UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

P R E S E N T A:

M. EN C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

CODIRECTOR
Dr. NELSON AVONCE VERGARA

Cuernavaca, Morelos, septiembre de 2024

DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Tesis realizada por **María de los Ángeles García Chávez** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

Director de Tesis: _____
Dr. Edgar Martínez Fernández

Co Director: _____
Dr. Nelson Avonce Vergara

Revisor: _____
Dr. Víctor López Martínez

Revisor: _____
Dr. Porfirio Juárez López

Revisor: _____
Dr. Irán Alia Tejacal

Revisor: _____
Dra. María Claudia Rueda Barrientos

Revisor: _____
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Revisor: _____
Dr. Guadalupe Peña Chora

Cuernavaca, Morelos, septiembre de 2024.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para el desarrollo del programa doctoral.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Morelos por el financiamiento otorgado mediante los fondos de la Convocatoria para el Financiamiento de Proyectos de Investigación en Ciencia de Frontera 2022.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias, y a todo el personal administrativo por el apoyo brindado durante mis estudios de Posgrado.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Dinámica Celular por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Nelson por darme la oportunidad de incursionar en el ámbito de la biología molecular, aun sabiendo que no era mi formación, gracias por la confianza, consejos y todos los conocimientos que me aporto tanto en la vida personal como profesional.

Al Dr. Edgar por aceptar ser mi director de tesis y orientarme durante todo este trayecto, por el tiempo dedicado a cada una de las reuniones y seminarios realizados, así como en la revisión de la tesis.

Al Dr. Víctor por su asesoramiento sobre todo en el tema de trips, por ser parte de mi comité y por todos los consejos para mejor el trabajo.

Al Dr. Irán por facilitarme el material vegetal de nochebuena que en su momento se requirió, así como ser parte de mi comité y por todas las recomendaciones en pro de mejoras.

Al resto de mi comité: Dr. Porfirio, Dra. Claudia, Dr. Guadalupe, Dr. Oscar, por darse el tiempo de asistir a las reuniones y seminarios que se requerían, así como la revisión de la tesis, gracias por sus comentarios y sus recomendaciones.

Al Ing. Luis Granada por facilitarme el traslado y acceso a Jardines de México para poder realizar los muestreos de plantas y trips.

Al Ing. Federico Martínez y al Ing. Abelardo Maya por permitirme ingresar a las instalaciones de Plántulas de Tetela y realizar los muestreos de plantas y trips.

Al M. Alexander Arrieta por el apoyo en la identificación morfológica de las especies de trips, y al Dr. Héctor González por facilitarme el traslado de los montajes hasta Costa Rica.

Al Dr. Dante Vladimir Galindo por permitir muestrear sus nochebuenas de sol.

A mis amigos de Cuernavaca que hicieron más amena mi estancia cuando llegue a esta ciudad.

Dedicatorias

A mi mamá por todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindo.

A mis hermanos, y tía porque a pesar de la distancia siempre estuvieron para apoyarme en lo que necesitaba.

Índice

Índice de cuadros……...VII
Índice de figuras……VIII
1. Introducción general 1
1.1 Horticultura ornamental 1
1.2 Virus en plantas ornamentales: *Tospovirus* 3
1.3 Trips: vectores de virus 7
1.4 Medidas de manejo y control de trips y virus en invernaderos 11
1.5 Técnicas moleculares para detección de patógenos 13
2. Justificación, objetivos e hipótesis 23
2.1 Justificación 23
2.2 Objetivos 24
2.2.1 Objetivo general 24
2.2.2 Objetivos específicos 24
2.3 Hipótesis 24
3. Presencia del trips de las flores *Frankliniella schultzei* en plantas ornamentales de Morelos 25
3.1 Resumen 25
3.2 Abstract 25
3.3 Introducción 26
3.4 Materiales y métodos 27
3.5 Resultados y discusión 28
3.6 Conclusiones 29
3.7 Referencias 30
4. Detección del Virus de la Mancha Necrótica de Impatiens (INSV) en trips y plantas ornamentales mediante RT-LAMP 32
4.1 Resumen 32
4.2 Abstract 32
4.3 Introducción 33
4.4 Materiales y métodos 35

4.5 Resultados 39
4.6 Discusión 43
4.7 Conclusiones 45
4.8 Referencias 47
5. RT-LAMP y RT-PCR para detectar TSWV en plantas ornamentales y trips 50
5.1 Resumen 50
5.2 Abstract 50
5.3 Introducción 51
5.4 Materiales y métodos 54
5.5 Resultados 58
5.6 Discusión 64
5.7 Conclusiones 66
5.8 Perspectivas 67
5.9 Referencias 68
6. Primer reporte de PnMV en *Catharanthus roseus* 71
6.1 Resumen 71
6.2 Abstract 71
6.3 Introducción 72
6.4 Materiales y métodos 74
6.5 Resultados 78
6.6 Discusión 84
6.7 Conclusiones 86
6.8 Perspectivas 86
6.9 Referencias 88
7. Anexos 90
7.1 Publicaciones 90

Índice de cuadros

Cuadro 1.1 Especies de *Tospovirus* reconocidas y sus vectores..... 6
Cuadro 1.2 Duración de los estadios de desarrollo de *Frankliniella occidentalis* a una temperatura de 25-30 °C. 9
Cuadro 1.3. Comparación de técnicas PCR y LAMP. 18
Cuadro 4.1. Oligonucleótidos específicos para identificación de INSV 39
Cuadro 5.1. Comparación de las técnicas ELISA, PCR y LAMP..... 53

Índice de figuras

Figura 1.1. Porcentaje de flores de corte y plantas en maceta con mayor demanda en México. 2
Figura 1.2. Estructura y organización del genoma de Tospovirus 5
Figura 1.3. Ciclo de vida general de los trips. 8
Figura 1.4. Vía de diseminación de Tospovirus en trips 11
Figura 1.5. Principio general de PCR. 14
Figura 1.6. Principio general de LAMP. 16
Figura 3.1. Vista dorsal de Frankliniella schultzei (hembra). 28
Figura 3.2. Sedas: ioIII: interocelares III, poIV: posoculares IV, am: anteromarginales, I-III: segmentos antenales I-III; VII-IX: tergitos VII-IX; flecha individual: pedicelo; flecha doble: dientes laterales del peine escasamente notorious. 29
Figura 4.1. Plantas muestreadas. 36
Figura 4.2. Identificación de INSV en plantas y trips mediante RT-PCR. 39
Figura 4.3. Identificación de INSV mediante RT-LAMP 41
Figura 4.4. Visualización de reacción RT-LAMP. 42
Figura 4.5. Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP. 43
Figura 5.1. Estructura general de TSWV y descripción general de la infección en trips y plantas. 52
Figura 5.2. Detección de TSWV en plantas y trips mediante RT-PCR 58
Figura 5.3. Síntomas de plantas positivas a TSWV. 59
Figura 5.4. Síntomas de plantas negativas a TSWV. 59
Figura 5.5. Detección de TSWV en plantas y trips mediante fluorescencia por RT-LAMP. 60
Figura 5.6. Visualización de fluorescencia por RT-LAMP bajo luz UV. 60
Figura 5.7. Detección de TSWV mediante RT-LAMP colorimétrico. 62
Figura 5.8. Sensibilidad de RT-PCR. 63
Figura 5.9. Sensibilidad de RT-LAMP. 63
Figura 5.10. Identificación molecular de especies de trips. 64
Figura 6.1. Plantas de vinca con y sin síntomas. 74

Figura 6.2. Hojas de nochebuena con síntomas de virosis. 75
Figura 6.3. Proceso de inoculación de vinca con PnMV. 77
Figura 6.4. Detección de PnMV en vinca mediante RT-PCR 78
Figura 6.5. Detección de PnMV en nochebuena comercial mediante RT-PCR 79
Figura 6.6. Detección de PnMV en nochebuena de sol mediante RT-PCR 79
Figura 6.7. Detección de PnMV mediante RT-LAMP a 60 y 65 °C..... 80
Figura 6.8. Detección de PnMV mediante RT-LAMP a 63 y 58 °C..... 81
Figura 6.9. Detección de PnMV en plantas de vinca inoculadas..... 82
Figura 6.10. Cicatrización de lesiones producidas a hojas inoculadas con PnMV 83

1. Introducción general

Las plantas ornamentales tienen un papel muy especial en nuestra cultura y algunas de ellas son símbolo de identidad nacional. Su aspecto físico es la característica principal que se considera al adquirirlas, y para conseguirlo es necesario evitar la presencia de plagas y enfermedades que las dañen, el monitoreo y diagnóstico, entre otros, son herramientas que ayudan a lograrlo.

1.1 Horticultura ornamental

Las plantas ornamentales son aquellas que se cultivan exclusivamente para la decoración de ambientes interiores y exteriores, en este tipo de plantas se encuentran las flores de corte, arbustos ornamentales, árboles, pastos y bambúes, así como plantas acuáticas (Chen, 2021). Las principales regiones productoras de plantas de ornato del mundo se clasifican como: Asia-Pacífico, Europa, Centro-Suramérica, América del Norte, África, y Oriente Medio, donde destaca la región de Asia-Pacífico con una producción de 580,000 ha anuales, mientras que en la región Centro-Suramérica tiene un área de producción de 55,000 ha, representando el 11% de la producción mundial de plantas ornamentales, siendo México, Colombia, Ecuador, y Brasil los principales países productores de esta región (Yeler, 2022). El valor de las plantas ornamentales depende de su apariencia estética, incluido el color y forma de las flores y/o las hojas, su fragancia, textura y la forma general de la planta.

La producción de ornamentales en México surgió en los años 50´s en los estados de: Morelos, Ciudad de México, Puebla y Estado de México (SAGARPA, 2012). A nivel internacional, en 2019, México ocupó el tercer en la producción de plantas ornamentales, exportando únicamente el 20% y comercializando el resto en el mercado local (OPF, 2021). La rosa y el crisantemo son las principales flores de corte que demanda el mercado nacional (**Figura 1.1a**), por otro lado, las plantas en maceta más solicitadas son la nochebuena, el cempasúchil y el geranio (**Figura 1.1b**) (OPF México, 2022).

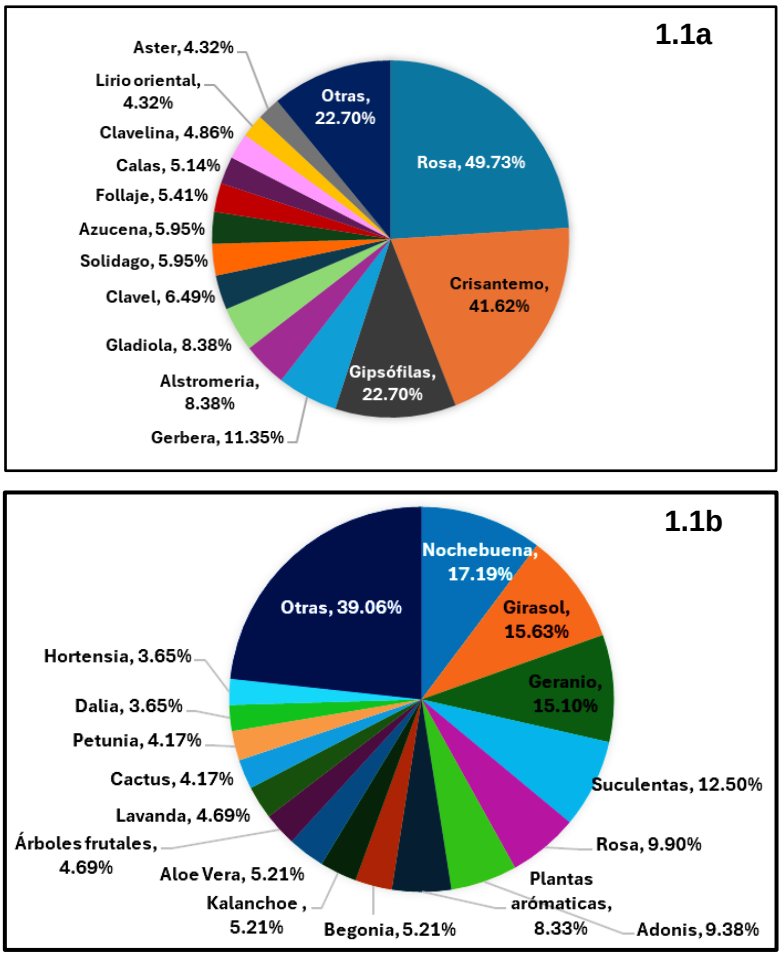


Figura 1.1. Porcentaje de flores de corte y plantas en maceta con mayor demanda en México.

1.1a) Porcentaje de flores de corte con mayor demanda en México; **1.1b)** Porcentaje de plantas en maceta con mayor demanda en México.

Fuente: OPF México (2022).

La derrama económica que dejó esta actividad en 2021 fue de 6,396 millones de pesos a nivel nacional (SADER, 2022). Por otro lado, el estado de Morelos se encuentra dentro de los estados con mayor producción de ornamentales en el país, y es considerado como el principal productor de plantas de ornato en maceta; la horticultura ornamental se lleva a cabo en prácticamente todo el estado, sin embargo, Cuautla, Cuernavaca, Emiliano Zapata, Jiutepec, Tepoztlán, Xochitepec, Yautepec y Yecapixtla, son los municipios con mayor producción; esta actividad es de importancia económica en el estado de Morelos ya que representa alrededor del 30% de PIB

agrícola, y genera más de 25,000 empleos directos e indirectos (SADER Morelos, 2020).

A pesar de no ser un producto de primera necesidad, la horticultura ornamental reviste una gran importancia cultural, social, económica y ambiental, lo que se observa en su crecimiento año con año, y en su mejoría constantemente adaptándose a las nuevas tecnologías y sistemas de cultivo para proporcionar material vegetal nuevo y de alta calidad, sobre todo manteniendo su valor estético que en la principal característica de estas plantas (Cardoso y Vendrame, 2022). El mercado de plantas ornamentales se encuentra en constate expansión a nivel nacional e internacional, sin embargo, este crecimiento aunado a la globalización en el comercio de flores ha permitido el transporte y dispersión involuntario de insectos diminutos considerados plaga, y de patógenos vegetales como los virus, que ocasionan problemas fitosanitarios, además de reducir la calidad y estética de las ornamentales (Dobhal *et al*., 2015; Kazinczi *et al*., 2007).

1.2 Virus en plantas ornamentales: *Tospovirus*

La cantidad de agentes patógenos que afectan a las plantas es enorme, siendo los virus el segundo grupo de patógenos más importante tan solo después de los hongos (Jeong *et al*., 2014). Los virus vegetales ocasionan importantes pérdidas tanto en la producción como en la calidad de plantas, limitando su exportación y aceptación en el mercado interno; las principales pérdidas económicas se deben en gran parte a la amplia gama de huéspedes que involucra importantes cultivos ornamentales, frutales y vegetales.

Los virus son organismos muy pequeños en comparación con otros grupos de patógenos vegetales como hongos y bacterias; se componen de una o varias moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN), y una capa proteica que lo protege llamada cápside; son parásitos obligados ya que necesitan de la maquinaria bioquímica de la célula para realizar sus funciones vitales (multiplicación y movimiento). Los virus interrumpen las funciones normales de las plantas al utilizar las fuentes estructurales y químicas de estas para elaborar más partículas virales, las cuales alteran el

metabolismo vegetal, así como la regulación de la expresión génica, y consecuentemente la aparición de síntomas relacionados al desarrollo de enfermedades, modificando su aspecto natural (Garrido, 2018).

Independientemente del virus del que se trate, su ciclo replicativo tiene varios pasos comunes que requieren de mecanismos y proteínas presentes en la célula huésped: el primero es la adsorción; seguido de la penetración; una vez en el interior de la célula los virus transcriben y replican su genoma; traducen sus proteínas utilizando la maquinaria celular de la planta; posteriormente se ensamblan nuevos viriones para finalmente ser expulsados al exterior de la célula a la que ya han desgastado para buscar e infectar nuevas células (Lodish *et al*., 2016). El virus se replica en el citoplasma de las células del hospedante y su variabilidad genética le concede cierta capacidad para superar la resistencia inducida en las plantas con la finalidad de controlarlo, de igual forma, tiene alta capacidad para adaptarse a condiciones nuevas y cambiantes (Tentchev *et al*., 2011).

Dentro de los virus más importantes y dañinos que afectan a las ornamentales se encuentran los *Tospovirus*, su importancia no solo se centra en las pérdidas económicas que causan, sino también al difícil control y erradicación, ya que su gama de hospederos es muy amplia además de su efectiva propagación mediante trips (Ferrand *et al*., 2019). Los *Tospovirus* son virus de ARN de cadena simple tripartito, es decir, lo componen tres moléculas de ARN negativos llamados segmentos pequeño (S), mediano (M), y grande (L), estos se encuentran encapsulados en la nucleoproteína (N). Los viriones son esféricos de 80 a 120 nm de diámetro, poseen una membrana lipídica con pequeños péptidos llamados peplómeros compuestos de las glicoproteínas Gn y Gc en su superficie**.** El ARN S codifica una proteína de la nucleocápside (N) y una proteína no estructural (NS), los NS actúan como un supresor silenciador de genes; el ARN M codifica una proteína no estructural (NSm), que funciona como una proteína de movimiento de célula a célula y como precursor de glicoproteínas; el ARN L codifica una proteína ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (**Figura 1.2**). (Pappu *et al*., 2009; Rotenberg *et al*., 2015).

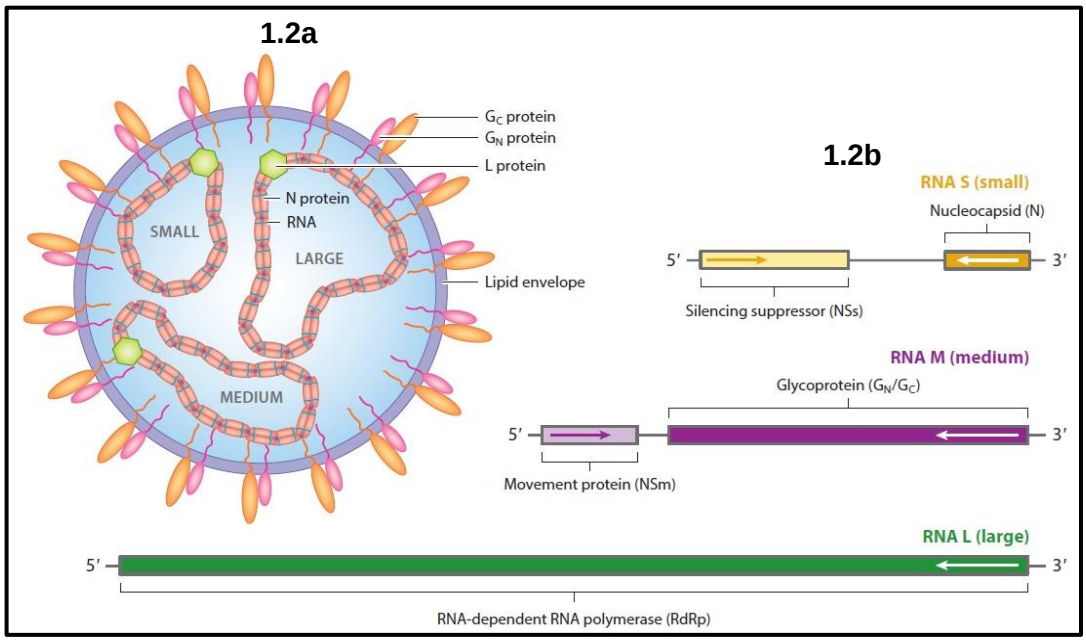


Figura 1.2. Estructura y organización del genoma de Tospovirus

Fig. 1.2a. Estructura de los *Tospovirus*. **Fig. 1.2b.** Organización del genoma de *Tospovirus*.

Fuente: Oliver y Whitfield (2016).

Los síntomas que causan los *Tospovirus* en las plantas son: lesiones locales cloróticas o necróticas, manchas anulares, patrones de líneas, mosaicos, decoloración del tallo, seguido de síntomas sistémicos como marchitez, atrofia, moteado, arrugamiento, bronceado, distorsión, rugosidad, clorosis y necrosis, que pueden variar en la misma especie huésped (OEPP/EPPO, 2020).

Los *Tospovirus* son transmitidos por 15 especies de trips que afecta a un gran número de cultivos de alimentos, fibras y ornamentales, resultando en epidemias de enfermedades de los cultivos de importancia económica y social en todo el mundo (Whitfield *et al*., 2005). En el **Cuadro 1.1** se muestran los virus de este género y sus vectores reportados.

Cuadro 1.1 Especies de *Tospovirus* reconocidas y sus vectores.

