTGGAAGGACGGTTGGAGGCACTGAGGAGAGAAAAGTGCTGG
AGATTGTCCCAGGCGTAGGACGTAACCCAGGCGTGCTCTGGTTTGTGG
ACTGTGTGCCAACGAATCCGACTGGATCTCAGATGCCCAGAGTCCGAAC
GGCTCCAGTGTAAGTAGACAGAGCATTGTGCACCCATTGAGGCACCACA
ATATGACCGGTGGGTTGACGAATGCTGGTGGCCTCGTCGATAAAAACAG
CGCCGGGGGCCAAAAAAATGGGGGGGGGGGG

“Sparkling Punch” PnMV-F

TCACTACATTGAGAAAGACCACCCGTCATCCGCCTAGTGCCTCCAATCCG
TGTACAACGCGTCTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCGT
CTCCGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAATAAGCCAGAGCAC
GCCTGGGTCACGTCCTCCGCCTGGGATAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCT
CACTGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCT
GGCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGCTGAAATG
TTCAGCCATCTTCACTTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCTCTCCTTTT
CCAGTACTTCCGTCGGAGATCTGCCACCTCCAGGTCTTTGCCTAGTGAC
CTCGGTTTTCCGGAATCTGGACGAGCACGTCAAACCTCCATAAAGGCCTCC
TCCAGGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCT
CGAGATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCC
TCGTTTCGTTCCATCTCCCTCTCTCTTCCCCTGCTCGCGTTTCGCCATCTAC
TCCAAGTGCACGCAGCCCATGCCTCCTCAGAGCCTTCACGATTCCTACC
ACAACTACCATCATCCAAGCAAGTGGTCCTTGGATGATGCCCCGCCGCC
CAAAAAAAGGGAAACCCCCAAGAATGTTCTTTGCCGACCGTGACCCTG
GGGGCTACCCCTGCGTGGCAAATAACGGAGTGAACGAAGGCCCCCCCA
CTAGCTCCAGCTGGATGATCGAGTCAAGCAAAAAGAGGGACACTTGGC
ATGGTTGCAAGCCTCAAGCCATAGATCACGGCAGGCCAAGCTCCACTTA
AATATAAATGGGCCTGCCGCCATTTTCTCTTGCCATGACTACCCTCGCC
CGAGGATGTCAATACTTGCACGGATTAGATGCCTGACTCAGTGCAACGA
ACACCATGGCTG
AGCCTAGCCCCACT

“Sparkling Punch” PnMV-R

CGAGGAGCGGAAGTTGGTAGTTTGTGGTAGGATCCGTGAAGGCTCCTGA
GGAGGCATGGGCTGCGTGCCTTGGAGTAGATGGCGAACGCGAGCAGG
GGAAGAGAGAGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGACATGAATTTGAAT
CGCTCAGCGGCCCTGTGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTG
GAAGTGTGTGTATAACTAAAACAGCCTGGAGGAGGCCTTTATGGAGTTT
GACGTGCTCGTCCAGATTCCGGAACCGAGGTCACTAGGCAAAGACCTG
GAGGTGGCAGATCTCCGACGGAAGTACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAGG
AAGGTGGTATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAACATTTAGCTCAGCGG
CCACTGTTTGCAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCA
GGAATAGGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCAGTGAGGAGAGAAAAGTG
CTGGAGATTATCCCAGGCGGAGGACGTGACCCAGGCGTGCTCTGGCTTA
TTGGACTGTGTGCGAACGAAGCCGACTGGATCGGAGACGCGCAGAGTC
CGAACGGCTCGAGTGTAAGTAAACAGAGCGTTGTACACGGATTGAGGCA
CTAGGCGATGACGGGTGGGTTGACGAATGCTGGTGGCCTCACGGAGAA
GAACGCGGCGGGGGCAAAAAAATCGGAAACCTGAACCAAATTCCTTTGA
ACAACCTTGGGCTGGTTGGTTAGGCCCCCGTTGGGAATCAAAAAGCGAA
GTGGACCCGGGGCCCCCAAGAATTCCAAGCCCTGGGTGAACGGGTAA
AGGGAAGAAAGGAAGGGGCCCTTGGGAATGGGTGGGAAAAGGCTCCG
AAGCCCAGAAGAAAAAACCGGCGGGGCAGAGGGAAAAAATGGTTGAAC

GGTATATAATGGAAGGGGGGCCCTCTCCCCCGATTTTGTCCCCCCTGGGG
CCCCGGTTCCTTGGCTCCCTGCGCTTGA

“Ice Punch” PnMV-F

CCCAATTCTGACTAGCCCACCCGTCATCGCCTAGTGCCTCAATCCCGTGT
ACAACGCTCTGTTCACTTACACTCGAGCCGTTCCGACTCTGCGCATCTCC
GATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAGCCAGAGTACGCCT
GGGTCACGTCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCAC
CGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGGC
AGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTCA
GCCATCTTCGCTTCTCCATCACCGCCTTCTCTTCTCTCTCTCTTTCCAG
TACCTCCGTCGGAAATCTGCTACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCAACCTCGG
TTTCCGGAATCTGGACGAGCACATCAAGCTCCATAAAGGCCTCCTCCAG
GCCGGTTTTAGTTACACGCACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGAG
ATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCGTT
CGTTCCATCTCCCTCTCTCTTCCCCTGCTTGCGTTCGCCATCTACTCCAA
GTGCACGCAGCCCATGCCCCCCCAGAGCCTTCACGATTCTACCACAAC
TATCATCATCCGAGCAAGTGGGTCTTGGATGATCCCCGCCCCCAAAAA
AAAAAAAACAAACCCCCCAACTTGGGGTAAGGCCGGGTAGGGGAGGGA
AGGGAGGGGAGAGGTGAGGGGGGGGCCTAGGCC

“Ice Punch” PnMV-R

CCGGATTGCCCCGCCCCAGATAGTTGTGGTAGGATCGTGAAGGCTCTGGG
GGGGCATGGGCTGCGTGCACTATGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAGG
GGAAGAGAGAGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGACATGAATTTGAAT
CGCTCAGCGGCCCTGTGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGG
GAAGTGTGCGTGTAACATAAACCGGCCTGGAGGAGGCCTTTATGGAGCT
TGATGTGCTCGTCCAGATTCCGGAAACCGAGGTTGCTAGGCAAAGACCT
AGAGGTAGCAGATTTCCGACGGAGGTACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAG
GAAGGCGGTGATGGAGGAAGCGAAGATGGCTGAAGATTTCAACTCAGCG
GCCACTGTTTGCAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCC
AGGAATAGGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCGGTGAGGAGAGAAAAGT
GCTGGAGATTGTCCCAGGCGGAGGACGTGACCCAGGCGTACTCTGGCT
TGTTGGACTIONGTGCGAACGAAGCCGACTGGATCGGAGATGCGCAGAGT
CCGAACGGCTCGAGTGTAAGTGAACAGAGCGTTGTACACGGATTGAGGC
ACTAGGCGATGACGGGTGGGTTGGCGAATGCTGGTGGCCTCGGGGAGA
AAACCGCCGGGGGGCAAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGGGC

“Marblestar” PnMV-F

GAATTCTTGCAATTTCTGTCTCTCCCGTCATCGTCTAGTGCCTCAGTCCGT
GTACAACGCTCTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTCCGACTCTGCGCATCT
CCGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAACAGAGCACGC
CTGGGTTACGTCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCA
CCGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGG

CAGCGCTTTATCTCTCGCCTACAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTC
AGCCATCTTCACGTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCTCCTTTTCCA
GTA CTTCGTCGGAATCTGCTACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCGACCTCG
GATTCCGGAATCTGGACGAGCACGTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCG
GGCTGGTTTTAGTTACACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGA
GATTTCTACCATAGGGCCGCTGAGCGATTCAAACATCTCCGCCCTCGT
TCGTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCCCTGCTTGC GTTCGCCATCTACTCCA
AGTGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCCTACCACAA
TTACCATCATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGGAGCCCCGGGGCTCAA
GAAGCGCAGGAACCAACCGCCA