Especies de *Tospovirus*	Especie de trips vector
Alstroemeria necrotic streak virus (AlNSV)	*Frankliniella occidentalis*
Calla lily chlorotic spot virus (CCSV)	*Thrips palmi*
Capsicum chlorosis virus (CaCV)	*Ceratothripoides claratris*
	Thrips palmi
	Frankliniella schultzei
Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	*Frankliniella occidentalis*
	Frankliniella intonsa
	Frankliniella schultzei
Groundnut bud necrosis virus (GBNV)	*Frankliniella schultzei*
	Thrips palmi
	Scirtothrips dorsalis
	Thrips palmi
Groundnut chlorotic fan-spot virus (GCFSV)	*Scirtothrips dorsalis*
Groundnut ringspot virus (GRSV)	*Frankliniella occidentalis*
	Frankliniella schultzei
	Frankliniella gemina
Groundnut yellow spot virus (GYSV)	*Scirtothrips dorsalis*
Impatiens necrotic spot virus (INSV)	*Frankliniella occidentalis*
	Frankliniella fusca
	Frankliniella intonsa
Iris yellow spot virus (IYSV)	*Frankliniella fusca*
	Thrips tabaci
Melon yellow spot virus (MYSV)	*Thrips palmi*
Polygonum ring spot virus (PolRSV)	*Dictyothrips betae*
Soybean vein necrosis virus (SVNV)	*Neohydatothrips variabilis*
Tomato chlorotic spot virus (TCSV)	*Frankliniella occidentalis*
	Frankliniella schultzei
	Frankliniella intonsa
Tomato necrotic ringspot virus (TNRV)	*Ceratothripoides claratris*
	Thrips palmi
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	*Frankliniella occidentalis*
	Frankliniella fusca

	Frankliniella schultzei
	Frankliniella intonsa
	Frankliniella bispinosa
	Frankliniella cephalica
	Frankliniella gemina
	Thrips setosus
	Thrips tabaci
Tomato yellow (fruit) ring virus, (TYRV)	*Thrips tabaci*
Tomato zonate spot virus (TZSV)	*Frankliniella occidentalis*
Watermelon bud necrosis virus (WBNV)	*Thrips palmi*
Watermelon silver mottle virus (WSMoV)	*Thrips palmi*
Zucchini lethal chlorotic virus (ZLCV)	*Frankliniella zucchini*

Futente: Rotenberg *et al*. (2015).

El modo de transmisión de *Tospovirus* por trips es del tipo persistente propagativa: el virus presente en la planta es adquirido a través del estilete al momento de la alimentación, pasa al intestino medio, de ahí se traslada a la hemolinfa, y finalmente llega a las glándulas salivales para ser inoculados a otras plantas mientras se alimenta el trips (Catto *et al*., 2022). En la siguiente sección se detalla más el proceso de adquisición del virus por los trips.

1.3 Trips: vectores de virus

Los trips se han considerado como la principal plaga a nivel mundial de muchos cultivos agrícolas, hortícolas y ornamentales, afectando el desarrollo vegetativo y calidad final de la inflorescencia, eran considerados plagas secundarias de cultivos ornamentales y fue hasta el año de 1980 cuando se consideraron como plagas primarias de estos cultivos, constituyendo uno de los problemas fitosanitarios de importancia, no sólo por el daño directo que ocasionan, sino también por ser vectores de virus fitopatógenos del género *Tospovirus*, principalmente (Pérez-Moreno *et al*., 2016).

Los trips pertenecen al orden Thysanoptera, el cual se divide en dos subórdenes: Terebrantia y Tubulifera, el primero consta de 8 familias, mientras que el

segundo solo de una (Cluever y Smith, 2017). Los trips son pequeños insectos con una longitud promedio de 2 mm, su aparato bucal es picador chupador, con solo una mandíbula del lado izquierdo; su cabeza es alargada hipognata (dirigida hacia abajo); tienen ojos grandes y antenas cortas de seis a nueve segmentos; su protórax es grande, el meso y metatórax se encuentran fusionados; el décimo segmento abdominal de los trips del suborden Terebrantia es cónico y el ovipositor de las hembras es en forma de sierra, mientras que los trips del suborden Tubulifera tienen un décimo segmento abdominal en forma de tubo y un ovipositor en forma de rampa, carece de dientes; tienen patas cortas; sus alas son angostas y largas provistas de fleco pero sin venas, aunque son voladores débiles, sus alas, les permiten permanecer en el aire o flotar el tiempo suficiente para viajar fácilmente entre campos vecinos y ser arrastrados por el viento a distancias mucho mayores, además, su diminuto tamaño los hace difíciles de detectar en plantas ornamentales u hortalizas comercializadas contribuyendo a su expansión en nuevos entornos (Goldarazena, 2015).

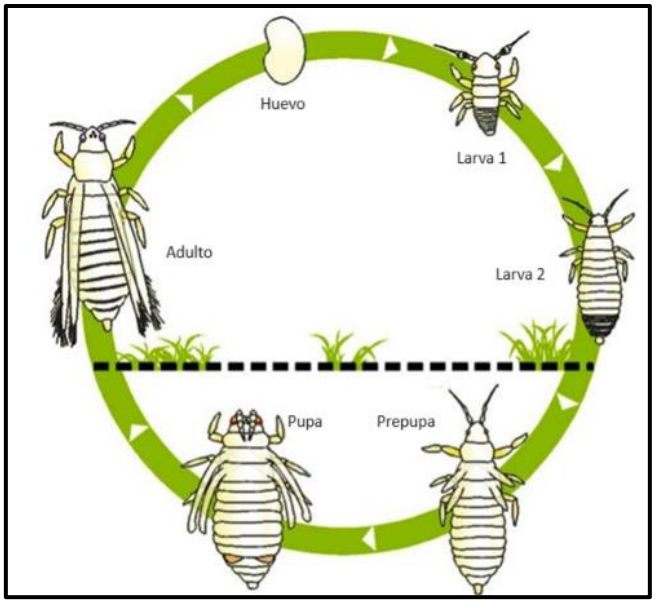


Figura 1.3. Ciclo de vida general de los trips.

Fuente: Zumbado-Arrieta y Azofeifa-Jiménez (2018).

El ciclo de vida de los trips consta de 6 fases: una fase huevo; dos fases larva; dos fases pupa; y una fase adulta (**Figura 1.3**). Una hembra llega a poner entre 60-

100 huevos que comúnmente insertan en el tejido vegetal, después de la incubación de los huevos aparecen las larvas, las cuales se alimentan activamente y son móviles, generalmente se encuentran en la protección del perianto de la flor o dentro del follaje terminal en desarrollo, al finalizar esta fase bajan por la planta para dar inicio al estadio de pupas, las cuales no se mueven y tampoco se alimentan, por lo regular se encuentran en el suelo, la hojarasca de las plantas o en un área protegida de la planta, finalmente se convierten en adultos y vuelven a alimentarse de flores, capullos y follaje terminal, los trips adultos pueden ser de color amarillo claro a marrón según la especie (Calixto, 2005). El ciclo de vida de los trips depende tanto de la especie como de las condiciones ambientales en las que se desarrolla, en la **Cuadro 1.2**, se muestran la duración de los estadios de desarrollo de la especie *F. occidentalis.* En general, los machos son más claros y ligeramente más pequeños que las hembras; su reproducción es tanto sexual como asexual, la sexual, da origen a hembras, mientras que la asexual origina machos (Juárez, 2014).

Cuadro 1.2 Duración de los estadios de desarrollo de *Frankliniella occidentalis* a una temperatura de 25-30 °C.

Estadio	Duración (días)	Tejido donde habita
Huevo	2-4	Hojas tiernas y flores
Larva I	1-2	Hojas tiernas y flores
Larva 2	3-5	Hojas tiernas y flores
Prepupa	1	Suelo
Pupa	2-4	Suelo
Hembra adulta	40-75	Hojas, flores y frutos
Macho adulto	30-50	Hojas, flores y frutos

Fuente: Solís (2016).

Los trips se alimentan de tejidos internos de plantas hortícolas, frutales y ornamentales; aunque la mayoría de los trips son fitófagos, también los hay micófagos y depredadores, viven en una amplia gama de climas; estos insectos tienen características que las hacen efectivas como vectores de virus y plagas, tales como su

alta fecundidad, ciclo biológico corto, alta actividad locomotora, preferencia por espacios ocultos y su polifagia, además los trips son difíciles de controlar debido a su tamaño pequeño y capacidad para desarrollar resistencia a los insecticidas, de ahí su importancia económica (Rotenberg *et al*., 2015).

El daño directo causado por la alimentación, así como la oviposición de los trips en flores y follaje da como resultado cicatrices que reducen la calidad estética y la comerciabilidad de las plantas ornamentales. Cuando los trips se alimentan de los tejidos en desarrollo, las células dañadas no pueden expandirse, lo que hace que las hojas maduras y los pétalos se distorsionen. La alimentación de trips en tejido expandido, las células afectadas se llenan de aire, impartiendo un aspecto plateado a las lesiones. Los ataques severos de trips pueden producir defoliación, aborto de flores y deformación de hojas y frutos, lo que se traduce en una disminución de la producción, así como en una merma de la calidad comercial de los productos (Loera-Alvarado *et al*., 2017).

El daño indirecto que causan los trips es por ser vectores de *Tospovirus*, al alimentarse, perforan la epidermis de la hoja e ingieren el citoplasma de las células del mesófilo, alternando con la bomba salival que introduce la saliva de los trips en la planta. Los *Tospovirus* primero infectan el intestino medio (región 1: MG1), después sistémicamente invaden el intestino anterior (FG) y otros tejidos del intestino medio (MG2, MG3 y células musculares), pero no infecta los tejidos del intestino posterior. Después infecta las glándulas salivales tubulares (TSG) y posteriormente llega a las glándulas salivales principales (PSG). El virus se desplaza desde el intestino a los PSG a través de los TSG (flechas azules) o por contacto directo durante los estadios larvarios (flecha roja) (**Figura 1.4**). En el extremo distal de cada TSG, se muestran el reservorio salival (SR) y los conductos eferentes (ED) que conectan el PSG con el SR, así como el canal salival deferente (DSC) que va desde el SR hasta el cono bucal. Los PSG tienen regiones distintas, incluida una región apical (AR) y una región basal (BR) compuestas por células más pequeñas y una región central con grandes células binucleadas (Oliver Y Whitfield, 2016; Shrestha *et al*., 2019).

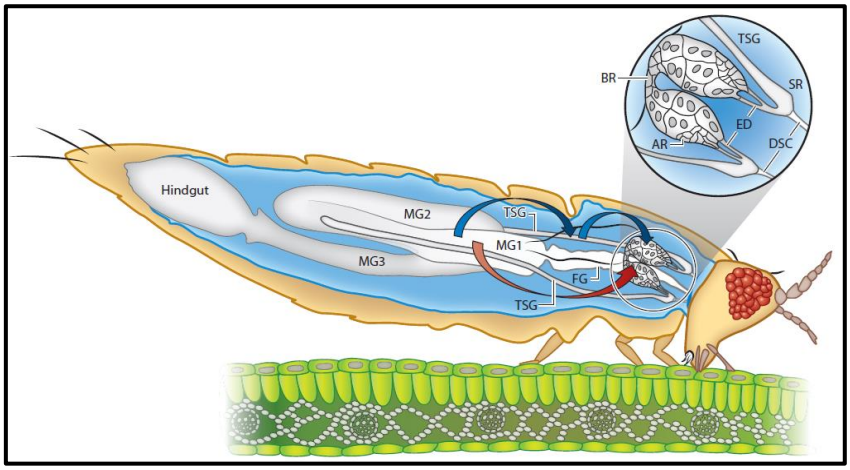


Figura 1.4. Vía de diseminación de *Tospovirus* en trips

Fuente: Oliver y Whitfield (2016).

Las larvas del primer estadio adquieren eficazmente los *Tospovirus* cuando se alimentan de plantas enfermas, las larvas del segundo estadio también lo pueden adquirir, pero con menor eficacia, y tanto estas larvas como los adultos pueden transmitir el virus por el resto de su vida; contrariamente, los trips adultos que se alimentan directamente de material vegetal infectado no pueden replicar el virus dentro de ellos (Boonham *et al*., 2002; Whitfield *et al*., 2005).

Un monitoreo adecuado de plagas y patógenos, además de prácticas de higiene en los invernaderos ayuda a reducir la transmisión de enfermedades entre las plantas.

1.4 Medidas de manejo y control de trips y virus en invernaderos

Al no contar con un antiviral u otro método que permita la eliminación del virus de la planta una vez que esta ha sido infectada, se requieren de medidas indirectas para la prevención y/o el control de la transmisión de enfermedades virales, tales como prácticas de higiene (desinfección frecuente de herramientas y material de trabajo), el uso de semillas libre de virus, protección cruzada, utilizar plantas transgénicas con genes que le confieren resistencia a los virus, y el control de vectores, trips específicamente para los *Tospovirus* (Sarwar *et al*., 2020).

Debido a que los *Tospovirus* se transmiten por trips, a continuación, se mencionan algunas medidas para su control. Una de ellas es el control químico mediante la aplicación de insecticidas, sin embargo, su uso desmedido a lo largo del tiempo ha ocasionado que los trips desarrollen resistencia a ciertas clases de sustancias químicas como lo son: piretroides, carbamatos y organofosforados, además del problema de residuos en cultivos comercializables, toxicidad hacia organismos beneficiosos no objetivo y contaminación del medio ambiente (Gullino *et al*., 2020; Leach *et al*., 2017).

Otra medida es el control biológico, se basa en la liberación de enemigos naturales, como pueden ser depredadores, parásitos, hongos entomopatógenos, entre otros; en el caso de los trips, especies de ácaros y hemípteros son sus principales depredadores naturales (Schausberger, 2018). Es una alternativa amigable para el control de trips en la floricultura, aunque se requiere de su optimización para aplicarse en ornamentales, ya la mayoría de estas plantas tienen ciclos de producción cortos, por lo que los agentes de control biológico no tienen tiempo para establecerse en el cultivo, lo que requeriría de recuentes liberaciones. Sin embargo, ya se han llevado a cabo estudios abordando el tema, como es el caso de Pozzebon *et al*. (2015) quienes aplicaron *Amblyseius swirskii, Neoseiulus californicus* y *Orius laevigatus* al dosel, y *Macrocheles robustulus* y *Steinernema feltiae* al suelo en condiciones de invernadero para evaluar el control de *F. occidentalis* en ciclamen.

El uso de semioquímicos junto con las herramientas de monitoreo aumenta la captura de trips, la adición de mezclas o productos químicos atrayentes a las trampas adhesivas puede aumentar el atractivo y la sensibilidad de los trips, proporcionando mejores sistemas de alerta temprana en cultivos, pero también facilitando un mapeo más preciso de las densidades de población y la evaluación de la eficacia de las estrategias de control (Abdullah *et al*., 2015). En este sentido, como semioquímicos se pueden utilizar feromonas que sirven para la comunicación intraespecífica entre insectos, y aleloquímicos que median en las interacciones entre plantas e insectos.

Otras acciones empleadas para el control de trips se encuentran la protección con mallas anti-trips en las aberturas de los invernaderos, hacer rotación de cultivos, y eliminar plantas cercanas al invernadero que pudieran ser reservorios de estos insectos (Singh *et al*., 2020). Estas medidas sirven para el manejo y control de los trips, que a su vez también son útiles para reducir la transmisión de virus, pero también es necesario tener certeza de si el patógeno está presente y específicamente cuál es, por lo que un diagnóstico oportuno es de suma importancia para evitar la propagación de enfermedades virales.

1.5 Técnicas moleculares para detección de patógenos

Los síntomas que producen los virus en las plantas fueron la primera forma de detectar enfermedades, desafortunadamente, no todos los virus inducen síntomas inmediatamente, algunos pueden causar infecciones asintomáticas, y otros más provocar síntomas similares a virus de diferentes familias, lo que hace que los métodos de detección fenotípicos sean inespecíficos (Katsarou *et al*., 2019). Otros métodos muy utilizados para la detección de patógenos son los serológicos, que utiliza anticuerpos unidos a una enzima y que al reconocer a un antígeno específico da inicio a una reacción que emitirá una señal detectable, de estos métodos destaca el ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), si bien, con ELISA las enfermedades se pueden evaluar con mayor objetividad que solo a partir de la sintomatología, aún presenta ciertas desventajas como los falsos positivos por reacciones cruzadas, falsos negativos debido al bajo título viral, y la falta de anticuerpos específicos para los virus objetivo. (Gao *et al*., 2020). En cambio, los métodos moleculares ofrecen una detección rápida y altamente específica de uno o múltiples objetivos a la vez, además de tener un límite de detección superior a ELISA. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y sus variantes como la RT-PCR, qPCR y RT-qPCR, son las técnicas moleculares más utilizadas en el diagnóstico de patógenos en plantas.

La PCR fue desarrollada en 1986 por Kary Mullis, esta técnica amplifica un fragmento particular del genoma del patógeno de interés, para llevar a cabo tal reacción se requiere de una enzima polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa)

proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, que polimeriza una cadena complementaria de ADN a partir de hebras sencillas; el gen blanco o templado; un par de *primers,* cebadores o iniciadores específicos complementarios al gen blanco, los cuales son dos secuencias cortas de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar; deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs); cloruro de magnesio y agua. Todos estos componentes son incorporados en un tubo que es colocado en un termociclador programado con cambios de temperaturas para llevar a cabo la síntesis de producto (González-Garza, 2017; Serrato *et al*., 2014).

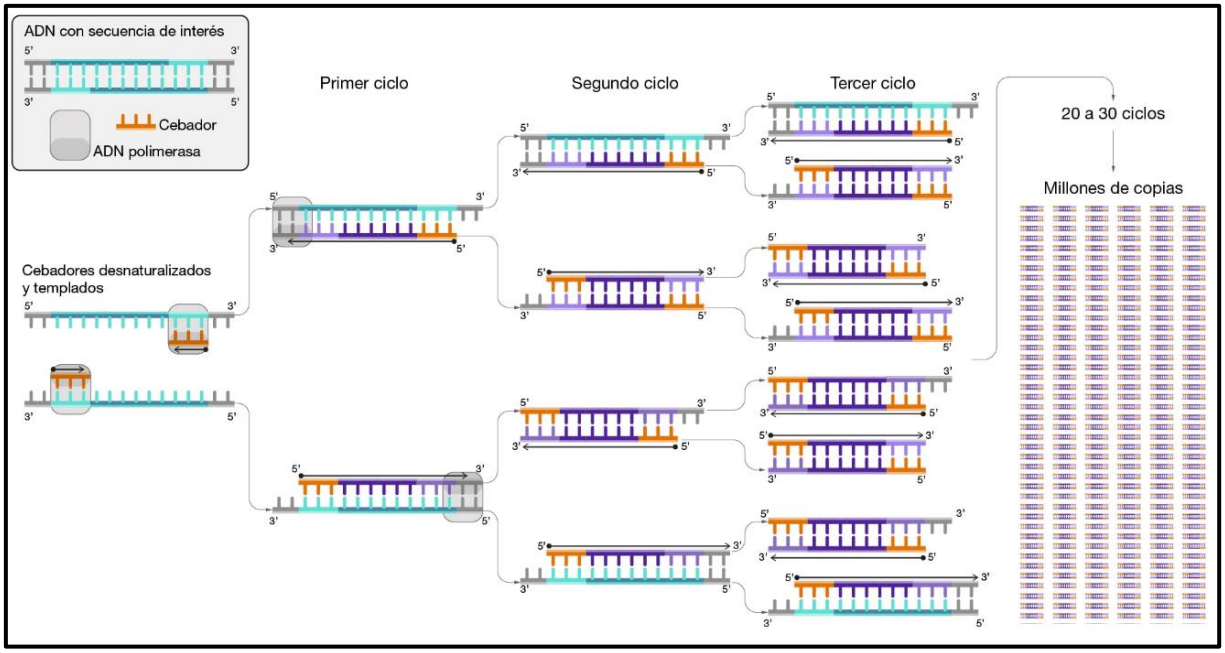


Figura 1.5. Principio general de PCR.

Fuente: NIH (2024).

Cada ciclo de PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión. En la desnaturalización, la reacción se somete a temperaturas entre 96-94 °C, en este rango las hebras dobles de ADN se desnaturalizan, es decir pierden la unión entre sus puentes de hidrógeno pasando de hebras dobles a hebras sencillas, que servirán de molde para la síntesis de una nueva cadena. En la etapa de hibridación, la temperatura baja entre los 60-40 °C, y es cuando los iniciadores se unen a la secuencia complementaria en la hebra sencilla del gen templado para formar el

complejo templado-iniciador. Finalmente, en la etapa de extensión, la temperatura asciende a 72 °C y la Taq polimerasa se une a los iniciadores para comenzar con la síntesis de la nueva cadena en dirección 5' a 3'; las tres etapas se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias y los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (**Figura 1.5**) (Rajamanickam *et al*., 2019; Zhu *et al*., 2020).

La PCR tiene algunas variantes, como son RT-PCR (PCR con transcripción inversa), esta sigue el mismo principio de amplificación que una PCR convencional, pero en lugar de ADN como templado utiliza ARN, a partir del cual, y con la enzima transcriptasa inversa (RT) se genera una copia de ADN complementario (ADNc) a partir de este se sintetiza ADNc bicatenario para continuar con el proceso de amplificación estándar de PCR. Otra variante es la qPCR (PCR cuantitativa), amplifica las secuencias de ADN en tiempo real, y mediante una sonda o colorante fluorescente intercalado permite la cuantificar las copias generadas conforme avanzan los ciclos de PCR. Estas dos variantes se pueden combinar: RT-qPCR, y se utiliza cuando se requiere conoce la cantidad de producto amplificado a partir de templados de ARN .(Adams, 2020; Jalali *et al*., 2017). Otros tipos de PCR son la anidada, y la múltiple, esta última se utiliza para detectar más de un patógeno a la vez.

La PCR y sus variantes ha permitido la detección de virus en plantas, además de ser utilizadas para la identificación de especies de trips. Por ejemplo, Bupi *et al*., (2024), detectaron los virus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) y TSWV mediante PCR y RT-PCR, respectivamente, en donde encontraron plantas de tomate infectadas por cada uno de los dos virus, pero también por ambos virus a la vez. Yoon *et al*., (2020), detectaron mediante RT-PCR plantas y trips infectados por TSWV, además identificaron las especies de trips *F. occidentalis* y *F. intonsa*. Por otro lado, RT-PCR y RT-qPCR se han empleado para la identificación y cuantificación de los virus Beet

yellows virus (BYV) y Beet chlorosis virus (BChV) en remolacha azucarera (Mahillon *et al*., 2022).

Otra técnica molecular recientemente utilizada para la detección de virus en plantas es la de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP, fue desarrollada en el 2000 por Notomi *et al*., (2000), la cual es altamente sensible y capaz de detectar ácido nucleico en condiciones isotérmicas y con mayor especificidad.