“Marblestar” PnMV-R

TCCAGATGCAGAACCGTGATATTGTGCGTAGGAATCATGAAGGCTCTGA
GGGGGCATGGGCTGCGTGCACTTGGAGTAGATGGCGAACACAAGCAGG
GGGAGAGAGAGGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGAGATGAATTTGAAT
CGCTCAGCGGCCCTATGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTTGG
GAAGTGTGTGTGTA ACTAAAACAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCT
TGACGTGCTCGTCCAGATTCCGGAATCCGAGGTCGCTAGGCAAAGACCT
AGAGGTAGCAGATTTCCGACGGA ACTACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAGG
AAGGTGGTGATGGAGGACGTGAAGATGGCTGAAAATTTCAACTCAGCGG
CCACTGTTTGTAGGCGAGAGATAAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCA
GGAATACGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCCGTGAGGATACAAAAGTGC
TGGAGATTGTCCCAGGCTTGAGAGACGTAAGCCCAGGTCGTGCGTCTGC
GTTTGTCTGGCACTCGTGCTGCCGAACCGAATCCCGTACTTGCCATCTG
CTACTATCGCCGCTAGCAGATGCCGTGTACGGCGCCTTCGTAAGCTGCT
CAAAGTTAGACACCAGGCAGGCCGCTCTGTTGACCCCCCGCGTACTATG
GAAGGCGCCTATCCTAACGGA ACTGTACTCGTAACCGCGAGCTTGAGTT
GTATTCGCAACTGCAAAATTCGCCCATAGGGCCTAGAGGATTGGGTGCC
GTTCCGCTTTAAGGGAGAAAGTAAGAAGCAAGGGTACCGGTTCCCCGGC
CGGGGCGGCCCCGTGGCCCAAAAAATAAAGGTAGAACCCAAAACCCCC
GGGCAAAAAACCCCAACAAAAAACACCA

“Cortez Electric Fire” PnMV-F

ACAAAAGATGGAATAGCCCACCCGTCATCCGCCTAGTGCCTCAATCCCG
TGTACAACGCACTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTCCGACTCTGCGCATC
TCCGATCCAGTCGGCTTCGTTGCGACACAGTCCAACAAGCCAGAGCACG
CCTGGGTCACGTCCTCTGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTC
ACTGCCTCTAACCGTCCTTCCA ACTCCTATTCTCTGGAATGGCAGCCTCTG
GCAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCT
TCAGCCATCTTCACTTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCTCCTTTTC
CAGTACTTCCGTCGGAATCTGCCACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCAACCT
CGGTTTCCGGAGTTTGGACGAGCACGTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTC
CAGGCTGGTTTCAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTC
GAGATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCT
CGTTCGTTCCATCTCCTTCTCTCTCCCCCTCCTTGC GTTCGCCATTTACTC

CAAGTGCACGCAGCCCATGCCTCCTCAGAGCCTTCACGATTCTACCAC
AACTACCATCATCCAAGCAAGTGGGTCCTTGGATGACCCCCGCCCCCGA
AAAAAAAAAAGGGCAAGAGAGGGGGGGGAGGGGAAAAC

“Cortez Electric Fire” PnMV-R

GGGGAAGCGGAAGGAGGTAGTTGTGGTAGGATCGTGAAGGCTCTGAGG
AGGCATGGGCTGCGTGCACTATGGAGTAAATGGCGAACGCAAGGAGGG
GGAGAGAGAAGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGACATGAATTTGAATC
GCTCAGCGGCCCTGTGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGGG
AAGTGTGTGTATAACTGAAACCAGCCTGGAGGAGGCCTTCATGGAGCTT
GACGTGCTCGTCCAACTCCGGAACCGAGGTTGCTAGGCAAAGACCTA
GAGGTGGCAGATTTCCGACGGAAGTACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAGG
AAGGTGGTGATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAAGATTTCAACTCAGCGG
CCACTGTTTGCAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCA
GGAATAGGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCAGTGAGGAGAGAAAAGTG
CTGGAGATTGTCCCAGGCAGAGGACGTGACCCAGGCGTGCTCTGGCTT
GTTGGACTGTGTGCGAACGAAGCCGACTGGATCGGAGATGCGCAGAGT
CCGAACGGCTCGAGTGTAAGTAAACAGTGCGTTGTACACGGATTGAGGC
ACTAGGCGATGACGGGTGGGTTGACGAATGCTGGTGGCCTCGGGGAGA
AGAACGCGCGCGGGGCAAAAAAAGGGGGGGGAAGGGGAAGTGGGGG

“Carousel Dark Red” PnMV-F

TCCAAAAGAAAACGAGCCCACCCGTCATCGTCTAGTGCCTCAGTCCGTG
TACAACGCTCTGTTTACTTACACTCGAGCCGTTCCGACTCTGCGCATCTC
CGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAACCGGAGCATGCC
TGGGTTACGTCCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCAC
TGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGGC
AGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTCA
GCCATCTTCACTTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCTTTTCCAG
TACCTCCGTGCGGAAGTCTGCCACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCGACCTCG
GATTCCGGAATCTGGACGAGCACGTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCG
GGCTGGTTTTAGTTACACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGA
GATTTCTATCATAGGGCCGCTGAGCGATTTAAATTCATCTCCGCCCTCGT
TCGTTCCATTTCCCTCTCTCTCCCCCTGCTTGCGTTGCGCATCTACTCCA
AGTGCACCCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTACCACA
ATTACCATCATCCGAGCAAGTGGGTCCTTGGATGGAGCGCCCGGGCTCA
CAAAAA

“Carousel Dark Red” PnMV-R

ACTCGGCAAGAGCAGTGAAAATTGTGGTAGGAATCATGTAAGGCTCTGA
GGGGGCATGGGCTGGGTGCACTATGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAG
GGGGAGAGAGAGGGGAAATGGAACGAACGAGGGCGGAGATGAATTTAAA
TCGCTCAGCGGCCCTATGATAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGG
GAAGTGTGTGTGTAATAAACCAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCT

TGACGTGCTCGTCCAGATTCCGGAATCCGAGGTCGCTAGGCAAAGACCT
AGAGGTGGCAGACTTCCGACGGAGGTACTGGAAAAGAAGAGAGAAGAG
GAAGGTGGTGATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAAGATTTCAACTCAGCG
GCCACTGTTTGCAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCC
AGGAATAGGAGTTGGAAGGACGGTTAGAGGCAGTGAGGAGAGAAAAAGT
GCTGGAGATTGTCCCAGGCGGAGGACGTAACCCAGGCGTGCTCCGGTT
TGTTGGACTGTGTGCGAACGAAGCCGACTGGATCGGAGATGCGCAGAGT
CCGAACGGCTCGAGTGTAAGTAGACAGAGCGTTGTACACGGATTGAGGC
ACTACACGATGACGGGTGGGTGTGCGAATGCTGGTGGCCTCGGCCGAG
AAAAACAGCGGCCGCCCCCAAAAAATGGTGGGTTGTG

“Primer White” PnMV-F

GAAAGTCCAGTGCTCTGCCACCGTCATCGCCTAGTGCCTCAATCCGTGT
ACAATGCACTGTTTACCTACACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCATCTCC
GATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAGCCAGAGCACGCCT
GGGTCACGTCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCACT
GCCTCCAACCGTCTTCCAACCTCTATTCTTGAATGGCAGCCTCTGGC
AGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGTCGCTGAGCTGAAGTCTTC
AGCCATCTTCACTTCTCTCCATCACCACTTCTCTTCTCTCTCTTTTCCA
GTACTTCCGTCGGAAATCTGCCACCTCCAGGTCTTTCCTAGCAACCTCG
GTTTCCGGAGTTTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGGTCTCCTCCA
GGCTGGTTTTAGTTATACACACACTTCCCAAACCCGCCAGGGGGCCTCGA
GATTTCTACCATAGGGCTGCTGAGCGATTCAAATTCATGTCCGCCCTCGT
TCGTTCCATCTCCTTCTCTCTCCCCCTGCTCGCGTTTCGCCATTTACTCCA
AGTGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTTACCACAA
TTACCATCATCCGAGTAAGTGGGTCTTGGATGGATCCCCCGGGCTCAA
AAAAGGGGGTTTGTTCGCTCTGGGGGGGGTCTTTCTC