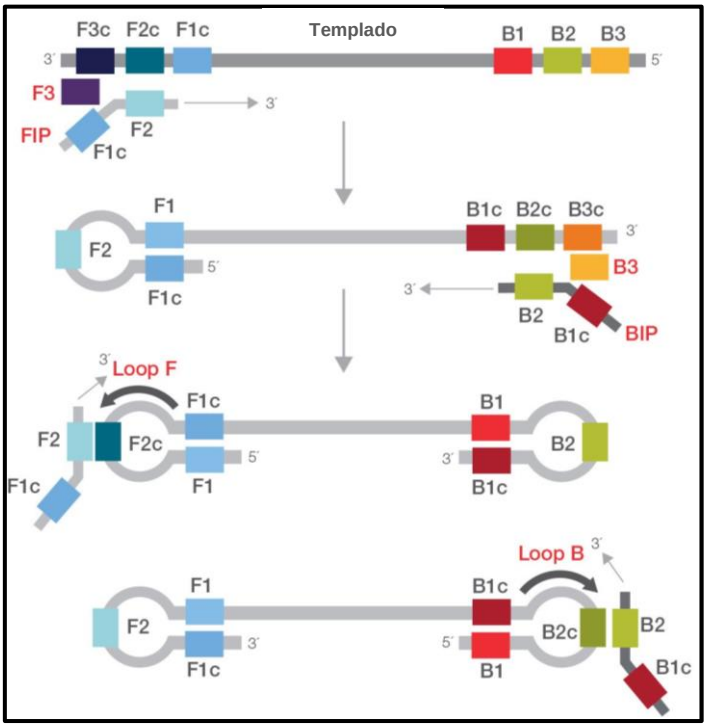


Figura 1.6. Principio general de LAMP.

Fuente: Thermofisher (2024).

LAMP se basa en la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra de auto ciclo que se realiza mediante la ADN polimerasa de fragmento largo *Bst* (aislada de *Bacillus stearothermophilus*) o la ADN polimerasa Bsm (aislada de *Bacillus smithii*) cuya actividad enzimática es de 66 °C y 63 °C respectivamente. En esta técnica, además de la ADN polimerasa se necesitan dos iniciadores internos (FIP y BIP), dos externos (F3 y B3), y en ocasiones los de *loop*, que reconocen de seis a ocho regiones distintas de un gen objetivo, por lo que LAMP amplifica el gen con alta eficiencia y precisión. El

iniciador FIP está constituido por una región F2 en el extremo 3’ y una región F1c en el extremo 5’; BIP contienen contiene las regiones B2 y B1c en los extremos 3’ y 5’ respectivamente; los iniciadores F3 y B3 son complementarios a F3c y B3c en la secuencia blanco de amplificación (**Figura 1.6**). Nagamine *et al*., (2002) propusieron la inclusión de un par de iniciadores más llamados *loop*, que contienen secuencias complementarias entre las regiones F1 y F2 / B1 y B2 donde se forma el bucle, de esta forma se incrementa el número de puntos de partida para la síntesis del DNA, lo que conlleva a la disminución del tiempo de amplificación.

En los pasos iniciales de la reacción LAMP, se usan los cuatro iniciadores que generan estructuras en forma de bucle (horquilla) durante las primeras etapas, pero más tarde, durante la reacción de ciclo, solo se usan los iniciadores internos para la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena. Los iniciadores internos contienen dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido y anti-sentido del ADN diana, una para cebar en la primera etapa y otro para el autocebado en etapas posteriores. La reacción de LAMP comienza cuando la secuencia F2 del primer FIP se hibrida con la región F2c de la secuencia del templado, mientras tanto, en el espacio que quedó entre el templado y F1c, la enzima desplaza la cadena y F3 se alinea con su secuencia complementaria, sintetizando y liberando la nueva cadena que contiene una forma de bucle o *loop* 5’ que servirá como plantilla para BIP: su secuencia B2 se alinea con la cadena liberada e inicia la síntesis de la cadena; B3 se hibrida a la región complementaria del templado y se extiende desplazando la cadena complementaria unida a BIP que contiene las regiones antisentido en los extremos, por lo que se alinean entre ellos formando la estructura de los bucles o *loops* en ambos extremos. Los nucleótidos se agregan al extremo 3’ de F1 por la *Bst* polimerasa que se extiende y abre el bucle en el extremo 5’, dando forma a una estructura de bucle-vástago que sirve como iniciador para la amplificación exponencial. Los iniciadores *loop* se pueden agregar para acelerar la síntesis de producto y tener resultados en menor tiempo (Bhat y Rao, 2020; Carmona *et al*., 2018; Varma y Singh, 2020). Cuando el templado es ARN, se utiliza RT-LAMP, que como en RT-PCR, se incorpora la enzima RT.

LAMP tiene ciertas ventajas sobre la PCR (**Cuadro 1.3**), es más económica y sensible, más robusta, los resultados se obtienen en menor tiempo, y no requiere de equipos costos como los termocicladores, lo cual hace de esta técnica una opción viable para diagnósticos de rutina. Se han comparado estas dos técnicas en el diagnóstico de virus y los resultados son contundentes: RT-LAMP es superior a RT-PCR, la sensibilidad que han documentado va de 10-100 veces más en RT-LAMP (Sarkes *et al*., 2020; Sui *et al*., 2018), respecto al tiempo de obtención de resultados, con RT-LAMP se pueden obtener en tan solo 50 min, mientras que con RT-PCR son necesarias aproximadamente 3 h (Verma, 2020).

Cuadro 1.3 Comparación de técnicas PCR y LAMP.

Característica	PCR	LAMP
Tipo de reacción	Cíclica	Isotérmica
Equipo requerido	Termociclador	Baño María
Temperatura	Variable: 95 °C – 50 °C	60-68 °C
Enzima	Taq polimerasa	Bst polimerasa
Sensibilidad a inhibidores	No	Si
Iniciadores	2	4-6
Detección visual	No	Si
Tiempo de análisis	3-4 horas	30-60 minutos

Los métodos de detección de patógenos en plantas han evolucionado significativamente permitiendo un diagnóstico confiable. El reducir los costos y la duración de las pruebas es de vital importancia sobre todo si se piensa en diagnósticos a gran escala, que además puedan incluirse en planes integrales de protección fitosanitaria y que no solo se encuentren disponibles en los laboratorios sino también en el campo, de esta forma, una detección temprana de enfermedades virales permitirá que se tomen medidas de protección necesarias y evitar la propagación del virus.

Referencias

Abdullah, Z. S., Greenfield, B. P. J., Ficken, K. J., Taylor, J. W. D., Wood, M., y Butt, T. M. (2015). A new attractant for monitoring western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* in protected crops. *SpringerPlus*, 4(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s40064-015-0864-3

Adams, G. (2020). A beginner 's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. Issue June, pp. 1–6). Portland Press Limited. https://doi.org/10.1042/BIO20200034

Bhat, A. I., y Rao, G. P. (2020). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). En Characterization of plant viruses (pp. 259–262). *Humana Press*. https://doi.org/10.4324/9780203061350-48

Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., y Barker, I. (2002). The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 101(1–2), 37–48. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9

Bupi, N., Thi, T., Vo, B., Qureshi, M. A., Tabassum, M., Im, H., Chung, Y., Ryu, J., Kim, C., y Lee, S. (2024). Twindemic Threats of Weeds Coinfected with Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Spotted Wilt Virus as Viral Reservoirs in Tomato Greenhouses. *The Plant Pathology Journal*, 40(3), 310–321. https://doi.org/https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2024.0049

Calixto, C. (2005). Trips del suborden Terebrantia (Insecta: Thysanoptera) en la Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2): 207–213.

Cardoso, J. C., y Vendrame, W. A. (2022). Innovation in propagation and cultivation of ornamental plants. *Horticulturae*, 8(3), 10–13. https://doi.org/10.3390/horticulturae8030229

Carmona, L., la Cruz Pérez, D., Rodríguez, M., y Montes, R. (2018). Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya. *Mens. Bioquim*, 42, 92–102.

Catto, M. A., Mugerwa, H., Myers, B. K., Pandey, S., Dutta, B., y Srinivasan, R. (2022). A review on transcriptional responses of interactions between insect vectors and plant viruses. *Cells*, 11(4), 1–26. https://doi.org/10.3390/cells11040693

Chen, J. (2021). Ornamental Plant Research Inaugural Editorial. *Ornamental Plant Research*, 1, 1–2. https://www.maxapress.com/article/id/600786f1ce60b930c8c1c7ac

Cluever, J. D., y Smith, H. A. (2017). A photo-based key of thrips (Thysanoptera) associated with horticultural crops in Florida. *Florida Entomologist*, 100(2), 454–467. https://doi.org/10.1653/024.100.0208

Dobhal, S., Arif, M., Olson, J., Mendoza-Yerbafría, A., Aguilar-Moreno, S., Pérez-García, M., y Ochoa-Corona, F. M. (2015). Sensitive detection and discrimination method for studying multiple infections of five major plant viruses infecting ornamental plants in nursery environments. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 286–296. https://doi.org/10.1111/aab.12182

Ferrand, L., Almeida, M. M. S., Orílio, A. F., Dal Bó, E., Resende, R. O., y García, M. L. (2019). Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance-breaking isolates from Argentina. *Plant Pathology*, 68(9), 1587–1601. https://doi.org/10.1111/ppa.13087

Gao, L., Yang, Q., Wu, P., y Li, F. (2020). Recent advances in nanomaterial-enhanced enzyme-linked immunosorbent assays. *Analyst*, 145(12), 4069–4078. https://doi.org/10.1039/d0an00597e

Garrido, M. J. (2018). Generalidades sobre virus de plantas. In Universidad Central de Venezuela. Universidad Central de Venezuela.

Goldarazena, A. (2015). Orden Thysanoptera. *Revista IDEA-SEA*, 52, 1–20. www.sea-entomologia.org/IDE@

González-Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591–610. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-1

Gullino, M. L., Albajes, R., y Nicot, P. C. (2020). Chemical and natural pesticides in IPM side effects and application. (pp. 441–454) En Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5

Jalali, M., Zaborowska, J., y Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. (pp. 1-17). En Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1

Jeong, J.-J., Ju, H.-J., y Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. Research in Plant Disease, 20(3), 173–181. https://doi.org/10.5423/rpd.2014.20.3.173

Juárez, E. (2014). Determinación de especies de trips (Thysanoptera: Thripidae) en cinco variedades de rosa Rosa hybrida en localidades de Tenancingo y Villa Guerrero, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México.

Katsarou, K., Bardani, E., Kallemi, P., y Kalantidis, K. (2019). Viral Detection: Past, Present, and Future. *BioEssays*, 41(10). https://doi.org/10.1002/bies.201900049

Kazinczi, G., Horváth, J., y Takács, A. (2007). *Tospovirus*es on ornamentals. *Plant Viruses*, 1(2), 142–162.

Leach, A., Reiners, S., Fuchs, M., y Nault, B. (2017). Evaluating integrated pest management tactics for onion thrips and pathogens they transmit to onion. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 250(August), 89–101. https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.08.031

Liu, H., Wu, W., Tan, J., Li, Y., Mi, W., Jiang, L., y Wu, Y. (2019). Development and evaluation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of Citrus leaf blotch virus. *Journal of Virological Methods*, 270, 150–152. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.009

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Anthony, B., Ploegh, H., Amon, A., y Martin, K. C. (2016). Molecular cell biology (W. H. F. and Company (ed.)). Katherine Ahr Parker.

Loera-Alvarado, E., Delia Ortega-Arenas, L., Miguel Johansen-Naime, R., González-Hernández, H., Lomelí-Flores, R., Teresa Santillán-Galicia, M., y Leobardo Ochoa-Martinez, D. (2017). Diversity of thysanoptera in chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (ramat.) Kitamura] var. Harman in Texcoco, State of Mexico. *Acta Zoológica Mexicana Nueva Serie*, 33(1), 1–8.

Mahillon, M., Groux, R., Bussereau, F., Brodard, J., Debonneville, C., Demal, S., Kellenberger, I., Peter, M., Steinger, T., y Schumpp, O. (2022). Virus Yellows and Syndrome “Basses Richesses” in Western Switzerland: A Dramatic 2020 Season Calls for Urgent Control Measures. *Pathogens*, 11(885). https://doi.org/10.3390/pathogens11080885

Nagamine, K., Hase, T., y Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415

NIH. (2024). Reacción en cadena de la polimerasa. Recuperado el 27 de mayo de 2024 de: https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., y Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63

OEPP/EPPO. (2020). PM 7/139 (1) *Tospovirus*es (Genus Ortho*Tospovirus*). OEPP/EPPO Bulletin, 50(2), 217–240. https://doi.org/10.1111/epp.12676

Oliver, J. E., y Whitfield, A. E. (2016). The Genus *Tospovirus*: Emerging Bunyaviruses that Threaten Food Security. *Annual Review of Virology*, 3, 101–124. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055036

OPF (2021). Impulsar la industria ornamental de México con la experiencia y la innovación holandesas. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de: https://opf.news/impulsar-la-

industria-ornamental-de-mexico-con-la-experiencia-y-la-innovacion-holandesas/

OPF México (2022). “Opportunities for Dutch Businesses in the Mexican Ornamental Sector”. México.

Pappu, H. R., Jones, R. A. C., y Jain, R. K. (2009). Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141(2), 219–236. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009

Pérez-Moreno, L., Niño-Mendoza, G. H., Mendoza-Celedón, B., León-Galván, M. F., Robles-Hernández, L., y González-Franco, A. C. (2016). Pathogenic viruses incidence, severity and detection in lettuce, in the state of Queretaro, Mexico. *Acta Universitaria*, 26(2), 3–11. https://doi.org/10.15174/au.2016.842

Pozzebon, A., Boaria, A., y Duso, C. (2015). Single and combined releases of biological control agents against canopy- and soil-dwelling stages of *Frankliniella occidentalis* in cyclamen. *BioControl*, 60(3), 341–350. https://doi.org/10.1007/s10526-014-9641-4

Rajamanickam, S., Kumar, R. P., y Karthikeyan, G. (2019). A potential tool for the detection of plant viruses through serological and molecular approaches. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 3046–3051.

Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneweis, D. J., y Whitfield, A. E. (2015). Thrips transmission of *Tospovirus*es. Current *Opinion in Virology*, 15(September), 80–89. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003

SADER. (2022). Lista la producción de flores ornamentales para atender demanda por el 14 de febrero. Gobierno de México. Recuperado el 15 de julio de 2023 de: https://www.gob.mx/agricultura/prensa/lista-la-produccion-de-flores-ornamentales-para-atender-demanda-por-el-14-de-febrero#:~:text=Al%20cierre%20de%202021%2C%20el,de%20Agricultura%20y%20Desarrollo%20Rural.

SADER Morelos (2020). Producción ornamental de Morelos representa el 30 por ciento de su PIB Agrícola. Gobierno de México. Recuperado el 10 de agosto de 2020 de: https://www.gob.mx/agricultura%7Cmorelos/articulos/91640

SAGARPA. (2012). Plan Rector Sistema Nacional Ornamentales 2012.

Sarkes, A., Fu, H., Feindel, D., Harding, M., y Feng, J. (2020). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *PLoS ONE*, 15(6), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230403

Sarwar, M., Shad, N. A., y Batool, R. (2020). Integrated management of vectored viral diseases of plants. (pp. 707–724). En Applied Plant Virology: Advances, Detection and Antiviral Strategies. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00050-5

Schausberger, P. (2018). Herbivore-associated bacteria as potential mediators and modifiers of induced plant defense against spider mites and thrips. *Frontiers in Plant Science*, 9(July), 1–9. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01107

Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., y Sierra, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología (pp. 53–73). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Climático, Instituto Nacional de Ecología y Cambio.

Shrestha, A., Champagne, D. E., Culbreath, A. K., Abney, M. R., y Srinivasan, R. (2019). Comparison of transcriptomes of an ortho*Tospovirus* vector and non-vector thrips species. *PLoS ONE*, 14(10), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223438

Singh, R. P., Tiwari, S., Singh, M., Singh, A., y Singh, A. K. (2020). Important diseases of greenhouse crops and their integrated management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(January), 962–970

Solis, P. (2016). Plan de manejo de trips en el cultivo del aguacate Hass. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. San José, Costa Rica. pp.40.

Sui, X., Zhang, S., Wu, Z., y Ling, K. S. (2018). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for species-specific detection of tomato chlorotic spot ortho*Tospovirus*. *Journal of Virological Methods*, 253(December), 56–60. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.002

Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Agular, J. M., y Moury, B. (2011). Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology*, 92, 961–973. https://doi.org/10.1099/vir.0.029082-0

Thermofisher. (2024). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Recuperado el 27 de mayo de 2024 de: https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/isothermal-nucleic-acid-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification.html

Varma, A., y Singh, M. K. (2020). Diagnosis of plant virus diseases. (pp. 79-92). En Applied Plant Virology: Advances, Detection and Antiviral Strategies. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00006-2

Whitfield, A. E., Ullman, D. E., y German, T. L. (2005). *Tospovirus*-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43(February 2005), 459–489. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017

Yeler, O. (2022). International project studies to support landscape and ornamental plants sector businesses: Mersin (Turkey) case. (pp. 95-119). En The landscape and the city.

Yoon, J. Y., Yoon, J. B., Seo, M. H., Choi, S. K., Cho, I. S., Chung, B. N., Yang, C. Y., y Reddy Gangireddygari, V. S. (2020). Application of multiplex RT-PCR for simultaneous identification of tomato spotted wilt virus and thrips species in an individual thrips on chrysanthemum. *Research in Plant Disease*, 26(4), 264–271. https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.4.264

Zhang, Z.-Y., Liu, X.-J., Li, D.-W., Yu, J.-L., y Han, C.-G. (2011). Rapid detection of turnip mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, 8(550). https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-422X-8-55012227

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., y Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325. https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0057

Zumbado-Arrieta, M., y Azofeifa-Jiménez, D. (2018). Insectos de importancia agrícola. Guía Básica de Entomología Costa Rica y Centroamérica, 204. http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H10-10951.pdf

2. Justificación, objetivos e hipótesis

2.1 Justificación

Dentro de los patógenos vegetales, los virus ocupan el segundo lugar en importancia, representando una amenaza para los ecosistemas ornamentales y agrícolas en todo el mundo, siendo así que, en los últimos años, las enfermedades causadas por virus han ocasionado grandes pérdidas económicas. Sumado a esto, es preciso mencionar que, a diferencia de otros patógenos de plantas, el manejo de las enfermedades virales basados en métodos directos para su control hasta el momento no se ha desarrollado, de esta forma, este tipo de enfermedades requiere de medidas indirectas para evitar la infección de plantas y su propagación, lo que hace que la detección y el diagnóstico de virus fitopatógenos sean un tema de importancia crítica.

Para realizar un control eficiente de una enfermedad viral es importante identificar el agente causal, ya que esto garantiza el éxito en las medidas de su control. El diagnostico visual para la identificación de enfermedades virales en plantas no es suficiente, sino que se requiere de objetividad, precisión y confiabilidad para la detección, en este caso, las técnicas moleculares ofrecen certeza en el diagnóstico de virus fitopatógenos. Dentro de estas, la PCR es una de las más utilizadas, sin embargo, existen otras como LAMP que es más fácil y rápida de implementar, conservado la confiabilidad de los resultados. Es por ello que en este proyecto se plantea realizar la identificación del virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus de la mancha necrótica de impatiens (INSV), y el virus del mosaico de Poinsettia en plantas ornamentales y trips haciendo uso de las técnicas de RT-PCR y RT-LAMP.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Detectar virus fitopatógenos en muestras de plantas (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima)* y trips colectados dentro de invernaderos de plantas ornamentales mediante RT-PCR y RT-LAMP, así como el desarrollo y validación de kits de diagnóstico molecular para RT-LAMP.

2.2.2 Objetivos específicos

a) Determinar el tipo de trampa más adecuado para la colecta de trips que mantenga las condiciones óptimas tanto para los análisis taxonómicos como para los moleculares.
b) Identificar morfológica y molecularmente los trips colectados en invernaderos.
c) Identificar mediante RT-PCR los virus de TSWV e INSV en trips y plantas de *Impatiens hawkeri*.
d) Identificar mediante RT-LAMP el virus de INSV en trips y plantas de *Impatiens hawkeri*
e) Desarrollar el kit de diagnóstico molecular RT-LAMP para detectar TSWV en trips y plantas ornamentales.
f) Identificar mediante RT-PCR y RT-LAMP el virus de PnMV en *Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*

2.3 Hipótesis

El desarrollo e implementación de kits de diagnóstico molecular RT-LAMP para virus fitopatógenos permitirá la detección rápida y específica de virus en plantas y trips colectados dentro de invernaderos de plantas ornamentales.

3. Presencia del trips de las flores *Frankliniella schultzei* en plantas ornamentales de Morelos

3.1 Resumen

El objetivo es reportar la presencia de *Frankliniella schultzei* en plantas de geranio (*Pelargonium hortorum*) y vinca (*Catharanthus roseus*), en invernaderos del Estado de Morelos, México. Se muestrearon plantas de geranio y vinca en invernaderos ubicados en el Municipio de Jojutla, Morelos, México. Los especímenes recolectados fueron de color castaño a café oscuro, fueron procesados y montados en laminillas de vidrio e identificados por medio de claves taxonómicas y el uso de un microscopio convencional de luz. Los especímenes colectados en geranio y vinca presentaron características morfológicas correspondientes a la especie de *Frankliniella schultzei.* Es necesario el monitoreo de la especie ahora que se conoce su presencia en por lo menos dos zonas de México: occidente y centro del País. En México, *Frankliniella schultzei* solo había sido reportada en el occidente con este reporte ahora se sabe que también se ubica en la parte central del País.

Palabras clave: morfología, vector, plaga.