“Primer White” PnMV-R

CGGGAGTGGTGAGAGAAGGAATACGGCGTCTGCGCACAAGCGAACCGC
CCACGTGCGCTCGATCCGCAACACTTCGCCGGTACCATTCAATCGGCTA
GGAGCGACGGGAGAGTGTGTACTAAGGGCAGGGACGTAGTCCACGCGA
TCTGATCACTCACGCTTACTATGGAATTCCATCGAAGAACGGCTGCTGGC
ACAGGGAAGTGTGTGTATAACTAAAACCAGCCTGGAGGAGACCTTCATG
GAGCTTGATGTGCTCGTCCAAACTCCGCGAAACCGGAGGTTGCTAGGCA
AAGACCTGGAGGTGGCAGATTTCCGACGGACGTACTGGAAAAGGAGAGA
GAAGAGGAAGGTGGTGATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAAGACTTCCA
GGTCATTTCGACCTCTGTTTGCCGGCTTCAGATGTATCGCTGACCAAGGCT
GCCTTTCCAAGAGTATCATTGTTGGGCTGATTTTTGTTGTCCGCGAGCTTAC
AAAACCTCTCGAGGTTCTCCCAGATTTCAACACTAGGCCCGCTGATGCGA
CTGACATGCAGGACTCGCCCTCGATCGATCCCTATCCCATCTCTATACCC
CTGCACGCCTTCCCCATCTTACTCCAAGTGCACACAGCCCTTGCCCCC
CATAGCCCTCTACGATTCCGACCACAGTTTACCATCCATCCCAGGAGGTG
GGTCCTATGAATGAAGTCCCCGGCTCCAAAAAACTTTGTGCTCTTTTG
AGTC

“Monet Early” PnMV-F

TAACCGACCTGCAGATGCCTACCCGTCATCGTCTAGTGCCTCAATCCGT
GTACAACGCTCTGTTCACTTACACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCATCT
CCGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAACCAGAGCACGC
CTGGGTTACGTCCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCCCTCCTCA
CTGCCTCCAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTCTGG
CAGCGCTTTATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTC
AGCCATCTTCACTTCCTCCATCACCACCTTCCTCTTCTCTCCTTTTCCA
GTATTTCCGTCGGGAATCTGCCACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCGACCTCG
GATTCCGGAATCTGGACGAGCACGTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCG
GGCTGGCTTTAGTTATACACACACTTCTCAAACCCGCCAAGGGCCTCGA
GATTTCTACCATAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTTATCTCCGCCCTCGT
TCGTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCTCTGCTTGCCTTCGCCATCTACTCCA
AGTGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTACCACAA
TTACCATCATCCAAGCAAGTGGGTCTTGGATGATCCCCGCCGGCAAAA
AAAAAGGGCCCCCCCCCCCCCTCTCTTTCC

“Monet Early” PnMV-F

TACCCACAAATAACATTGAGTATTGTGGTAGGAATCGTGAAGGCTCTGAG
GGGGCATGGGCTGCGTGCACTTGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAGAG
GGAGAGAGAGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGAGATAAATTTGAATC
GCTCAGCGGCCCTATGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGAGA
AGTGTGTGTATAACTAAAGCCAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCTTG
ACGTGCTCGTCCAGATTCCGGAATCCGAGGTCTGCTAGGCAAAGACCTAG
AGGTGGCAGATTCCCGACGGAAATACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAGGAA
GGTGGTGATGGAGGAAGTGAAGATGGCTGAAGATTTCAACTCAGCGGCC
ACTGTTTGCAGGCGAGAGATAAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCAGG
AATAGGAGTTGGAAGGACGGTTGGAGGCAGTGAGGAGGGAAAAGTGCT
GGAGATTGTCCCAGGCGGAGGACATAACCCAGGCGTGCTCTGGTTTGT
GGACTGTGTGCGAACGAAGCCGACTGGATCGGAGATGCGCAGAGTCCG
AACGGCTCCAGTGTAAGTGAACAGAGCGTTGTACCCCGATTGAGGCACT
AGACGATGACCGGTGGGTGACGAATGCTGGTGGCCTCGGCAATAAAAA
AGCGCCGGGGGGGAAAACAATAATAAATTCAATTAACAAAAGTG

“Polar Bear” PnMV-F

ACTCTTTTCTTGTGCGGCCTACCCGGTCATCGCCTAGTGCCTCATTCCGTG
TACAACGCTCTGTTCACTTATACTCGAGCCGTTTCGGACTCTGCGCATCTC
CGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAGCCAGAGTACGCC
TGGGTCACGTCCTCCGCCTGGGACAACCTCCAGCACTTTTCTCTCCTCA
CCGCCTCTAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCCTGGAATGGCAGCCTCTGG
CAGCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTC
AGCCATCTTCGCTTCCTCCATCACC GCCTTCCTCTTCTCTCCTTTTCCA
GTACCTCCGTCGAAAATCTGCTACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCAACCTCG

GTTTCCGGAATCTGGACGAGCACATCAAGCTCCATAAAGGCCTCCTCCA
GGCCGTTTTAGTTACACACACACTTCCCAAACCCGCCAAGGGCCTCGA
GATTTCTACCACAGGGCCGCTGAGCGATTAAATTCATGTCCGCCCTCGT
TCGTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCCCTGCTTGCGTTCGCCATCTACTCCA
AGTGCACGCAGCCCATGCCCCCCCCAAAGCCTTCACGATTCCTACCACAA
CTACCATCATCCGAGCAAGTGGGTCCTTGGATGGATCCCCCGGGGCTCA
AAAAAAAAAGAGGAAGAACAACC

“Polar Bear” PnMV-R

TTTTCCGGCGCGCGGGCGGGGGCCGGCGAGGGTTGTTTTGGTGGGTTCG
GGAAATCGGTTGGAAGGTCTCTTGCAAGGGGGGACTTGTGGCTTGC GTTG
CACTATGGTAGTACATGTCTGAACGCAAGCAACGGGGAGAGAGAGGGGAG
ATGGAACGAACGAGGGCGGACATGAATTTGAATCGCTCACCGGCCCTGT
GGTAAAAGTCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGGGAAGTGTGTGTGTA ACT
AAAACCGGCCTGGAGGAGGCCTTTATGGAGCTTGATGTGCTCGTCCAGA
TTCCGGAAACCGTAGCGTTGCTAGGTCAAACGACCTAGAAGGTAGCAAT
ATCTTTCGTA CTGGTAGCGTTACTGTGTATAAGATGGTAGAAGTATGTAC
AGCAGTGCATATGTGTCTGGTGGTCGTACTGGGGTATGTCTGTAGAAGGCC
GATATACGGGATGGTGGCCATTTGTGAGAAGGGGAATTCTTATTCCCCAA
TAAAGCTTTACA ACTTGATCCGGGGGAGGGGGCCCCCGGCTCAAACCCCG
CCTTTTTTCGGGGAATTTTTTTTTCTTTTTTTGGGGGTCCCCCAAAGGG
GGAAGGGGTTTCCCCGGGGGGTTAAAAAAGGGGGAAAAAATTGGGCCA
AAAATTTTTTCGGGCCCAAAGGAAAAGGGGGGGCCCCCCTTGGGGCCCC
CCCAAATTTTAAGGGGCCCCCTCCCCCAAAAATGGGGGGAAAAAAGGG
GGGGGGGGGGCCCCCCTTTTTTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TTTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCGAAAAACGGGGGGGGGGGGGGAAAAAAA
AAATTTTTTAAAAATGGGGGGCGGGGGAAAAAAAAGGGGGGGTTTTTTTT
TTTGGGGGGGGGGGGGGAAAAAAAAGGGGGGCGGGGGGAAAAAAA
CCCCCGGGGGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTAAAAAAGGGGGAAAAAAA
GGGGGGGGGGGAACCCCTTGGGGGGGGGGTTTTTTTTGGGGGAAAAAAA
AGGGGGGGGGGGGATAAAAGGGGCAAAAAAAGGGGGCTAAAAAAA
AAAAAAAAGGGGGTTTTTTTTGGGGGCCCCCTTTTTTTGGGGGGG
GGGGGGGAAAAAAGGGGGAAAGGGTTTTTTTTTTTTTTGGGGGGGTTTT
TTCCCCCCCCCCCCCCCCCAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GTGGGGGTAAAAAAGGGGGGGGGGGAAAAAATCCCCGGGGGTTTTT
TGGGGGGAAAAAACCCCCCGCCCCCCCCCAAAAAGGGGGGGGGGGG
CCCCCGGGGGGTTTTTGGGAAACCCCTTTTTCCCCCTTTTTGGG
GGGGGGGGGTTCCCCCTTTTTTTTTTTTGGGGGTTTTTTTTTTTTTTGGGG
GGGGGGGGAAAAAAGCCCCCTTTTTTGGGGGTTTTTTTTTGGGGGCTTTTT
GGGGGCCCCCCCGGGGGGGGAAAAAAAACCCCCCGGGGAAAAAAA
AAAAAGGGGGCCCCCCCCCCCCCGGGGAAAAAACCCTTTTTTGGG
GGGGGGGGGAAAAAATTTTTCCCCCAAGGGGGGGGGGAAAAAAGG
GAAAAAATTTTTTGGGGCCCCCCCCGGGGCCCCCCCCAAAAAGGGGG
AAAAAAGGGGGTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCGGGGAAAAAAAACCG
CCCCGGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCTTTTTCCCCCCCCGGGGAAAAAACGG
GTTTTTGGGAAATTTTCAAAAACAAAAAGGGTTTTTTTTGGGGGGAAAAAAA