3.2 Abstract

The aim is to report the presence of *Frankliniella schultzei* in geranium (*Pelargonium hortorum*) and vinca (*Catharanthus roseus*) plants, in greenhouses in the State of Morelos, Mexico. Geranium and vinca plants were sampled in greenhouses located in the Municipality of Jojutla, Morelos, Mexico. The collected specimens were brown to dark brown color, were processed and mounted on glass slides and identified by means of taxonomic keys and the use of a conventional microscope. The specimens collected in geranium and vinca presented morphological characteristics corresponding to the species *Frankliniella schultzei.* Monitoring of the species is necessary now that its presence is known in at least two areas of Mexico: the west and center of the country. In Mexico, *Frankliniella schultzei* had only been reported in the west, with this report it is now known that it is also located in the central part of the country.

Keywords: morphology, vector, pest.

3.3 Introducción

La especie de trips *Frankliniella schultzei*, también conocido como trips común de las flores es una especie de hábitos polífagos, morfológicamente se han identificado especímenes en tonos claros y obscuros, pero su capacidad para transmitir virus y su distribución geográfica son diferentes (Kakkar *et al.,* 2010); los tonos claros se distribuyen principalmente al norte del Ecuador, mientras que los tonos oscuros se encuentran al sur del Ecuador (Vierbergen y Mantel, 1991). Se ha registrado la asociación de *F. schultzei* a 83 especies de plantas distribuidas en 35 familias y es considerada como una plaga de varios cultivos en diferentes partes del mundo. Se ha reportado en hortalizas (Feliciano *et al.,* 2008; Kakkar *et al.,* 2012), en frutales (Carvalho *et al.,* 2020) y ornamentales (Carrizo *et al.,* 2008; Jiménez *et al.,* 2006); en lugares como Hawái representa un alto potencial de riesgo para ciertos cultivos ya que es una plaga cuarentenaria (Yalemar *et al.,* 2001). Se han realizado estudios sobre los daños y pérdidas que ocasiona esta especie de trips obteniendo que, en melón, se llegó a reducir su rendimiento en un 46% (Diamantino *et al*., 2021); mientras que en pimiento morrón ocasionó pérdidas de hasta el 49% (Da S. Paes *et al.,* 2019).

Esta especie es vector notable de los siguientes virus: *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CNSV), *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV), *Groundnut yellow spot virus* (GYSV), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), todos del género *Tospovirus*. La forma oscura es un vector competente de estos *Tospovirus* a diferencia de la forma clara que no es un vector competente (Reitz *et al.,* 2011). Respecto a pérdidas económicas por virus, Sevik y Arli-Sokmen (2012), reportaron que el TSWV provocó una reducción del 42.1 % en el rendimiento de tomate, y del 95.5 % en su valor comercial, estimando pérdidas de alrededor de un millón de dólares en Turquía; en Georgía, EUA, se ha estimado que las pérdidas y costos económicos

sobre el control de trips y TSWV en cultivo de tomate y pimiento son de más del 60% (Reitz, S. y Funderburk, J., 2012).

Así mismo, *F. schultzei* se ha reportado en ornamentales como *Lathyrus latifolius, Tropeaelum majus* (Carrizo *et al.,* 2008), *Chrysanthemum coronarium, Mirabilis jalapa, Polianthes tuberosa* (Surís y González, 2008), *Hibiscus rosasinensis, Vigna caracalla, Ipomoea cairica* (Milne y Walter, 2000), *Dimorphotheca ecklonis*, *Lilium spp., Jasminum spp., Dianthus caryophyllus, Dahlia spp., Tagetes erecta* (Jiménez *et al.,* 2006).En México, el primer reporte de *F. schultzei* fue en 2017, en el occidente de México: Jalisco y Sinaloa (Johansen-Naime *et al.,* 2017), y hasta el momento no se tenía algún otro registro de esta especie en el país.

3.4 Materiales y métodos

Se realizaron dos muestreos en plantas de geranio (*Pelargonium hortorum*) y vinca (*Catharanthus roseus*) de invernaderos ubicados en el municipio de Jojutla, Morelos, México, en los meses de noviembre (2020) y junio (2021), las plantas se encontraban en floración. Se utilizó la técnica de golpeteo para obtener los trips, principalmente de las flores, que caían en una hoja blanca y posteriormente se colectaron con un aspirador entomológico y colocaron en alcohol al 70 % hasta ser procesados para su montaje.

Los trips pasaron por una hidratación progresiva en alcoholes en concentraciones de 90 %, 80 %, 70 %, 60 % y 50 % por 30 min en cada uno, y 2 h en alcohol al 30 %, posteriormente se pasaron a NaOH al 5 % por 20 min. Con un alfiler entomológico se perforó y masajeo el abdomen de los trips para eliminar restos intestinales, enseguida pasaron nuevamente por una deshidratación progresiva con tiempos diferentes en cada concentración: 50 %, 50 min; 60 %, 40 min; 70 %, 30 min; 80 %, 20 min; 90 %, 10 min; 100 %, 5 min; finalmente se dejaron en aceite de clavo por 30 min (Palmer y Mound 1990). El montaje se realizó adicionando una gota de bálsamo de Canadá en un portaobjetos para cada espécimen, las preparaciones se dejaron secar a 40 °C por una semana.

La identificación morfológica de los especímenes se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica (CIEMic-UCR), utilizando como material de referencia las especies depositadas en la Colección de Thysanoptera de dicha institución y por medio de las claves taxonómicas de Mound y Marullo (1996) y Palmer *et al*. (1989).

3.5 Resultados y discusión

Se obtuvo un total de 79 especímenes, de los cuales, 40 fueron seleccionados para el montaje y 12 de ellos fueron identificados taxonómicamente, coincidiendo con la descripción para la especie de *F. schultzei.*

Todos los trips identificados como *F. schultzei* fueron hembras color café oscuro, con antenas de ocho segmentos (**Figura 3.1**), sin sencila campaniforme en el metanoto, el par de sedas ocellar III les surgió entre los márgenes anteriores de los ocelos posteriores, y el peine de tergito VIII estuvo ausente (**Figura 3.2**).

Figura 3.1. Vista dorsal de *Frankliniella schultzei* (hembra).

Figura 3.2. Sedas: ioIII: interocelares III, poIV: posoculares IV, am: anteromarginales, I-III: segmentos antenales I-III; VII-IX: tergitos VII-IX; flecha individual: pedicelo; flecha doble: dientes laterales del peine escasamente notorio.

De acuerdo con Vierbergen y Mantel (1991), los trópicos y subtrópicos son las regiones más adecuadas para el establecimiento de *F. schultzei*, de este modo, México es un país con clima adecuado para el desarrollo de esta plaga; aunque mencionan que los especímenes en tonos oscuros de esta especie se ubican principalmente al sur del Ecuador, Kakkar *et al.,* (2012), ha reportado a *F. schultzei* en tono café oscuro al sur de Florida.

3.6 Conclusiones

El trips común de las flores *F. schultzei* es reportado por primera vez en el centro de México y por segunda vez en la República Mexicana. Es una especie con potencial a ser plaga en diversos cultivos y en diferentes Estados del territorio mexicano. La afectación sería directa por el daño causado de larvas y adultos, así como por su capacidad para transmitir *Tospovirus*. Con este reporte, se extiende la alerta para que aumente el monitoreo de la especie y el desarrollo de la investigación sobre la dinámica poblacional y temporal de la especie.

3.7 Referencias

Carrizo, P., Gastelú, C., Longoni, P., y Klasman, R. (2008). Especies de trips (Insecta: Thysanoptera: Thripidae) en las flores de ornamentales. *Idesia*, *26*(1), 83–86.

Carvalho, S. C., Junior, P. A. S., Pereira, P. S., Sarmento, R. A., Farias, E. S., Lima, C. H. O., Santos, G. R., y Picanço, M. C. (2020). Spatial Distribution of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in Open-Field Yellow Melon, with Emphasis on the Role of Surrounding Vegetation as a Source of Initial Infestation. *Journal of Economic Entomology*, *113*(6), 2997–3003. https://doi.org/10.1093/jee/toaa219

Da S. Paes, J., A. de Araújo, T., S. Ramos, R., João, J. R., C.R. de Araújo, V., y C. Picanço, M. (2019). Economic injury level for sequential sampling plan of *Frankliniella schultzei* in bell pepper crops. *Crop Protection*, 123(May), 30–35. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.011

Diamantino, M. L., Soares Ramos, R., de Almeida Sarmento, R., Silvestre Pereira, P., y Coutinho Picanço, M. (2021). Decision-making system for the management of *Frankliniella schultzei* thrips in commercial melon fields. *Crop Protection*, 139(January 2020), 105346. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105346

Feliciano, M., Cabrera-Asencio, I., y Rivera-Vargas, L. I. (2008). *Frankliniella occidentalis, F. schultzei and F. fusca* (Thysanoptera: Thripidae) in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, *92*(1–2), 107–110. https://doi.org/10.46429/jaupr.v92i1-2.2625

Jiménez, S. F., Pérez, L., Toro, M., Granda, C., Mateo, A., Sariol, H., Rodríguez, E., Pérez, R., Jiménez, R., Pérez-Alejo, A., y Vázquez, R. (2006). Dispersión, distribución actual y nuevos reservorios de *Frankliniella schultzei* trybom (Thysanoptera: Thripidae) en Cuba. *Fitosanidad*, *10*(4), 273–278.

Johansen-Naime, R. M., Mojica-Guzmán, Á., y Mejorada-Gómez, E. (2017). Primer registro de *Frankliniella shultzei* (Trybom) (Thysanoptera, Terebrantia: Thripidae) en México. *Entomología Agrícola*, *4*, 306–309.

Kakkar, G., Seal, D. R., y Kumar Jha, V. (2010). Common blossom thrips, *Frankliniella schultzei* Trybom (Insecta: Thysanoptera: Thripidae). *Edis*, *2010*(5), 1–5. https://doi.org/10.32473/edis-in860-2010

Kakkar, G., Seal, D. R., Stansly, P. A., Liburd, O. E., y Kumar, V. (2012). Abundance of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in flowers on major vegetable crops of South Florida. *Florida Entomologist*, *95*(2), 468–475. https://doi.org/10.1653/024.095.0231

Mound L.A. y Marullo R. (1996). The Thrips of Central and South America: An Introduction. Memoirs on Entomology, *International* 6: 1–488

Milne, M., y Walter, G. H. (2000). Feeding and breeding across host plants within a locality by the widespread thrips *Frankliniella schultzei*, and the invasive potential of polyphagous herbivores. *Diversity and Distributions*, *6*(5), 243–257. https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2000.00089.x

Palmer, J.M., Mound, L. y Heaume, G.J. (1989). Cie guides to insects of importance to man. Betts, C.R. ed. Wallinford, Oxon, U.K.: CAB International Institute of Entomology. British Museum of Natural History.

Palmer, J.M. y Mound, L. (1990). Thysanoptera. (241-242). In: Armoured scale insects: their biology, natural enemies and control, W. Helle. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

Reitz, S. y Funderburk, J. (2012). Management Strategies for Western Flower Thrips and the Role of Insecticides. En *Insecticides pests enginnering*. Londres; IntechOpen.

Reitz, S. R., Gao, Y. lin, y Lei, Z. ren. (2011). Thrips: Pests of Concern to China and the United States. *Agricultural Sciences in China*, *10*(6), 867–892. https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60073-4

Sevik, M. y Arli-Sokmen (2012). Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. *Phytoparasitica* (40): 87-93. https://doi.org/10.1007/s12600-011-0192-2

Surís, M., y González, C. (2008). Especies de trips asociadas a hospedantes de interés en las provincias habaneras. I. Plantas ornamentales. *Rev. Protección Veg.*, *23*(2), 80–84.

Vierbergen, G., y Mantel, W. P. (1991). Contribution to the knowledge of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae). *Entomologische Berichten*, *51*(1), 7–12.

Yalemar, J. A., Hara, A. H., Saul, S. H., Jang, E. B., y Moy, J. H. (2001). Effects of gamma irradiation on the life stages of yellow flower thrips, *Frankliniella schultzei* (Trybom) (Thysanoptera: Thripidae). *Annals of Applied Biology*, *138*(3), 263–268. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00111.x

4. Detección del Virus de la Mancha Necrótica de Impatiens (INSV) en trips y plantas ornamentales mediante RT-LAMP

4.1 Resumen

El virus fitopatógeno INSV es transmitido por trips y es capaz de infectar un gran número de cultivos, causando enormes pérdidas tanto en hortalizas como en ornamentales. El objetivo de este trabajo fue mejorar la detección del virus INSV en diferentes especies de plantas ornamentales, por lo que se colectaron muestras tanto de trips como de plantas *de Impatiens balsamina* (balsamina), *Impatiens hawkeri* (belén), *Catharanthus roseus* (vinca), *Cyclamen persicum* (ciclamen) y *Pelargonium hortorum* (geranio) con síntomas de virosis y mediante la técnica de RT-PCR se identificaron muestras positivas que se usaron para estandarizar la técnica de RT-LAMP. Los resultados muestran que el empleo del RT-LAMP permite la detección del virus de una forma más simple y de 60 veces más sensible que el RT-PCR.

Palabras clave: Amplificación Isotérmica mediada por bucle, RT-PCR, diagnostico, virus.

4.2 Abstract

The phytopathogenic impatiens necrotic spot virus (INSV) is transmitted by thrips and its capable of infecting many crops, causing huge losses in both vegetables and ornamentals. The aim of this work was to improve the detection of INSV virus in different species of ornamental plants. Therefore, samples of thrips as well as *de Impatiens balsamina* (rose balsam), *Impatiens hawkeri* (New Guinea impatiens), *Catharanthus roseus* (periwinkle), *Cyclamen persicum* (cyclamen) and *Pelargonium hortorum* (geranium) plants with symptoms of viruses were collected and positive samples were identified by RT-PCR technique and used to standardize the RT-LAMP technique. The results show that the use of RT-LAMP allows the detection of the virus in a simpler way and 60 times more sensitive than RT-PCR.

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification, RT-PCR, diagnostic, virus

4.3 Introducción

El virus fitopatógeno de la mancha necrótica de Impatiens (Impatiens necrotic spot virus, INSV) es miembro del género *Tospovirus*, el cual pertenece a la familia *Tospoviridae* dentro del orden *Bunyavirales*. Este género se estaba formado únicamente por el virus del bronceado del tomate (TSWV), eventualmente se agregó a la familia el TSWV-I que hoy en día se conoce como INSV (Martínez-Ochoa *et al*., 2003). El INSV es transmitido de forma persistente-propagativa mediante tisanópteros (Thysanoptera) llamados comúnmente trips, principalmente de la especie *Frankliniella occidentalis* (Pergande), aunque también se ha reportado la transmisión por *Frankliniella intonsa* (Trybom) (Sakurai *et al*., 2004) y *Frankliniella fusca* (Hinds) (Naidu, *et al*., 2001) pero de forma menos eficiente. La gama de hospederos de INSV incluye alrededor de 300 especies de plantas (Zhao *et al*., 2018), aunque era considerado un patógeno principalmente de plantas ornamentales, en años recientes ha ocasionado pérdidas en cultivos hortícolas, por ejemplo, en 2009, en la costa de California la incidencia de esta enfermedad en campos individuales de lechuga alcanzó hasta un 27 %, lo que resultó en pérdidas económicas sustanciales (Kuo *et al*., 2014). Este virus es adquirido únicamente por estadios larvales, a partir de este momento, el virus queda dentro del insecto y podrá transmitirlo por el resto de su vida; contrariamente, los trips adultos que se alimentan directamente de material vegetal infectado no pueden transmitir el virus (Whitfield *et al*., 2005).

Para la detección de INSV en tejidos vegetales se ha utilizado métodos serológicos y moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) principalmente (Elliott *et al*., 2009; Blockley y Mumford, 2001; Wells *et al*., 2001). Aunque el diagnóstico en plantas es importante, el conocer si la población de trips presentes en el cultivo portan el virus es trascendental, ya que uno de los factores más relevantes en la propagación de enfermedades virales es el control de los vectores. Para detectar virus en trips se han empleado técnicas como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Srinivasan *et al*., 2012); reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Mason *et al*., 2003) y

RT-PCR en tiempo real (Boonham *et al*., 2002; Rotenberg *et al*., 2009). Si bien, las técnicas moleculares ofrecen ventajas, también es cierto que aún presentan algunos inconvenientes como el requerimiento de equipo especializado y costoso (Caruso *et al*., 2023). Una alternativa que no necesita el uso de estos equipos, y que además es altamente específica y sensible es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la cual utiliza la actividad de desplazamiento de cadena de la ADN polimerasa Bst de *Bacillus stearothermophilus* para amplificar el ácido nucleico objetivo. Este tipo de PCR utiliza como mínimo cuatro iniciadores, dos externos (F3 y B3) y dos internos (FIP y BIP), estos últimos contienen secuencias en sentido y antisentido del ADN objetivo, lo que permitirá la formación de un bucle durante la reacción. Dentro de los extremos del ADN blanco se encuentran las regiones F2c y B2; dos secuencias internas a una distancia de 40 nucleótidos de los extremos F2c y B2 llamadas F1c y B1; y dos secuencias externas a los extremos F2c y B2 designadas F3c y B3. De esta forma, las secuencias del iniciador FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia complementaria a F2c (F2); por otro lado, el iniciador BIP contiene la secuencia complementaria a B1 (B1c), un espaciador de TTTT y a B2. Mientras que los dos iniciadores externos contienen a B3 y la secuencia complementaria a F3c, respectivamente (Notomi *et al*., 2000). La sensibilidad del ensayo se puede aumentar si se utiliza un par de iniciadores más llamados BL y FL (Nagamine *et al*., 2002).

El primer paso en la reacción LAMP es la hibridación del iniciador FIP con su secuencia complementaria (región F2c) en la secuencia blanco e inicia la síntesis de la cadena complementaria. Enseguida el iniciador F3 se hibrida a su región complementaria (F3c), lo que lleva al desplazamiento de la hebra unida a FIP y se produce una estructura de bucle en un extremo. A continuación, BIP se une a la región complementaria (B2) en la cadena unida a FIP e inicia la síntesis de otra cadena. La nueva hebra se desplaza durante la síntesis con B3, lo que da lugar a una estructura en forma de mancuerna, que se convierte en una estructura de tallo-bucle mediante autocebado. Esta estructura actúa como plantilla para el paso de amplificación cíclica de LAMP. Las regiones F3c y B3c están ausentes en la estructura de tallo-bucle y, por

lo tanto, los iniciadores F3 Y B3 ya no son necesarios para la fase cíclica de la amplificación LAMP (Notomi *et al*., 2000).

Las reacciones LAMP se pueden acoplar con una transcriptasa inversa (RT-LAMP) para transcribir una secuencia de ARN en ADN de cadena sencilla (cDNA), la cual servirá como plantilla para la síntesis de nuevas cadenas (Bhat *et al*., 2022). La visualización del producto de las reacciones LAMP se puede observar mediante la turbidez, cambio de color, agregando intercalante fluorescente a la reacción, o en geles de agarosa (Hasiów-Jaroszewska y Borodynko, 2013; Sarkes *et al*., 2020; Tanner *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2022).

RT-LAMP ofrece ventajas sobre RT-PCR ya que se lleva a cabo en menos tiempo, es más económica, además de no requerir termociclador (Romero *et al*., 2019). En este artículo se reporta la aplicación de la técnica RT-LAMP como una alternativa molecular alternativa altamente sensible, específica, y rápida para la detección de INSV en trips y plantas ornamentales.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Muestreo de plantas y trips

Se realizaron muestreos durante los meses septiembre, octubre y noviembre de 2022, y en abril de 2023 de plantas de *I. balsamina*, *I. hawkeri*, *C. roseus*, y *P. hortorum* en dos unidades de producción localizadas en el Estado de Morelos. Se tomaron muestras de las hojas con síntomas típicos de virosis tales como manchas de color marrón o amarillo; deformación de las hojas; manchas necróticas en tallo; clorosis; mosaicos; manchas anulares de color púrpura oscuro en las hojas; y patrones de anillos; también se tomaron muestras de plantas que no presentaban síntomas de enfermedad (**Figura 4.1**). Las muestras fueron colocadas en toallitas de papel en bolsas de plástico y etiquetadas, se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Dinámica Celular-Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIDC-UAEM) donde se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. De las mismas plantas muestreadas se capturaron trips con un aspirador entomológico, los

cuales también fueron trasladados al laboratorio y conservados a la misma temperatura.

4.1a

4.1b

Figura 4.1. Plantas muestreadas.
4.1a. Plantas sin síntomas aparentes de virosis. **a)** *I. hawkeri*; **b)** *C. roseus*; **c)** *I. balsamina*; **d)** *P. hortorum*; **e)** *C. persicum*. **4.1b.** Plantas con síntomas de virosis: **a,b,f)** *I. hawkeri*, **c,d)** *I. balsamina* **e)** *C. roseus*; **g)** *P. hortorum*; **h)** *C. persicum.*

4.4.2 Extracción de ARN de plantas y trips

La extracción de ARN para plantas se llevó a cabo con diferentes métodos: para *I. balsamina* y *P. hortorum* se empleó el protocolo establecido por Michel-López *et al*.

(2018) con algunas modificaciones: en un tubo de microcentrífuga se maceraron aproximadamente 100 mg de muestra congelada en nitrógeno líquido, se agregaron 700 µl de buffer de extracción (0.25 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 % PVP (w/v), 1 % SDS (w/v)) y 700 µl de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex por 30 s, posteriormente se centrifugó 4 min a 12,800 rpm, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:1:1), se centrifugó y transfirió la fase acuosa, se repitió la extracción, se agregó 10 % de acetato de sodio del volumen de la muestra y dos volúmenes de etanol al 100 %, se incubó 1 hora a -20 °C, se centrifugó 30 min, finalmente se realizaron tres lavados con etanol al 75 %, la pastilla fue diluida en agua y se incubó 10 min a 60 °C. La extracción de ARN de *C. roseus* fue con el reactivo Trizol, siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente, para la obtención de ARN de *I. hawkeri* y *C. persicum*, se utilizó el kit de Monarch® Total RNA Miniprep Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (NEB, 2023), y adicionando al buffer de lisis PVP al 4 %.

Para la extracción de ARN de los trips se siguió el protocolo de Boonham *et al*. (2002) aplicando algunas modificaciones: de 30-40 trips adultos se molieron en un tubo de microcentrífuga con 50 µl de buffer de extracción que contienía Tris-HCl 200 mM (pH 8.5), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS al 0.5 % (p/v), se agregaron 450 µl más del mismo buffer, la precipitación se efectuó agregando 25 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2). Los tubos se incubaron a -20 °C durante 90 min, posteriormente se centrifugaron durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de isopropanol (-20 °C). El contenido de los tubos se mezcló y se incubaron 30 min a -20 °C. Después se centrifugaron por 30 min, el sedimento se lavó con etanol al 70 % tres veces, se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y finalmente se resuspendió en 25 µl de agua.

La cuantificación de ARN se realizó en un espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX a 260 nm. Para corroborar la integridad del ARN se realizaron geles de agarosa al 1 %, los cuales se corrieron por 45 min a 50 V.

4.4.3 Condiciones de RT-PCR

La síntesis del cDNA se llevó a cabo en una reacción que contenía 2 µl de ARN, 2 µl de oligo dT (50 µM), 2 µl de buffer M-MuLV (10X), 1 µl de enzima M-MuLV (200 U/µl), 1 µl de dNTPs (10 mM), en un volumen de 20 µl; la mezcla se incubó a 42 °C por 60 min, posteriormente se inactivó la enzima a 65 °C por 20 min.

El cDNA obtenido de la reacción anterior se utilizó para la PCR, la cual contenía 2.5 µl del buffer de extracción, 0.65 µl de cada iniciador (10 µM), 2 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2.5 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.5 µl de Taq polimerasa y 2 µl de cDNA. Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la PCR tanto para detectar INSV en plantas como en trips fueron las siguientes: desnaturalización inicial en 94 °C durante 5 min; 35 ciclos a 94 °C durante 60 s, 60 s a 54 °C y 60 s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Almasi y Almasi, 2018), las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de detección CFX96™. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

4.4.4 Condiciones de RT-LAMP

Las reacciones de RT-LAMP se prepararon en un volumen de 12.5 µl que contenía 6.25 µl de WarmStart RT-LAMP 2X Master Mix, 0.25 µl del colorante fluorescente (50X), 1.25 µl de la mix de iniciadores para RT-LAMP (10X), 1 µl de cDNA, 3.75 µl de agua. Se incubaron a 65 °C por 240 ciclos de 15 s, aproximadamente 1 h en un sistema de deteccion CFX96™, para la lectura de la flourescencia se utilizó el software CFX Manager™. Los iniciadores utilizados para la identificación de INSV se muestran en el **Cuadro 4.1** (Almasi y Almasi, 2018). Los productos obtenidos en esta reacción se observaron mediante un gel de agarosa, además se observó la fluorescencia de los tubos al exponerlos a luz ultravioleta.

4.4.5 Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

Para establecer la sensibilidad en la detección de INSV mediante RT-PCR y RT-LAMP, se determinó la concentración de cDNAs individuales de las muestras positivas y posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:1. Las condiciones de

las reacciones de RT-PCR y RT-LAMP fueron las mismas que anteriormente se describieron.

Cuadro 4.1. Oligonucleótidos específicos para identificación de INSV.

Iniciadores	Secuencia
INSV_F	TGATAAATAGCCAGAACTAG
INSV_R	ACTCAAAATGAAGGATCTTT
INSV_FIP	AATGGATCGGCTCTGACTGATTTTTTGAGGCAATCAAAGGGTGAC
INSV_BIP	ACCATTGCATCAAGTCTTCGTTTTTAGAAACAATTCAGAAAGAGT

4.5 Resultados

4.5.1 Identificación de INSV por RT-PCR

Se realizó la extracción individual de ARN de plantas, así como la síntesis de cDNA, para eficientar la detección de virus se realizaron *pools* de cDNAs de 10 plantas (5 juegos por especie) para llevar a cabo las PCRs. De los grupos de plantas que dieron resultados positivos, se procedió al análisis individual por PCR. Esta estrategia de optimización en la detección de los virus tuvo como resultado una disminución significativa de los reactivos, consumibles y recursos.

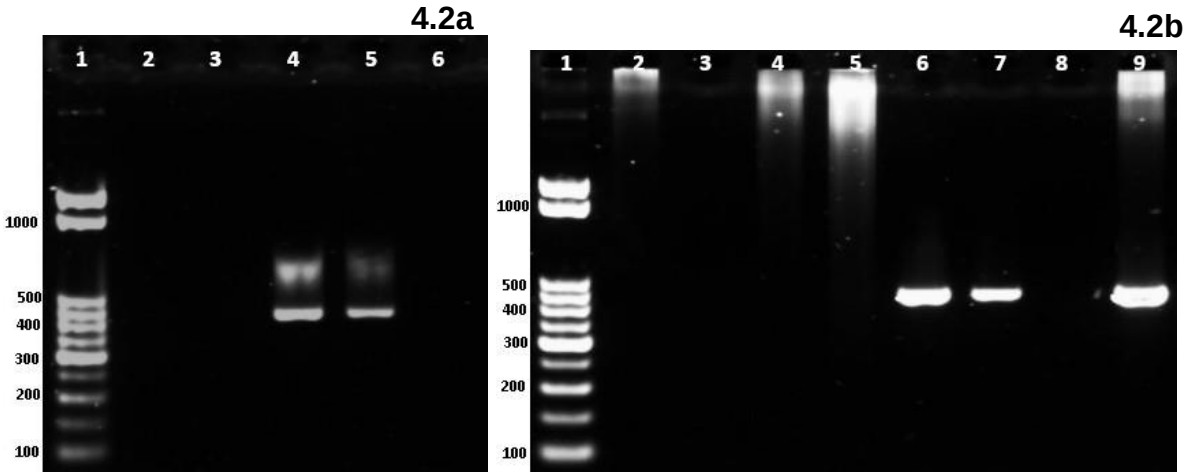


Figura 4.2. Identificación de INSV en plantas y trips mediante RT-PCR.

4.2a. Identificación de INSV en plantas de *I. hawkeri*: 1) Marcador de peso molecular; 2-5) Muestras de *I. hawkeri*; 6) Control negativo**. 4.2b.** Identificación de INSV en trips: 1) Marcador de peso molecular; 2) Trips colectados en *C. roseus*; 3) Trips colectados en *I. balsamina*; 4) Trips colectados en *I. hawkeri*; 5) Trips colectados en *P. hortorum*; 6) Trips colectados en *C. persicum*; 7) Trips colectados en *I. hawkeri*; 8) Control negativo, 9) Control positivo.

INSV fue detectado únicamente en plantas de *I. hawkeri* (**Figura 4.2a**), así como en los trips colectados en este cultivo (**Figura 4.2b**). También se detectó la presencia del INSV en trips colectados en plantas de *C. persicum*, aunque en este caso el virus no fue detectado en el tejido de la planta. El resultado fue negativo para todas las muestras de los cultivos de *C. persicum*, *C. roseus*, *I. balsamina* y *P. hortorum*, así como para los trips colectados en estas plantas, excepto los de *C. persicum*.

4.5.2 Identificación de INSV por RT-LAMP

Con las muestras de plantas y de trips identificadas como positivas a INSV en RT-PCR, se procedió a estandarizar la reacción de RT-LAMP. En la **Figura 4.3** se muestra la detección de INSV en cDNAs de plantas (1 y 3) así como en cDNAs de trips (2 y 4), el control negativo fue cDNA de planta sana (5). La **Figura 4.3** muestra la detección precisa de las cuatro muestras positivas, tanto las de plantas como las de trips y cero detecciones en el control negativo. La amplificación comienza a partir de los 30 min de incubación hasta los 50 min, se presentan diferencias en los tiempos de detección en las muestras analizadas, lo cual probablemente se deba a las variaciones en las cargas virales presentes en cada una de las muestras.

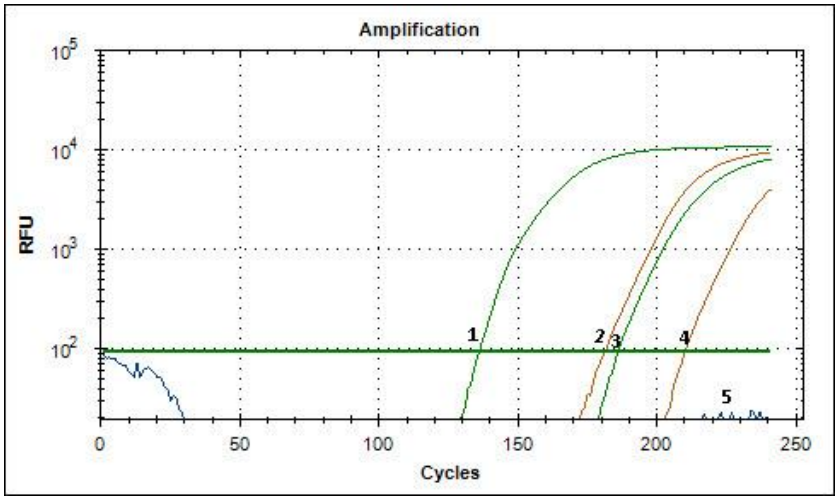
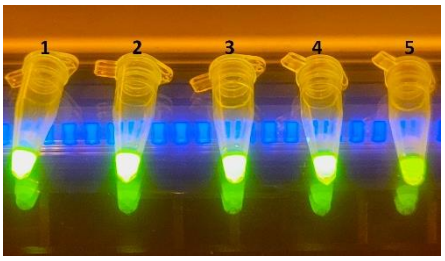


Figura 4.3. Identificación de INSV mediante RT-LAMP

1,3) cDNA de I. hawkeri; 2,4) cDNA de trips; 5) control negativo.

Las muestras positivas en RT-LAMP se observaron con luz UV (**Figura 4.4a**), y los resultados se corroboraron con un gel de agarosa para observar los productos amplificados (**Figura 4.4b**). Una vez conociendo el tiempo adecuado de incubación, la reacción se puede llevar a cabo en un baño María y observar los resultados simplemente con luz UV, sin la necesidad del equipo para detectar fluorescencia.

4.4a



4.4b

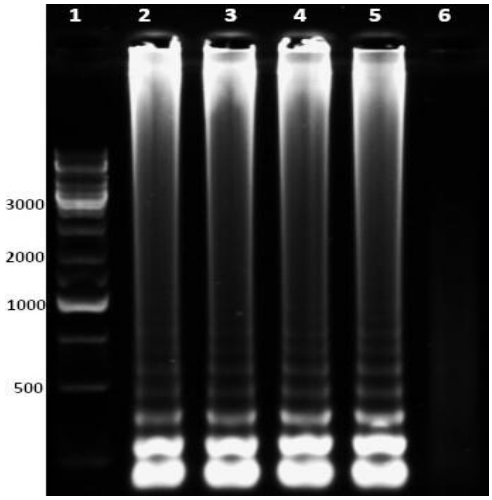


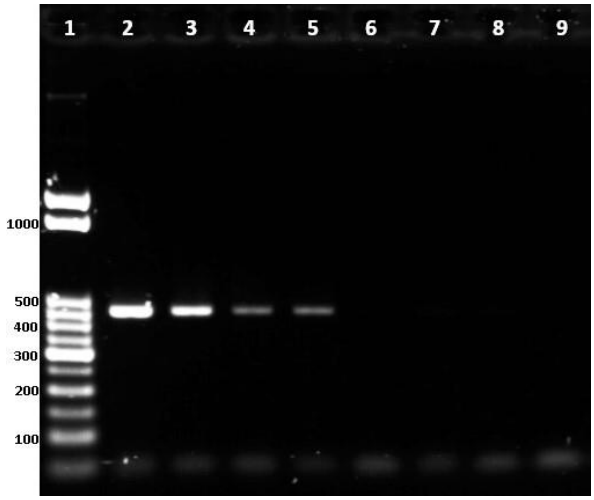
Figura 4.4. Visualización de reacción RT-LAMP.

4.4a. Visualización de reacción RT-LAMP en luz UV. 1-4) Muestras positivas, 5) Control negativo. **4.4b.** Visualización de productos amplificados por RT-LAMP en gel de agarosa. 1) Marcador de peso molecular; 2-5) Muestras positivas; 6) Control negativo.

4.5.3 Comparación de la sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

Para establecer la sensibilidad en la detección de INSV mediante RT-PCR y RT-LAMP se realizaron diluciones seriadas 1:1 a partir del cDNA. En la **Figura 4.5a** se muestran los resultados de la detección de INSV por RT-PCR, en donde se observa claramente una banda hasta una concentración de 0.187 mg/ml, por otro lado, mediante RT-LAMP se observó la detección del virus hasta una concentración 60 veces menor (0.003 mg/ml) (**Figura 4.5b**). Estos resultados muestran que la sensibilidad de la técnica de RT-LAMP es mayor que la obtenida con RT-PCR.

4.5a



4.5b

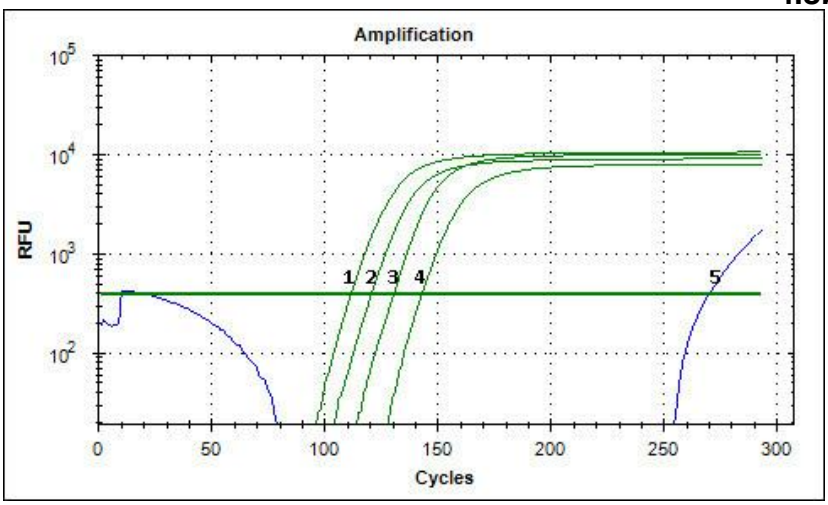


Figura 4.5. Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP.

4.5a. Detección de INSV mediante RT-PCR usando diferentes concentraciones de cDNA: 1) Marcador de peso molecular; 2) 1.5 mg/ml; 3) 0.7 mg/ml; 4) 0.375 mg/ml; 5) 0.187 mg/ml; 6) 0.093 mg/ml; 7) 0.046 mg/ml; 8) 0.023 mg/ml; 9) 0.011 mg/ml. **4.5b.** Detección de INSV mediante RT-LAMP usando diferentes concentraciones de cDNA: 1) 0.052 mg/ml; 2) 0.026 mg/ml; 3) 0.013 mg/ml; 4) 0.003 mg/ml; 5) control negativo.

4.6 Discusión

INSV es un virus que afecta más de 300 especies de plantas y con una amplia distribución geográfica (Zhao *et al*., 2018). Para la detección de INSV en plantas y trips se han empleado técnicas como ELISA (Wells *et al*., 2001; Sakurai *et al*., 2004) y RT-

PCR (Boonham *et al*., 2002; Nekoduka *et al*., 2015), si bien, las técnicas moleculares son más sensibles que las serológicas, en los últimos años, se ha reportado que la técnica molecular RT-LAMP es aún más más sensible, rápida y económica que RT-PCR (Sarkes *et al*., 2020). En este estudio determinamos que de 30-50 min son suficientes para detectar la amplificación del producto, no obstante, se han reportado tiempos más cortos de hasta 10-12 min para la amplificación de otros virus mediante RT-LAMP (Fukuta *et al*., 2013; Suzuki *et al*., 2016; Tahzima *et al*., 2019). De acuerdo con Nagamine *et al*. (2002) para reducir el tiempo de reacción se pueden utilizar los iniciadores de bucle (BL y FL). Por otro lado, también se han reportado tiempos mayores, de 60 y 75 min para la amplificación en RT-LAMP (Banerjee *et al*., 2016; Liu *et al*., 2019; Kokane *et al*., 2021), sin embargo, este tiempo no supera el que normalmente se llevaría el realizar una RT-PCR que es de aproximadamente 3 h (Sarkes *et al*., 2020).

La temperatura óptima sugerida para la amplificación en RT-LAMP es de 65°C, la cual fue utilizada en este trabajo, aunque esta temperatura puede ser menor a los 65°C (Suzuki *et al*., 2016; Sui *et al*., 2018; Tiberini *et al*., 2019), o mayor (Tahzima *et al*., 2019) y amplificar el producto, sin embargo, a temperaturas muy elevadas podría causar la inactivación de la enzima o la inestabilidad de la reacción que podría afectar la estabilidad, sensibilidad y fuerza de la detección (Wei *et al*., 2012). Además de la temperatura, el tiempo de incubación también es importante en análisis RT-LAMP, a 65°C durante 30 min observamos amplificación de producto, estos resultados coinciden con los reportados por Zhang *et al*., (2011) quien detectó Wheat yellow mosaic virus mediante RT-LAMP a 65°C con un periodo de incubación de 30-45 min.

Los resultados obtenidos mediante RT-LAMP para identificación de INSV encontramos que la sensibilidad fue 60 veces mayor que en RT-PCR, en otros ensayos realizados con virus como Tomato chlorotic spot ortho*Tospovirus* han encontrado que RT-LAMP es 10 veces más sensible que RT-PCR (Sui *et al*., 2018); pero para virus como Citrus leaf blotch virus, Tomato brown rugose fruit virus, *y Wheat yellow mosaic virus* la sensibilidad fue de hasta 100 veces mayor que RT-PCR (Zhang *et al*., 2011;

Liu *et al*., 2019; Sarkes *et al*., 2020), mientras que para Bean pod mottle virus, Apple mosaic virus y Prunus necrotic ringspot *virus* se alcanzó una sensibilidad de 1,000 veces más sobre RT-PCR (Wei *et al*., 2012; Wani *et al*., 2023).

El diagnóstico de virosis se realiza comúnmente en tejido vegetales, en este estudio además de identificar INSV en plantas también se efectuó en trips, los cuales son los vectores naturales de este virus. Este hallazgo propone que mediante el análisis y detección de INSV en la población de trips se podrán adoptar prácticas de manejo y control tempranas para evitar la propagación del virus en el cultivo. RT-LAMP también se ha utilizado para identificar virus en áfidos (Aphidoidea) (Raigond *et al*., 2020).

Para una alerta temprana y control de enfermedades virales, es crucial contar con un método de detección rápido, preciso y con alta especificidad, RT-LAMP ha demostrado ser una técnica con estas características, además de evitar el uso de equipos costos como los termocicladores. RT-LAMP podría emplearse como técnica de diagnóstico rutinario de virus fitopatógenos y sus vectores.

4.7 Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que es conveniente realizar la estrategia de agrupamiento (*pooling*) de muestras descrita en este trabajo, ya que permitió el análisis masivo de muestras y la identificación precisa de las muestras infectadas con los virus, todo esto con una reducción del 30 % en la inversión económica necesaria para el análisis.

La técnica de RT-LAMP demostró ser una herramienta altamente sensible y rápida para la detección de INSV tanto en muestras de tejido vegetal como en trips, superando significativamente la sensibilidad y el tiempo requerido en comparación con RT-PCR. La detección de INSV en trips, incluso cuando las plantas son negativas al virus, sugiere un riesgo potencial de transmisión y destaca la importancia de la vigilancia temprana de los vectores para implementar medidas preventivas eficaces en

la protección de cultivos. La aplicación de RT-LAMP como técnica de diagnóstico rutinario para INSV y otros virus fitopatógenos se muestra prometedora, ofreciendo resultados confiables con ventajas significativas en términos de sensibilidad, rapidez y costo en comparación con las técnicas convencionales de diagnóstico. Esto sugiere su potencial para mejorar la capacidad de respuesta ante brotes virales en la agricultura.

4.8 Referencias

Almasi, M. A., y Almasi, G. (2018). Colorimetric immunocapture loop mediated isothermal amplification assay for detection of Impatiens necrotic spot virus (INSV) by GineFinder™ dye. *European Journal of Plant Pathology*, *150*(2), 533–538. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1294-6

Banerjee, A., Roy, S., Sharma, S. K., Dutta, S. K., Chandra, S., y Ngachan, S. V. (2016). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of chilli veinal mottle virus. *Archives of Virology*, *161*(7), 1957–1961. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2850-7

Bhat, A. I., Aman, R., y Mahfouz, M. (2022). Onsite detection of plant viruses using isothermal amplification assays. *Plant Biotechnology Journal*, *20*(10), 1859–1873. https://doi.org/10.1111/pbi.13871

Blockley, A. L., y Mumford, R. A. (2001). Identification and isolation of Impatiens necrotic spot virus from prickly pear cactus (Opuntia microdasys). *Plant Pathology*, *50*(6), 805. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00628.x

Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., y Barker, I. (2002). The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, *101*(1–2), 37–48. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9

Caruso, A. G., Ragona, A., Bertacca, S., Montoya, M. A. M., Panno, S., y Davino, S. (2023). Development of an In-Field Real-Time LAMP Assay for Rapid Detection of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus. *Plants*, *12*(7). https://doi.org/10.3390/plants12071487

Elliott, D. R., Lebas, B. S. M., Ochoa-Corona, F. M., Tang, J., y Alexander, B. J. R. (2009). Investigation of Impatiens necrotic spot virus outbreak in New Zealand in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, *38*, 490–495.