AACCCCCCAAAAAGGGGGGAAAAAAAGGGGGCCCCCCCCGGGGGTTTTT
CTTTTTTGGGGGGTTTTTTTAAAAAGCCCCCAAAAACCCCCCGGGCGGG
GGCCCAAAAATTTTTTTTTTTTTTGGGGGAAAAAAGGGGGGGGGGGGCC
CCCCCAAACCCCCTTTTTTTAAAAAGGGGGGGGGGGGTTCCCCGGGGG
GAAAAACTTTTTGGGGAAAAAAACCCCCCGGGGGGGGGGGGGGGGCTT
TTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGTTTTTCTTTTGGGGGGGAAAAACCCCCG
GGGAAAAAATAATTTTTGGGGGGACCCCCATTTTGGGGGGGGGGGATT
TTGGGGGAGGGGGCCCCCCCCCTTTTCCCCCGGGTTGGGGGGAGG
ACCGGTCCAAAAGGGGGAAAAAAGGGGGAAAAAACCACGAG
GGGGGGACCCCCGGGGGGGGGGCCCCCTATGGGGTGGGGGGGGGGGGC
CCCCAAAAAACCCCAAAAGAAAAAATAACCAACCAATTAACC
CTTTAAAAATTTCTTTTCCCCAATTCCCAACCTTTAAAAACTTTCCCTTAA
CACACCCCCCCCCCCCCATCAACAAAAAATAACCCCTTCCCCCAAAA
CCCCCCCACCCCCTAAAAACACACAAAAAATAACAAAA

“Primer Red Glitter” PnMV-F

TACGCGGTAATGAACAGTAGATATCGTCGCTGGCTCAGCCTGACTGGAT
GGAGTCGCCGGGTAAGTTACACTCTAACCGTTCGGACTCTGCGCATCTC
CGATCCAGTCGGCTTCGTTTCGCACACAGTCCAACAAACCAGAGCACGCC
TGGGTTACGTCCTCCGCCTGGGACAATCTCCAGCACTTTTCCCTCCTCAC
TGCCTCCAACCGTCCTTCCAACCTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGGC
AGCGCTTTATCTCTCGCCTGCAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTCA
GCCATCTTCACTTCCCTCCATCACACCTTCTCTCTCTCCTTTTCCAG
TATTTCCGTCGGGAATCTGCCACCTCTAGGTCTTTGCCTAGCGACCTCGG
ATTCCGGAATCTGGACGAGCACGTCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCGG
GCTGGCTTTAGTTATACACACACTTCTCAAACCCGCCAAGGGCCTCGAGA
TTTCTACCATAGGGCCGCTGAGCGATTCAAATTTATCTCCGCCCTCGTTC
GTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCTCTGCTTGCCTTCGCCATCTACTCCAAG
TGCACGCAGCCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTACCAATA
CCATCATCCAAGCAAGTGGGTCCTTGGATGGAGTGCCCGGGCTCAAAA
AAAAACACCCCTTTTAAATAA