Fukuta, S., Tamura, M., Maejima, H., Takahashi, R., Kuwayama, S., Tsuji, T., Yoshida, T., Itoh, K., Hashizume, H., Nakajima, Y., Uehara, Y., y Shirako, Y. (2013). Differential detection of Wheat yellow mosaic virus, Japanese soil-borne wheat mosaic virus and Chinese wheat mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods*, *189*(2), 348–354. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.005

Hasiów-Jaroszewska, B., y Borodynko, N. (2013). Detection of Pepino mosaic virus isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology*, *158*(10), 2153–2156. https://doi.org/10.1007/s00705-013-1706-7

Kokane, A. D., Kokane, S. B., Warghane, A. J., Gubyad, M. G., Sharma, A. K., Reddy, M. K., y Ghosh, D. K. (2021). A rapid and sensitive reverse transcription–loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of indian citrus ringspot virus. *Plant Disease*, *105*(5), 1346–1355. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE

Kuo, Y. W., Gilbertson, R. L., Turini, T., Brennan, E. B., Smith, R. F., y Koike, S. T. (2014). Characterization and epidemiology of outbreaks of impatiens necrotic spot virus on lettuce in Coastal California. *Plant Disease*, *98*(8), 1050–1059. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0681-RE

Liu, H., Wu, W., Tan, J., Li, Y., Mi, W., Jiang, L., y Wu, Y. (2019). Development and evaluation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of Citrus leaf blotch virus. *Journal of Virological Methods*, *270*, 150–152. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.009

Martínez-Ochoa, N., Csinos, A. S., Whitty, E. B., Johnson, A. W., y Parrish, M. J. (2003). First Report on the Incidence of Mixed Infections of Impatiens necrotic spot virus (INSV) and Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Tobacco Grown in Georgia, South Carolina, and Virginia . *Plant Health Progress*, *4*(1), 33–34. https://doi.org/10.1094/php-2003-0417-01-

hn
Mason, G., Roggero, P., y Tavella, L. (2003). Detection of Tomato spotted wilt virus in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, *109*(1), 69–73. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00048-X

Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., y Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *9*(6), 1259–1267. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788

Nagamine, K., Hase, T., y Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, *16*(3), 223–229. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415

Nekoduka, S., Kobayashi, K., Fuji, S. I., Okuda, M., y Sano, T. (2015). Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *81*(6), 429–438. https://doi.org/10.1007/s10327-015-0615-x

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., y Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, *28*(12), e63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63

Raigond, B., Verma, A., Pathania, S., J, S., Kochhar, T., & Chakrabarti, S. K. (2020). Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of potato virus a in potato and in insect vector aphids. *Crop Protection*, *137*(June). https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105296

Romero Romero, J. L., Carver, G. D., Arce Johnson, P., Perry, K. L., y Thompson, J. R. (2019). A rapid, sensitive and inexpensive method for detection of grapevine red blotch virus without tissue extraction using loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology*, *164*(5), 1453–1457. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04207-y

Rotenberg, D., Kumar, N. K. K., Ullman, D. E., Montero-Astúa, M., Willis, D. K., German, T. L., y Whitfield, A. E. (2009). Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. *Phytopathology*, *99*(4), 404–410. https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0404

Sakurai, T., Inoue, T., y Tsuda, S. (2004). Distinct efficiencies of Impatiens necrotic spot virus transmission by five thrips vector species (Thysanoptera: Thripidae) of *Tospovirus*es in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, *39*(1), 71–78. https://doi.org/10.1303/aez.2004.71

Sarkes, A., Fu, H., Feindel, D., Harding, M., y Feng, J. (2020). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *PLoS ONE*, *15*(6), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230403

Srinivasan, R., Sundaraj, S., Pappu, H. R., Diffie, S., Riley, D. G., y Gitaitis, R. D. (2012). Transmission of iris yellow spot virus by *Frankliniella fusca* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, *105*(1), 40–47. https://academic.oup.com/jee/article/105/1/40/844825?login=false

Sui, X., Zhang, S., Wu, Z., y Ling, K. S. (2018). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for species-specific detection of tomato chlorotic spot ortho*Tospovirus*. *Journal of Virological Methods*, *253*(December), 56–60. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.002

Suzuki, R., Fukuta, S., Matsumoto, Y., Hasegawa, T., Kojima, H., Hotta, M., y Miyake, N. (2016). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of Chrysanthemum stem necrosis virus in chrysanthemum and tomato. *Journal of Virological Methods*, *236*, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.005

Tahzima, R., Foucart, Y., Peusens, G., Beliën, T., Massart, S., y De Jonghe, K. (2019). New sensitive and fast detection of Little cherry virus 1 using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*, *265*, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.019

Tanner, N. A., Zhang, Y., y Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, *58*(2), 59–68. https://doi.org/10.2144/000114253

Tiberini, A., Tomlinson, J., Micali, G., Fontana, A., Albanese, G., y Tomassoli, L. (2019). Development of a reverse transcription-loop- mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of onion yellow dwarf virus. *Journal of Virological Methods*, *271*. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113680

Wani, L. A., Jawa, P., y Khan, J. A. (2023). Development of one step colorimetric RT-LAMP assays for rapid detection of Apple mosaic virus and Prunus necrotic ringspot virus. *Journal of Virological Methods*, *316*(March), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114729

Wei, Q. W., Yu, C., Zhang, S. Y., Yang, C. Y., Miriam, K., Zhang, W. N., Dou, D. L., y Tao, X. R. (2012). One-step detection of Bean pod mottle virus in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, *9*(187), 1. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-187

Wells, M. L., Pappu, H. R., Culbreath, A. K., Todd, J. W., y Brown, S. L. (2001). Field Survey of Impatiens Necrotic Spot Virus in Georgia Peanut. *Peanut Science*, *28*(1), 34–37. https://doi.org/10.3146/i0095-3679-28-1-9

Whitfield, A. E., Ullman, D. E., y German, T. L. (2005). *Tospovirus*-thrips interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(February 2005), 459–489. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017

Zhang, J., Hou, Q., Ma, W., Chen, D., Zhang, W., Wubshet, A. K., Ding, Y., Li, M., Li, Q., Chen, J., Dai, J., Wu, G., Zhang, Z., Zaberezhny, A. D., Pejsak, Z., Tarasiuk, K., Zafar Khan, M. U., Wang, Y., He, J., y Liu, Y. (2022). A Naked-Eye Visual Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification with Sharp Color Changes for Potential Pen-Side Test of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Viruses*, *14*(9). https://doi.org/10.3390/v14091982

Zhang, Z.-Y., Liu, X.-J., Li, D.-W., Yu, J.-L., y Han, C.-G. (2011). Rapid detection of turnip mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, *8*(550). https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-422X-8-55012227

Zhao, K., Margaria, P., y Rosa, C. (2018). Characterization of the first complete genome sequence of an Impatiens necrotic spot ortho*Tospovirus* isolate from the United States and worldwide phylogenetic analyses of INSV isolates. *BMC Research Notes*, *11*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s13104-018-3395-5

5. RT-LAMP y RT-PCR para detectar TSWV en plantas ornamentales y trips

5.1 Resumen

El virus del bronceado del tomate (TSWV) está considerado dentro de los virus más letales en todo el mundo, llegando a ocasionar pérdidas de hasta 1 billón de dólares en cultivo de tomate. Al no contar con medidas curativas para enfermedades virales un método de detección rápida para el diagnóstico del TSWV es la clave para evitar la diseminación de los virus. En este trabajo se propone el uso de las técnicas RT-PCR y RT-LAMP para la detección de TSWV en plantas ornamentales: *Impatiens balsamina*, *Impatiens hawkeri*, *Catharanthus roseus, Cyclamen persicum* y *Pelargonium hortorum*, así como en trips. Los iniciadores para la identificación de TSWV se diseñaron con base en las secuencias conservadas del gen de la proteína de cubierta del TSWV. Mediante RT-PCR se detectó el virus solo en plantas de *I. hawkeri*, y para la corroboración con RT-LAMP se utilizaron dos kits, uno a base de detección de fluorescencia, con el cual el tiempo de amplificación fue de 25 min para ambos tipos de muestras, mientras que con el kit colorimétrico el tiempo aumento hasta los 75 min para trips, para plantas no se obtuvieron resultados certeros. Además, se identificaron molecularmente las especies de trips presentes en las plantas muestreadas.

Palabras clave: *Impatiens hawkeri,* virus, diagnóstico.

5.2 Abstract

The tomato spot wilt virus (TSWV) is considered one of the most lethal viruses in the world, causing losses of up to 1 billion dollars in tomato crops. As there are no curative measures for viral diseases, a rapid detection method for the diagnosis of TSWV is the key to avoiding the spread of viruses. In this work, the use of RT-PCR and RT-LAMP techniques is proposed for the detection of TSWV in ornamental plants: *Impatiens balsamina, Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus, Cyclamen persicum* and *Pelargonium hortorum,* as well as in thrips. Primers for TSWV identification are

designed based on the conserved sequences of the TSWV coat protein gene. Using RT-PCR, the virus was detected only in *I. hawkeri* plants, and for corroboration with RT-LAMP, two kits were used, one based on fluorescence detection, with which the amplification time was 25 min for both. types of samples, while with the colorimetric kit the time increased to 75 min for trips, for plants no accurate results were obtained. In addition, the thrips species present in the sampled plants were molecularly identified.

Key words: *Impatiens hawkeri,* virus, diagnosis.

5.3 Introducción

La cantidad de virus fitopatógenos es enorme, sin embargo, el virus del bronceado del tomate (TSWV) es uno de los 10 virus vegetales más devastadores económicamente debido a la naturaleza ubicua de su vector (trips) y al rango de hospederos extremadamente amplio, características que han hecho que su control y erradicación no sea fácil (Scholthof *et al*., 2011). Este virus ha ocasionado la reducción del 42.1 % y del 95.5% en el rendimiento y el valor comercial del tomate, respectivamente, originando grandes pérdidas económicas que han alcanzado hasta el billón de dólares alrededor del mundo; por otro lado, en cacahuate las pérdidas han sido de 40 millones de dólares en Georgia (Culbreath *et al*., 2003; Sevik y Arli-Sokmen, 2012).

El TSWV se describió por primera vez en Australia, es transmitido de manera persistente propagativa por trips de los géneros *Frankliniella* y *Thrips*, siendo *F. occidentaIis* el vector principal debido a su amplia distribución geográfica y su eficacia en la transmisión del virus (Patil, 2021; Scholthof *et al*., 2011). Este virus se encuentra clasificado dentro del género *Tospovirus* en la familia Bunyaviridae; su genoma consta de tres moléculas lineales de ARN monocatenario denominadas ARN grande (L), ARN mediano (M) y ARN pequeño (S), los cuales se encuentran encapsulados por la proteína de la nucleocápside; sus viriones consisten en partículas esféricas de aproximadamente 80-120 nm de tamaño, envueltas por una membrana lipídica (**Figura 5.1.**) (Zarzyńska-Nowak *et al*., 2018).

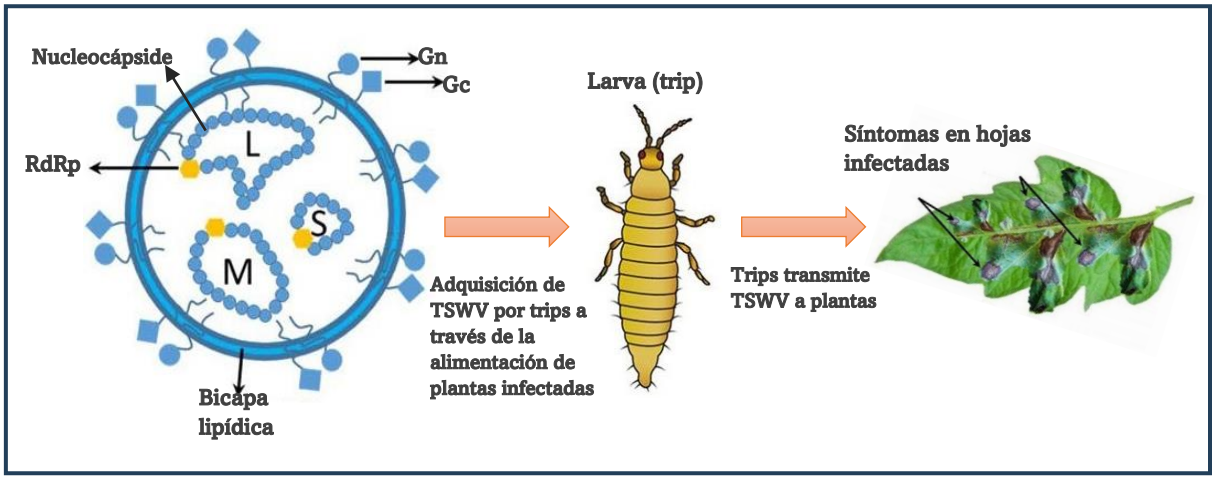


Figura 5.1. Estructura general de TSWV y descripción general de la infección en trips y plantas.

Fuente: Modificado de Gupta *et al*. (2018).

La distribución geográfica de TSWV es a nivel mundial y tiene una extensa gama de huéspedes que afecta a más 1,000 especies de plantas, incluidas las ornamentales (Asano *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2021), dentro de este grupo, las principales que afecta se encuentran los crisantemos, ciclamen, begonia, impatiens, gerbera y cineraria (Galipienso *et al*., 2014; Mitrofanova *et al*., 2018). Los síntomas que causa son diversos y estos dependen de la especie de planta, la cepa del virus, las condiciones ambientales y las etapas de desarrollo de la planta huésped, aunque son característicos lo anillos concéntricos en hojas y frutos, manchas anulares y cloróticas, patrones de líneas, moteados, retraso severo del crecimiento, atrofia y marchitez, la infección a largo plazo puede causar la muerte de la planta (Lee *et al*., 2021; Patil, 2021). Es importante mencionar y tener en cuenta que los síntomas ocasionados por *Tospovirus* pueden imitar otros síntomas y lesiones causadas por el estrés bióticos y abiótico, así como deficiencias de nutrientes, además de estar presentes incluso cuando las plantas no muestren síntomas (Kazinczi *et al*., 2007).

Los virus reducen la calidad de las plantas y actualmente no se cuenta con algún método que permita eliminarlos una vez que la ha infectado, es por ello que la

detección temprana de TSWV en los cultivos y sus vectores es indispensable para evitar su diseminación. Algunas técnicas de detección de TSWV en tejido vegetal que se han empleado son: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), amplificación de la recombinasa polimerasa con transcripción inversa combinado con tiras de flujo lateral (RT-RPA-LFS) (Karavina y Gubba, 2017; Lee *et al*., 2021; Riley *et al*., 2012; Zarzyńska-Nowak *et al*., 2018). Respecto a la detección de TSWV en trips se han utilizado las técnicas de ELISA y RT-PCR en tiempo real (Boonham *et al*., 2002; Cho, 1988). Actualmente, la RT-PCR es la más utilizada para detectar TSWV a pesar de requerir de equipos de laboratorio especiales como termocicladores, así como personal capacitado que los opere, estas son unas de las limitantes para su uso en el diagnóstico rápido y de campo, pero recientemente, se ha empleado la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección molecular sensible, rápida y específica de diversos patógenos como virus, bacterias y hongos (Hodgetts *et al*., 2015; Kokane *et al*., 2021; Lees *et al*., 2019). En el **Cuadro 5.1** se comparan las técnicas ELISA, PCR, y LAMP, en donde se muestra sus ventajas y desventajas.

Cuadro 5.1. Comparación de las técnicas ELISA, PCR y LAMP.

	ELISA	PCR	LAMP
Fortalezas	Sensible Altamente productivo económico Apropiado para el diagnóstico de rutina	Altamente sensible Medianamente económico	Más sensible que PCR Rápido Eficiente Económico
Debilidades	Requiere antisueros de alta calidad Costoso para una pequeña cantidad de muestras	Se requiere de un termociclador Reactivos costosos	Restricciones en diseño de iniciadores

Detección en campo	Si	No	Si
Tiempo de respuesta	30 min-2 h	3 h	30-60 min

La técnica de LAMP se basa en el principio de desplazamiento de cadena y en la actividad autocíclica de la ADN polimerasa Bst de *Bacillus stearothermophilus*; utiliza ADN o ARN (RT-LAMP) como molde; se requieren de 4 iniciadores para llevar a cabo la reacción, dos internos (FIP y BIP) y dos externos (F3 y B3) que reconocen seis regiones distintas del gen blanco en condiciones isotérmicas; la adición de 2 iniciadores de bucle acelera la reacción; los resultados se pueden visualizar midiendo la turbidez, mediante el cambio de color a simple vista, u observando la fluorescencia bajo una lámpara UV (Kokane *et al*., 2021; Raigond *et al*., 2019).

El objetivo de este trabajo fue detectar TSWV en plantas ornamentales y trips mediante RT-PCR y RT-LAMP para comparar tiempos y sensibilidad de ambas técnicas, así como identificar molecularmente las especies de trips presentes en las plantas muestreadas.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Muestreo de plantas y trips

Los muestreos se realizaron en dos unidades de producción localizadas en el Estado de Morelos, el 80% de las plantas muestreadas tenían síntomas típicos de virosis, mientras que el 20 % restante fueron plantas sin síntomas. Se tomaron muestras de las especies de *Impatiens balsamina*, *Impatiens hawkeri*, *Catharanthus roseus, Cyclamen persicum* y *Pelargonium hortorum*, mismas que se etiquetaron y colocaron en toallitas de papel en bolsas de plástico, y se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Dinámica Celular-Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIDC-UAEM) donde se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Durante el muestreo de las plantas también se colectaron trips con un

aspirador entomológico, los cuales también fueron trasladados al laboratorio y conservados a -20 °C.

5.4.2 Extracción de ARN de plantas y trips

Debido a las características propias de cada especie de planta muestreada, la extracción de ARN se llevó a cabo con diferentes métodos: para *C. roseus* se empleó el reactivo Trizol, siguiendo las indicaciones del proveedor; para *I. hawkeri* y *C. persicum*, se utilizó el kit de Monarch® Total ARN Miniprep Kit siguiendo las indicaciones del fabricante, adicionando al buffer de lisis PVP al 4 %. Para *I. balsamina* y *P. hortorum* se empleó el protocolo establecido por Michel-López *et al*. (2018) con algunas modificaciones: en un tubo de microcentrífuga se maceraron 100 mg de tejido en nitrógeno líquido, se agregaron 700 µl de buffer de extracción (0.25 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 % PVP (w/v), 1 % SDS (w/v)) y 700 µl de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex por 30 s y se centrifugó 4 min a 12,800 rpm, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (24:1:1), se centrifugó y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se repitió la extracción, posteriormente se agregó 10 % de acetato de sodio del volumen de la muestra y dos volúmenes de etanol al 100 %, se incubó 1 hora a -20 °C, se centrifugó 30 min, finalmente se realizaron tres lavados con etanol al 75 %, la pastilla fue diluida en agua estéril y se incubó 10 min a 60 °C.

La extracción de ARN de los trips se realizó siguiendo el protocolo de Boonham *et al*. (2002) aplicando algunas modificaciones: en un tubo de microcentrífuga se maceraron de 30-40 trips adultos con 50 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, SDS al 0.5 % (p/v), EDTA 25 mM), se agregaron 450 µl más del mismo buffer, se agregaron 25 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) para llevar a cabo la precipitación. Los tubos se almacenaron a -20 °C durante 90 min, posteriormente se centrifugaron 10 min. El sobrenadante fue retirado y se agregó 1 volumen de isopropanol (-20 °C) para ser incubados 30 min a -20 °C. Después se centrifugaron 30 min, la pastilla resultante se lavó 3 veces con etanol al 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y finalmente se resuspendió en 25 µl de agua. La

cuantificación de ARN se realizó en un espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX a 260 nm. Para corroborar la integridad del ARN se realizaron geles de agarosa al 1 %, y se corrieron a 50 V por 45 min.

5.4.3 Condiciones de RT-PCR

La síntesis del ADNc se llevó a cabo en una reacción que contenía 2 µl de ARN, 2 µl de oligo dT (50 µM), 2 µl de buffer M-MuLV (10X), 1 µl de enzima M-MuLV (200 U/µl), 1 µl de dNTPs (10 mM), en un volumen de 20 µl; se incubó a 42 °C por 60 min, y 20 min a 65 °C para inactivar la enzima.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µl, para ello se utilizaron 2 µl del ADNc, 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa, 2.5 µl del buffer Taq 10 X con KCl, 2 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2.5 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.65 µl de los iniciadores F3 y B3 (10 µM), y agua. El protocolo de PCR tanto para detectar TSWV en plantas y en trips fue: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C durante 60 s, 60 s a 54 °C y 60 s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C por 10 min, las reacciones se llevaron a cabo en un sistema de detección CFX96™. Posteriormente se realizaron geles de agarosa al 2% para corroborar la amplificación del producto, la banda que esperada corresponde a un peso de 203 pb.

5.4.4 Condiciones de RT-LAMP

Se probaron 2 kits de LAMP, uno de ellos fue para la detección de TSWV a base de fluorescencia y el otro fue colorimétrico. Las reacciones se prepararon en volúmenes de 12.5 µl, las cuales contenía 6.25 µl de WarmStart LAMP 2X master mix, 1.25 µl de la mix de iniciadores para RT-LAMP (10X), 1 µl de ADNc, y en el caso del kit de fluorescencia se adicionaron 0.25 µl del colorante fluorescente, el volumen restante fue agua estéril. Los iniciadores utilizados para la detección de TSWV mediante RT-LAMP fueron los siguientes: F3- CTTTGCTTTTCAGCACAGT, B3- TCTTGATGATGCAAAATCTGT, FIP- GGATGCAAAATACAAGGACCTCGACTTTTC CTAAAGCTTCCCT, BIP- ATAGCCAAGACAACACTGATCATCCTTGCCATAATGCT GGGA, mismos que se diseñaron en la página de PrimerExplorer V5.

Las muestras del kit fluorescente se incubaron en un sistema de detección CFX96™ mediante PCR en tiempo real a 65 °C por 240 ciclos de 15 s, aproximadamente 1 hora. La lectura de la fluorescencia se llevó a cabo con el software CFX Manager™. Respecto al kit LAMP colorimétrico, las muestras se incubaron a 65, 60 y 55 °C por 30, 45, 60, 75 y 90 min en una placa de calentamiento, el cambio de color en la reacción de rosa a naranja o amarillo indica que la muestra es positiva a TSWV.

5.4.5 Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

Se realizaron diluciones seriadas 1:1 para establecer la sensibilidad en la detección de TSWV mediante RT-PCR y RT-LAMP. Para RT-PCR las diluciones fueron las siguientes: 1500 ng/µl, 750 ng/µl, 375 ng/µl, 187 ng/µl, 93 ng/µl, 46 ng/µl, 23 ng/µl, 11 ng/µl. Para RT-LAMP las diluciones iniciaron en 52 ng/µl, continuando en 26 ng/µl, 13 ng/µl, 6 ng/µl, 3 ng/µl, 1 ng/µl. Los límites de detección para ambos ensayos se definieron de acuerdo con la última dilución con amplificación de producto.

5.4.6 Identificación molecular de especies de trips

El ADNc sintetizado a partir de la extracción de ARN de los trips se utilizó para la identificación molecular de especies mediante RT-PCR, se utilizaron iniciadores para *Frankliella occidentalis*: Fw- TTGACTTCTTCCACCCTCT, Rv- TGTATTTAAGTTTCG GTCTG (G. F. Zhang *et al*., 2012) y *Frankliniella* schultzei: Fw- ATACCTGCTAAATGAAGGG, Rv- TTCCACCTTCAATAACTTTAC (Urzêdo *et al*., 2017), que amplifican para productos de 340 y 145 pb, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 30 ciclos a 94 °C por 60 s, 60 s a 54 °C y 60 s a 72 °C; y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Seepiban *et al*., 2015). Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

5.5 Resultados

5.5.1 Identificación de TSWV por RT-PCR

Para los análisis RT-PCR primero se realizaron *pools* de ADNc de 10 plantas (5 juegos por especie), de aquellas que resultaron positivas a TSWV se realizaron PCR individuales, de esta forma se obtuvieron solo 3 *pools* positivas de *I. hawkeri* para las cuales se realizaron 15 PCRs individuales, obteniendo nuevamente 3 muestras positivas, que representaron el 6 % del total, el producto amplificado fue de 203 pb que corresponde al esperado para TSWV (**Figura 5.2a**) en todas las *pools* de las demás plantas no se obtuvo alguna positiva por lo tanto no se procedió a hacer las PCRs individuales. Respecto a los trips, la banda de 203 pb solo se observó en los que fueron colectados en *I. hawkeri* (**Figura 5.2b**).

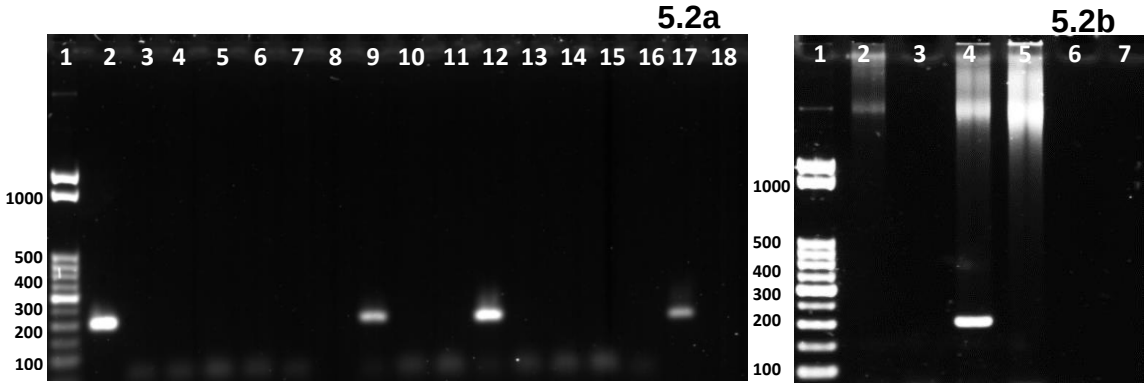


Figura 5.2. Detección de TSWV en plantas y trips mediante RT-PCR

Fig. 2a. Detección de TSWV en plantas: 1) Marcador de peso molecular; 2-16) Muestras individuales de *I. hawkeri*; 17) Control positivo; 18) Control negativo. **Fig. 2b.** Detección de TSWV en trips: 1) Marcador de peso molecular; 2) Trips de *C. roseus*; 3) Trips de *I. balsamina*; 4) Trips de *I. hawkeri*; 5) Trips de *P. hortorum*; 6) Trips de *C. persicum*; 7) Control negativo.

A pesar de que el 80% de las plantas muestreadas manifestaban síntomas, solo el 7.5 % de ellas resultaron positivas a TSWV, mismas que mostraban deformación en hojas, necrosis, y patrones de anillos, principalmente (**Figura 5.3**), mientras que el 92.5 % restante presentaban necrosis en tallo, manchas en hojas y clorosis (**Figura 5.4**), pero fueron negativas a TSWV.

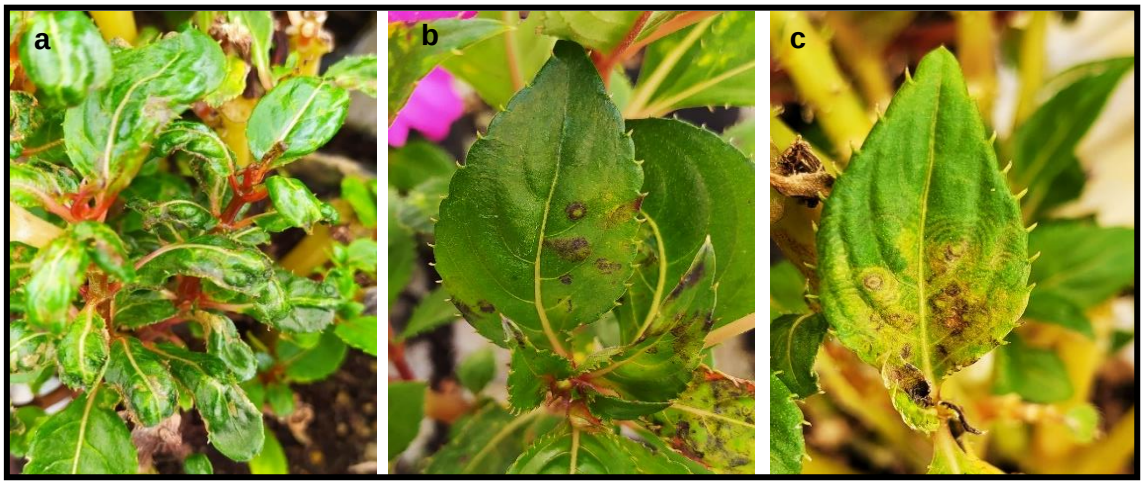


Figura 5.3. Síntomas de plantas positivas a TSWV.

a) Hojas deformes; **b)** Necrosis en hojas; **c)** Patrones de anillos en hojas.

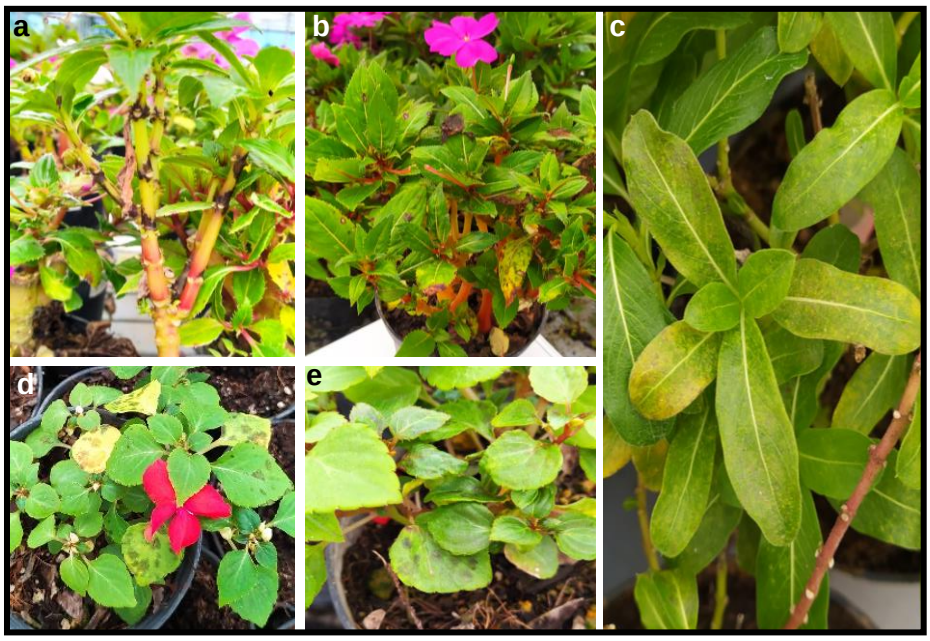


Figura 5.4. Síntomas de plantas negativas a TSWV.

a) Hojas deformes; **b)** Necrosis en hojas; **c)** Patrones de anillos en hojas.

5.5.2 Identificación de TSWV por RT-LAMP

El tiempo de detección de TSWV en *I. hawkeri* mediante RT-LAMP con el kit de fluorescencia fue a partir de los 3 min, sin embargo, en el caso de los trips, la

amplificación comenzó aproximadamente a los 25 min, se observó que tanto en el control negativo, como la muestra sin el templado (NTC), es decir, sin ADNc, no hubo amplificación (**Figura 5.5**). Al observar los tubos bajo luz UV, solo las muestras positivas emiten fluorescencia (**Figura 5.6**). Al monitorear la amplificación en tiempo real, además de corroborar que aquellas muestras fluorescentes sí amplifican producto, también conocemos el tiempo que debe ser incubada la reacción para obtener resultados positivos.

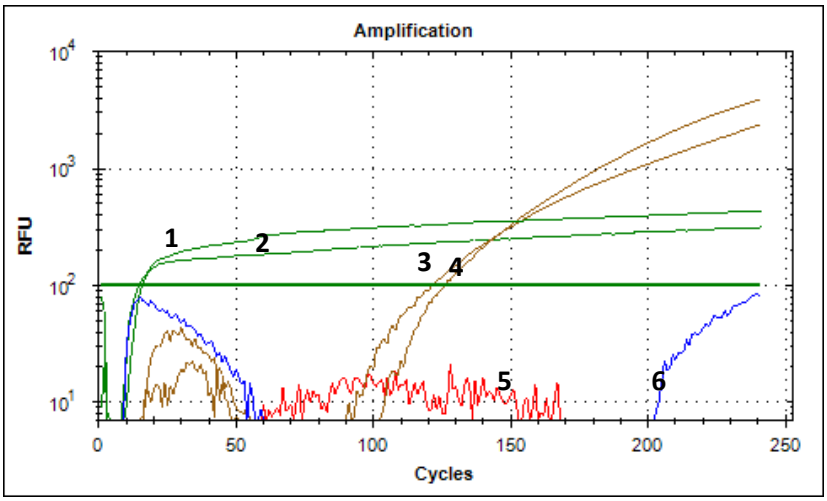


Figura 5.5. Detección de TSWV en plantas y trips mediante fluorescencia por RT-LAMP.

1, 2) Muestras de *I. hawkeri*; 3, 4) Muestras de trips; 5) Control negativo; 6) NTC.

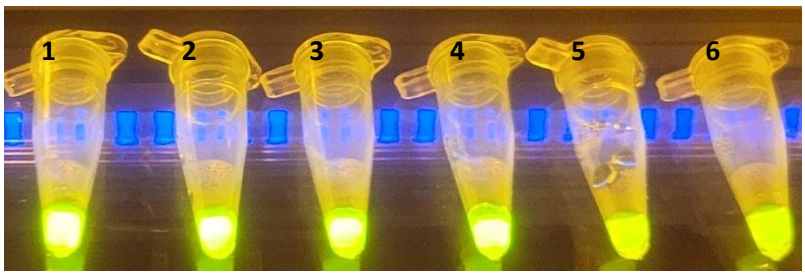
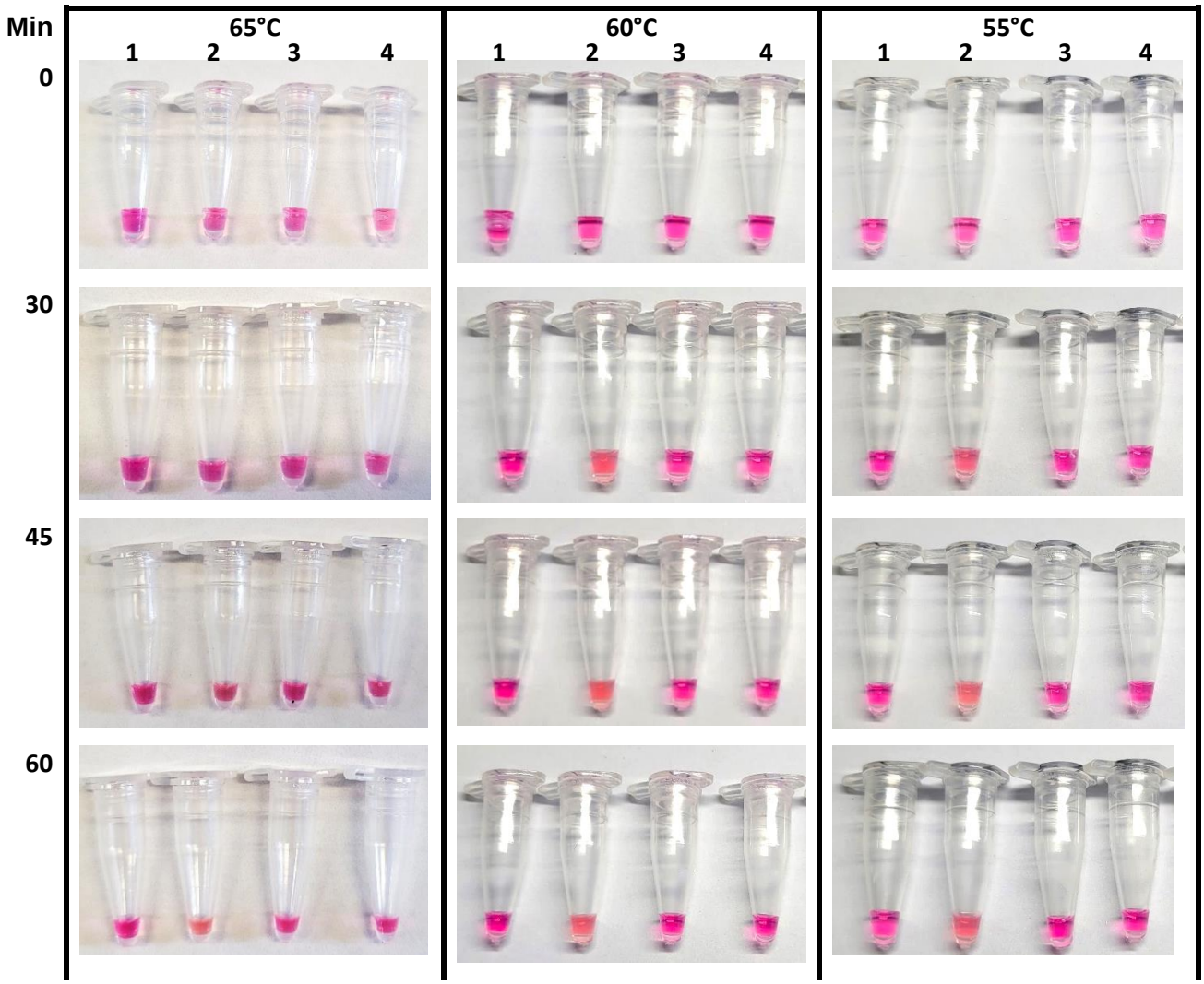


Figura 5.6. Visualización de fluorescencia por RT-LAMP bajo luz UV.

1, 2) Muestras de *I. hawkeri*; 3, 4) Muestras de trips; 5) Control negativo; 6) NTC.

Además del kit fluorescente, también se utilizó un kit colorimétrico para detectar TSWV en plantas y trips. Para este ensayo se probaron 3 temperaturas y las

reacciones se monitorearon cada 15 minutos. A 65 °C se observó un cambio de color de rosa a naranja a los 60 min, y a amarillo a partir de los 75 min. A 60 y 55 °C el cambio de color fue a un rosa más claro a partir de los 30 min, sin embargo, conforme pasó el tiempo de incubación este color no paso a naranja o amarillo. En las 3 temperaturas la única muestra que cambió de color fue la de trips, TSWV no se logró detectar en con el kit colorimétrico en plantas. En el control negativo y el NTC no se observó cambio de color (**Figura 5.7**).



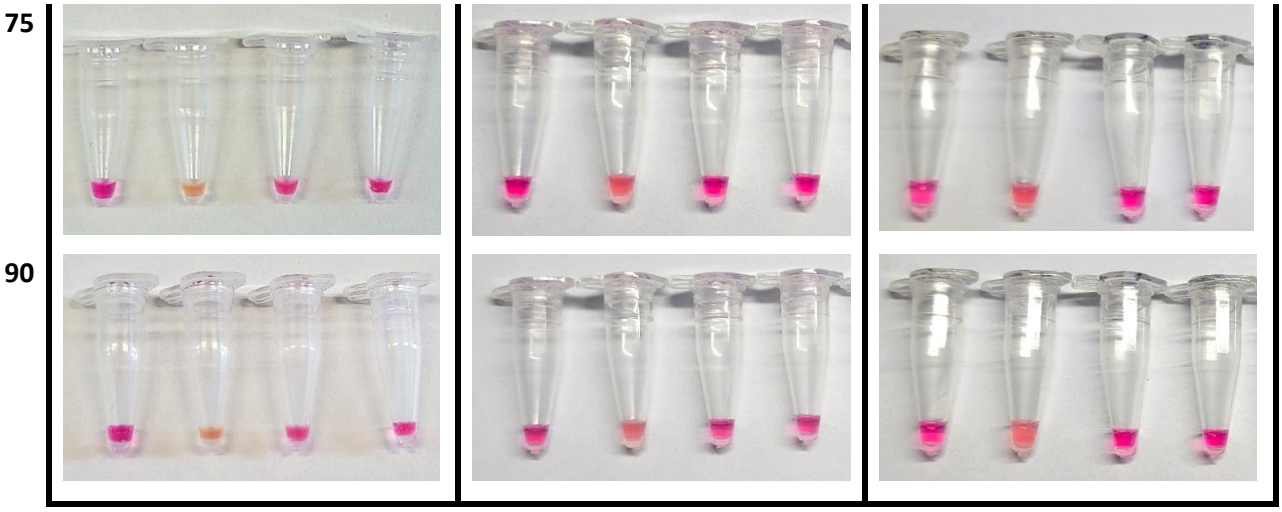


Figura 5.7. Detección de TSWV mediante RT-LAMP colorimétrico.

1) Muestra de *I. hawkeri*; 2) Muestra de trips; 3) Control negativo; 4) NTC

5.5.3 Sensibilidad de RT-PCR y RT-LAMP

En la **Figura 5.8** se muestran los resultados de las diluciones de ADNc para detectar TSWV por RT-PCR, se observa la amplificación del producto hasta una concentración de 46 ng/µl de ADNc, sin embargo, la banda es ligeramente visible, para un resultado certero se optó por tomar como cantidad mínima 93 ng/µl de ADNc para análisis de RT-PCR. Por otro lado, en las diluciones utilizadas para RT-LAMP, la detección del virus fue hasta una concentración de 3 ng/µl de ADNc (**Figura 5.9**), esto indica que para la detección de TSWV RT-LAMP es 30 veces más sensible que RT-PCR.

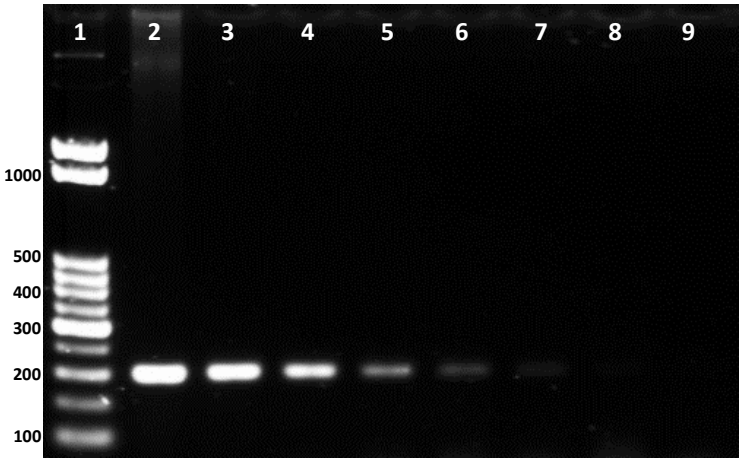


Figura 5.8. Sensibilidad de RT-PCR.

1) Marcador de peso molecular; 2) 1500 ng/µl; 3) 750 ng/µl; 4) 375 ng/µl; 5) 187 ng/µl; 6) 93 ng/µl; 7) 46 ng/µl; 8) 23 ng/µl; 9) 11 ng/µl.