“Primer Red Glitter” PnMV-R

TTGGGATACAAGGGGGGTATTGTGGTCGGAGTAATACTGGCTCTGAGGC
GGCTGCACTGCATGCCTTGGAGTAGATGGCGAACGCAAGCAGAGGGAG
AGAGAGGGAGATGGAACGAACGAGGGCGGAGATAAATTTGAATCGCTCA
GCGGCCCTATGGTAGAAATCTCGAGGCCCTTGGCGGGTTTGAGAAGTGT
GTGTATAACTAAAGCCAGCCCGGAGGAGGCCTTCATGGAGCTTGACGTG
CTCGTCCAGATTCCGGAATCCGAGGTCTGCTAGGCAAAGACCTAGAGGTG
GCAGATTCCCGACGGAAATACTGGAAAAGGAGAGAGAAGAGGAAGGTG
GTGATGGAGGAAGTGAAGATGGGTGAACATTTCAAGACAAAGGCCACTG
TTTGCAGGCGAGAGATAAAGCGCTGCCATAGGCTGCCATTCCAGGAATA
TGAGTTGGAAGGACGGTTGGACGCACTGAGGATGGAAAAGTCTGGAGA
TTGTCCCAGGCGGAGGACGTTCCCCAAGCATGCTCTC

“Winter Rose Early Red” PnMV-F

TAGGGACATGTAGAGCTTTTCCTGACTCTCCAGTGGCCTATTCATGGTTG
GAGTCGAGAGCACAAAGACTTTCCAGAGGTTTCGGACTCTGCGCATCTCCC
ATACTTTTCGGCTTCGTTTCGCACGCAGTCCGACACGCCAAAGCACGACTG
GGTCACTTGCACGGCCTGGGAGAATCAACAGCACTTTTCTCTCCTCACC
GCCTCCAACCGTCCTTCTAACTCCTATTCTGGAATGGCAGCCTCTGGCA
GCGCTTCATCTCTCGCCTGCAAACAGTGGCCGCTGAGTTGAAATCTTCA
GCCATCTTCACTTCTCCATCACCACCTTTCTATTTTCTCTTCTTTTCCAGT
ATTTCCGCCGAAAATCTGCAGCCTCTAGGTCTTTGCCTAGCAACCTCGGT
TTCCGGAGTCTGGACGAGCACATCAAGCTCCATGAAGGCCTCCTCCAAG
CTGGTTTTACTTATACACACACTTCCCAAACCCGTCAAGGGCCTCGAGAT
TTCTACCACAGGGCCGCTGAACGGTTCAAATTCATGTCCGCCCTCGTTC
GTTCCATCTCCCTCTCTCTCCCCTTGCTTGCGTTCGCTATCTACTCCAAG
TGCACGCAACCCATGCCCCCTCAGAGCCTTCACGATTCTATCACAATA
CCATCATCCAAGCAAGTGGGTCTTGATGATCCCCCGGGCCTCAAAAA
AAAGGGGAGAAAAAAGAAAA

“Winter Rose Early Red” PnMV-R

TAGTATTTTAGCACAGCGTGTTGTGCTACTTCTCATTTAGGCTCCTCATAT
TGATGGGTTGTTTCGATTGCCGTACATTCTGGCTTTTCTGAGGGATGTCC
CTGGGCGGGGCTGGCCTAGGGCGAGAATGAATGTTAGCCTTTCAGCGG
CCCTGTGGAAACGGCTCCAGGCCCAAGAAGGGGTTGAGTTCCGTGAGTA
GAAGTATGCCCCGGCTTGATGAGGCCTTCCCGTCATAATAGTCGGTTGT
GTCAGCCGCAGAGATGATCCCAAAGTGGGGCCACCATAAGCCCCTGGAT
GGATCGCCGGCTCAATGAAGAAAAGGAGAAAATATCAAAGGTGAGTGAT
GGGCTGAAACAAAGATGGCTGAAGATTTCAACTCAACGGCCACTGTTTG
CAGGCGAGAGATGAAGCGCTGCCAGAGGCTGCCATTCCAGGAATAGGA
GTTAGAAGGACGGTTGGAGGCGGTGAGGAGAGAAAAAGTGCTGGAGATT
GTCCCAGGCGGAGGACGTGACCCAGGCGTGCTCTGGCTTGTTGGACTG
TGTGCGAACGAAGCCGACTAGATCGGAGATGCGCAGAGTCCGAACCGC
TCGAGTGTAGGTGAACAGAGCGTTGTACACGATTGAGGCACCAGGCGA
TGACGGGTGGGGTTGACGGATACTGGTGGGCCTCGGGGAGAAGGAGCG
GTGCGGGGCAACAAAAA