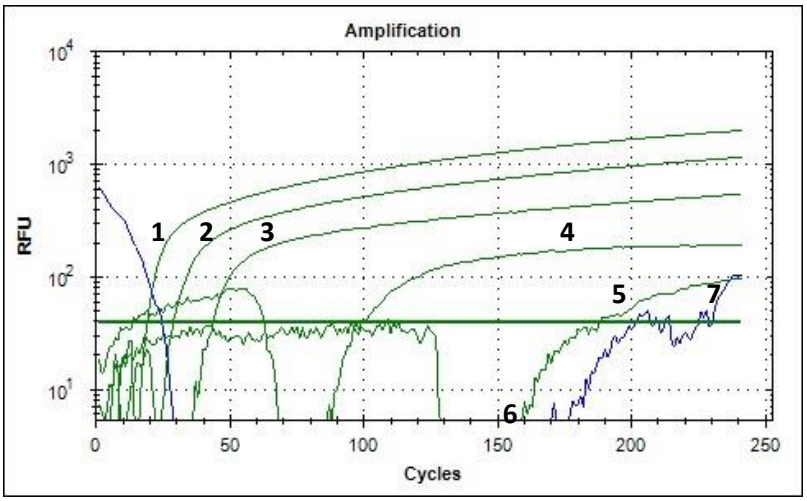


Figura 5.9. Sensibilidad de RT-LAMP.

1) 52 ng/µl; 2) 26 ng/µl; 3) 13 ng/µl; 4) 6 ng/µl; 5) 3 ng/µl; 6) 1 ng/µl; 7) Control negativo.

5.5.4 Identificación molecular de especies de trips

Se identificaron las especies de trips de cada una de las plantas muestreadas. *F. schultzei* se presentó en todas las muestras, mientras que *F. occidentalis* solo estuvo ausente en *P. hortorum* (**Figura 5.10**). Ambas especies se encuentran reportadas como vectores de TSWV (Rotenberg *et al*., 2015).

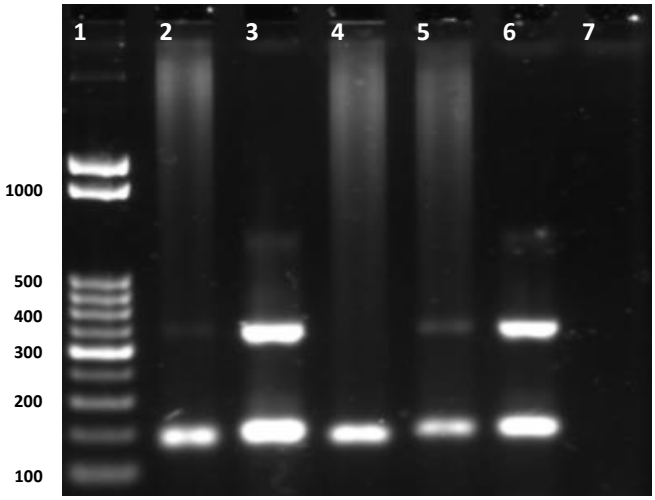


Figura 5.10. Identificación molecular de especies de trips.

1) Marcador de peso molecular; 2) Trips de *C. roseus*; 3) Trips de *I. balsamina*; 4) Trips de *P. hortorum*; 5) Trips de *I. hawkeri*; 6) Trips de *C. persicum*; 7) Control negativo.

5.6 Discusión

Entre las dificultades que se tienen para controlar la dispersión de TSWV se encuentran la amplia gama de huéspedes que tiene; sus vectores, que son los trips, capaces de desarrollar resistencia a insecticidas; y que actualmente no se dispone de un antiviral que permita eliminar TSWV una vez que llega a la planta. Es por ello que las medidas preventivas y un diagnóstico a tiempo es crucial para su mitigación y reducir las pérdidas millonarias que anualmente ocasiona este virus en cultivos de invernaderos (Karavina y Gubba, 2017).

En este estudio se confirmó la presencia de TSWV en solo una de las cinco plantas muestreadas, así como en los trips colectados en las mismas. La cantidad de muestras positivas de *I. hawkeri* representó solo el 6 % del total, con esta información se pueden tomar medidas para evitar que el resto de las plantas lleguen a infectarse y generar pérdidas económicas severas como las que causa en otros cultivos agrícolas tales como el tomate, en el cual se han reportado pérdidas de 0.9 millones de dólares en Samsun,Turquía. (Sevik y Arli-Sokmen, 2012). Además, la presencia de trips virulíferos exige acciones inmediatas sobre ellos, ya que son el principal medio de diseminación de TSWV.

La detección de TSWV se realizó mediante RT-PCR y RT-LAMP con la finalidad de comparar el tiempo de respuesta de cada técnica, además de probar y validar los iniciadores para detectar TSWV mediante RT-LAMP. RT-PCR ha sido ampliamente utilizada para diagnósticos de virus en plantas (Asano *et al*., 2017; Senthilraja *et al*., 2021; Zarzyńska-Nowak *et al*., 2018), y en menor cantidad para trips (Boonham *et al*., 2002; Yoon *et al*., 2020), sin embargo, desde el primer ensayo con LAMP para detectar virus fitopatógenos en 2003 por Fukuta *et al*., han surgido un gran número de reportes haciendo uso y mejoras hasta lograr realizar diagnósticos en campo (Wilisiani *et al*., 2019), posicionándola como una técnica prometedora para diagnósticos de rutina *in situ* .

En estudios realizados se demuestra que el tiempo, el equipo y los insumos son menores al utilizar RT-LAMP en la detección de virus en plantas (Galvez *et al*., 2020; Supakitthanakorn *et al*., 2022), desafortunadamente, la cantidad de virus fitopatógenos que infectan a las plantas es muy grande y los iniciadores reportados y validados no se encuentran disponibles para todos. Una de las limitantes de RT-LAMP es precisamente el diseño de los iniciadores (Mehetre *et al*., 2021), ya que a diferencia de RT-PCR se requieren de por lo menos cuatro de ellos, que a su vez reconozcan seis regiones del gen diana, en este estudio se diseñaron y probaron los iniciadores para detectar TSWV por RT-LAMP en muestras de plantas y trips empleando dos kits diferentes. Los resultados satisfactorios fueron para las muestras de trips con ambos kits, en un tiempo menor que con RT-PCR, sin la necesidad de usar el termociclador ni realizar geles de agarosa en el caso del kit colorimétrico. Los resultados no concluyentes se obtuvieron en plantas con el kit colorimétrico, el cambio de color en la reacción no fue el esperado, es probable que algún componente del mismo kit o residuos de la extracción de ARN estén inhibiendo la amplificación, la enzima *BST* tiene un alto grado de robustez en comparación con las utilizadas en RT-PCR (Mori y Notomi, 2009), sin embargo, no se descarta la interferencia de otro elemento en la reacción. Respecto a la sensibilidad de ambas técnicas, RT-LAMP fue 30 veces superior que RT-PCR, en otros estudios han reportado la sensibilidad desde 10 veces

mayor (Lai *et al*., 2018) hasta 100 veces (Liu *et al*., 2019), de esta forma se pueden detectar plantas en estados iniciales de la infección con cargas virales bajas.

Por otro lado, de acuerdo con Subramanya *et al*., (2019), los síntomas comunes de TSWV en ornamentales son las manchas negras, marrones y púrpuras en hojas; mosaico sistémico, lesiones necróticas en tallo; manchas anulares blancas en flores, deformación de las hojas, patrones de anillos cloróticos o necróticos en hojas; y generalmente las plantas infectadas con TSWV no prosperan. Varios de estos síntomas se mostraban en el 80% de las plantas (*I. balsamina*, *I. hawkeri*, *C. roseus, C. persicum* y *P. hortorum*) al momento de su muestreo, sin embargo, solo el 7.5 % resultaron positivas a TSWV que fueron las de *I. hawkeri.* Los síntomas que presentaron estas plantas concuerdan con los que reportan Milošević *et al*., (2011) en *I. hawkeri* analizadas en Serbia. Si bien, los síntomas en las demás plantas no fueron propios de la infección por TSWV, es debido a que otros factores como las condiciones nutricionales y ambientales, así como diferentes virus pueden ocasionar sintomatología similar (Pappu *et al*., 2009), y es precisamente debido a esta similitud por lo que el diagnóstico visual de enfermedades y patógenos no es lo más recomendable.

Finalmente, la identificación de especies de trips se llevó a cabo por RT-PCR, es decir se utilizó el mismo ARN extraído para la identificación de TSWV, comúnmente para este tipo de identificación se utiliza PCR (Jangra *et al*., 2020; Sabahi *et al*., 2017) pero en este caso, para no hacer una extracción adicional de ADN y asegurar que efectivamente los trips identificados eran virulíferos o no, se hizo uso de RT-PCR, obteniendo resultados convincentes. Recientemente, LAMP también se ha empleado para la identificación de especies de trips (Przybylska y Obrępalska-Stęplowska, 2020).

5.7 Conclusiones

Se identificó TSWV solo en muestras de *I. hawkeri* y en los trips colectados en las mismas plantas.

La técnica de RT-LAMP resultó ser más sensible y rápida que RT-PCR para la detección de TSWV en trips, sin embargo, para plantas no se logró la detección de este virus con RT-LAMP colorimétrico. La sensibilidad de RT-LAMP fue 30 veces mayor que RT-PCR, el tiempo mínimo de incubación para el kit fluorescente fue de 3 min para trips y de 25 para plantas, sin embargo, con el kit colorimétrico el tiempo aumentó a 60 min para comenzar a ver el cambio de color.

Las especies de trips identificadas fueron *F. occidentalis* y *F. schultzei*, ambas catalogadas como vectores de este virus.

5.8 Perspectivas

Al no obtener resultados concluyentes respecto a LAMP con el kit colorímetrico, se sugiere, por un lado, diseñar los iniciadores *loop* y realizar pruebas utilizando los 6 iniciadores, en teoría la reacción debería de mostrar un cambio claro de color en menos tiempo del que se ha obtenido hasta ahora. Por otro lado, también es posible realizar más muestreos de otras plantas y comenzar desde la extracción de ARN con métodos diferentes a los que ya se han utilizado, esto con la finalidad de descartar posibles inhibidores en dicha extracción, y con las que resulten positivas a TSWV hacer los análisis de LAMP.

Una vez que se tengan los resultados certeros en laboratorio, podrían iniciarse las pruebas de diagnóstico en campo, que es una de las ventajas que tiene LAMP sobre PCR, al no necesitar el termociclador, las reacciones se pueden incubar en una placa de calentamiento portátil, además de la posibilidad de tomar la muestra en campo y directamente realizar los ensayos LAMP, estas pruebas aplican tanto para plantas como para trips.

5.9 Referencias

Asano, S., Hirayama, Y., y Matsushita, Y. (2017). Distribution of Tomato spotted wilt virus in dahlia plants. *Letters in Applied Microbiology*, *64*(4), 297–303. https://doi.org/10.1111/lam.12720

Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., y Barker, I. (2002). The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, *101*(1–2), 37–48. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9

Cho, J. J. (1988). Detection of Tomato Spotted Wilt Virus in Individual Thrips by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In *Phytopathology* (Vol. 78, Issue 10, p. 1348). https://doi.org/10.1094/phyto-78-1348

Culbreath, A. K., Todd, J. W., y Brown, S. L. (2003). Epidemiology and Management of Tomato Spotted Wilt in Peanut. *Annual Review of Phytopathology*, *41*(February), 53–75. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095522

Fukuta, S., Ohishi, K., Yoshida, K., Mizukami, Y., Ishida, A., y Kanbe, M. (2004). Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *Journal of Virological Methods*, *121*(1), 49–55. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.05.016

Galipienso, L., Davino, S., Fernández, A., Bellarsi, M., Davino, M., Debreczeni, D., y Rubio, L. (2014). Virosis en cultivos ornamentales: medidas para el control de la enfermedad. *VI Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental*, *68*, 34–43.

Galvez, L. C., Barbosa, C. F. C., Koh, R. B. L., y Aquino, V. M. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of abaca bunchy top virus and banana bunchy top virus in abaca. *Crop Protection*, *131*(January). https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105101

Gupta, R., Kwon, S. Y., y Kim, S. T. (2018). An insight into the tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato and thrips interaction. *Plant Biotechnology Reports*, *12*(3), 157–163. https://doi.org/10.1007/s11816-018-0483-x

Hodgetts, J., Hall, J., Karamura, G., Grant, M., Studholme, D. J., Boonham, N., Karamura, E., y Smith, J. J. (2015). Rapid, specific, simple, in-field detection of Xanthomonas campestris pathovar musacearum by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Applied Microbiology*, *119*(6), 1651–1658. https://doi.org/10.1111/jam.12959

Jangra, S., Mittal, A., Dhall, H., Jain, R. K., y Ghosh, A. (2020). A multiplex PCR assay for rapid identification of major *Tospovirus* vectors reported in India. *BMC Genomics*, *21*(1), 4–11. https://doi.org/10.1186/s12864-020-6560-x

Karavina, C., y Gubba, A. (2017). Detection and characterization of Tomato spotted wilt virus infecting field and greenhouse-grown crops in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, *149*(4), 933–944. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1243-4

Kazinczi, G., Horváth, J., y Takács, A. (2007). *Tospovirus*es on ornamentals. *Plant Viruses*, *1*(2), 142–162.

Kokane, A. D., Kokane, S. B., Warghane, A. J., Gubyad, M. G., Sharma, A. K., Reddy, M. K., y Ghosh, D. K. (2021). A rapid and sensitive reverse transcription–loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of indian citrus ringspot virus. *Plant Disease*, *105*(5), 1346–1355. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE

Lai, D., Zhang, Y., Huang, Q., Yin, G., Pennerman, K. K., Liu, Z., y Guo, A. (2018). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification to rapidly detect Rice ragged stunt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(8), 1577–1584. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.024

Lee, H. J., Cho, I. S., Ju, H. J., y Jeong, R. D. (2021). Rapid and visual detection of tomato spotted wilt virus using recombinase polymerase amplification combined with lateral

flow strips. *Molecular and Cellular Probes*, *57*(February), 101727. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101727

Lees, A. K., Roberts, D. M., Lynott, J., Sullivan, L., y Brierley, J. L. (2019). Real-Time PCR and LAMP Assays for the Detection of Spores of Alternaria solani and Sporangia of Phytophthora infestans to Inform Disease Risk Forecasting. *Plant Disease*, *103*(12), 3172–3180. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0765-RE

Liu, H., Wu, W., Tan, J., Li, Y., Mi, W., Jiang, L., y Wu, Y. (2019). Development and evaluation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of Citrus leaf blotch virus. *Journal of Virological Methods*, *270*, 150–152. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.009

Mehetre, G. T., Leo, V. V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, M. K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A. N., Dawoud, T. M., Almaary, K. S., y Singh, B. P. (2021). Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review. *Viruses*, *13*(3), 1–31. https://doi.org/10.3390/v13030412

Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., y Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de Prosopis juliflora (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *9*(6), 1259–1267. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788

Milošević, S., Subotić, A., Bulajić, A., Djekić, I., Jevremović, S., Vučurović, A., y Krstić, B. (2011). Elimination of TSWV from Impatiens hawkerii Bull. and regeneration of virus-free plant. *Electronic Journal of Biotechnology*, *14*(1), 1–10. https://doi.org/10.2225/vol14-issue1-fulltext-5

Mitrofanova, I. V., Zakubanskiy, A. V., y Mitrofanova, O. V. (2018). Viruses infecting main ornamental plants: An overview. *Ornamental Horticulture*, *24*(2), 95–102. https://doi.org/10.14295/oh.v24i2.1199

Mori, Y., y Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *15*(2), 62–69. https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9

Pappu, H. R., Jones, R. A. C., y Jain, R. K. (2009). Global status of *Tospovirus* epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, *141*(2), 219–236. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009

Patil, B. L. (2021). Plant Viral Diseases: Economic Implications. In *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.21307-1

Przybylska, A., y Obrępalska-Stęplowska, A. (2020). LAMP and real-time PCR assays for rapid identification of Frankliniella intonsa. *Crop Protection*, *135*(May). https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105220

Raigond, B., Verma, A., Roach, S., Kochhar, T., Shilpa, Arjunan, J., Kumar, R., Sharma, S., y Chakrabarti, S. K. (2019). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification: a simple, sensitive and rapid assay for detection of potato virus X in potato leaves and tubers. *Indian Phytopathology*, *72*(2), 321–328. https://doi.org/10.1007/s42360-019-00147-4

Riley, D. G., Joseph, S. V., y Srinivasan, R. (2012). Temporal relationship of thrips populations to tomato spotted wilt incidence in tomato in the field. *Journal of Entomological Science*, *47*(1), 65–75. https://doi.org/10.18474/0749-8004-47.1.65

Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneweis, D. J., y Whitfield, A. E. (2015). Thrips transmission of *Tospovirus*es. *Current Opinion in Virology*, *15*(September), 80–89. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003

Sabahi, S., Fekrat, L., y Zakiaghl, M. (2017). A simple and rapid molecular method for simultaneous identification of four economically important thrips species. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *19*(6), 1279–1290.

Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn,

B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., y Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *12*(9), 938–954. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x

Seepiban, C., Charoenvilaisiri, S., Kumpoosiri, M., Bhunchoth, A., Chatchawankanphanich, O., y Gajanandana, O. (2015). Development of a protocol for the identification of *Tospovirus*es and thrips species in individual thrips. *Journal of Virological Methods*, *222*, 206–213. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.06.017

Senthilraja, C., Malathi, V. G., Nakkeeran, S., Suganthy, M., Sivakumar, U., y Renukadevi, P. (2021). Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) infecting Chrysanthemum in India. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *43*(4), 641–650. https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1856190

Sevik, M. A., y Arli-Sokmen, M. (2012). Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. *Phytoparasitica*, *40*(1), 87–93. https://doi.org/10.1007/s12600-011-0192-2

Subramanya, K. S., Mandal, B., Hammond, J., y Scott, S. W. (2019). Encyclopedia of plant viruses and viroids. In *Alternative Medicine Review* (1st ed., Vol. 8). Springer New Delhi. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-43044-9.00130-8

Supakitthanakorn, S., Vichittragoontavorn, K., Sunpapao, A., y Kunasakdakul, K. (2022). Tobacco Mosaic Virus Infection of Chrysanthemums in. *Plants*, *11*(1788), 1–13.

Urzêdo, E. L., de Almeida Spadotti, D. M., Rocha, K. C. G., Lima, élison F. B., Tavella, L., Turina, M., y Krause-Sakate, R. (2017). Efficient detection of Frankliniella schultzei (Thysanoptera, Thripidae) by cytochrome oxidase I gene (mtCOI) direct sequencing and real-time PCR. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *60*(December), 1–10. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160425

Wilisiani, F., Tomiyama, A., Katoh, H., Hartono, S., Neriya, Y., Nishigawa, H., y Natsuaki, T. (2019). Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods*, *265*, 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.005

Yoon, J. Y., Yoon, J. B., Seo, M. H., Choi, S. K., Cho, I. S., Chung, B. N., Yang, C. Y., y Reddy Gangireddygari, V. S. (2020). Application of multiplex RT-PCR for simultaneous identification of tomato spotted wilt virus and thrips species in an individual thrips on chrysanthemum. *Research in Plant Disease*, *26*(4), 264–271. https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.4.264

Zarzyńska-Nowak, A., Hasiów-Jaroszewska, B., Korbecka-Glinka, G., Przybyś, M., y Borodynko-Filas, N. (2018). A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of Tomato spotted wilt virus and Tomato yellow ring virus in tomato plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *40*(4), 580–586. https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1503195

Zhang, G. F., Meng, X. Q., Min, L., Qiao, W. N., y Wan, F. H. (2012). Rapid diagnosis of the invasive species, Frankliniella occidentalis (Pergande): A species-specific COI marker. *Journal of Applied Entomology*, *136*(6), 410–420. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01661.x

Zhang, Z., Zheng, K., Zhao, L., Su, X., Zheng, X., y Wang, T. (2021). Occurrence, Distribution, Evolutionary Relationships, Epidemiology, and Management of Ortho*Tospovirus*es in China. *Frontiers in Microbiology*, *12*(August), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686025

6. Primer reporte de PnMV en *Catharanthus roseus*

6.1 Resumen

Por primera vez se detectó Poinsettia mosaic virus (PnMV) en plantas de *Catharanthus roseus* (vinca), hasta el momento este virus solo se había reportado en el género *Euphorbia,* con preferencia en *Euphorbia pulcherrima*, planta que también fue analizada en este trabajo. Se utilizó la técnica de RT-PCR para la detección de un fragmento de 245 pb de la proteína de la cápside de PnMV en las plantas, y para confirmar los resultados se realizó RT-LAMP a 58, 60, 63, y 65 °C, hasta por 90 min, desafortunadamente, la comprobación no se pudo llevar a cabo debido a los datos no precisos de RT-LAMP. Por otro lado, se planteó el demostrar los postulados de Koch de PnMV en vinca, para ello se llevó a cabo la inoculación del virus en las plantas previamente detectadas en RT-PCR como libres de PnMV, utilizando una solución de fosfatos en la preparación del inóculo y generando lesiones en las hojas, para corroborar la transmisión del virus se realizó RT-PCR a las plantas 30 días después de la inoculación, sin embargo, esta no fue satisfactoria.

Palabras clave: Poinsettia, virus, transmisión, inoculación.

6.2 Abstract

This is the first time that Poinsettia mosaic virus (PnMV) was detected in *Catharanthus roseus* (vinca); until now this virus had only been reported in the *Euphorbia* genus, preferably in *Euphorbia pulcherrima*, plant that was also analyzed in this work. The RT-PCR technique was used to detect a 245 bp fragment of the PnMV capsid protein in plants, and to confirm the results, RT-LAMP was performed at 58, 60, 63, and 65 °C, up to 90 min, unfortunately the check could not be carried out due to inaccurate RT-LAMP data. On the other hand, it was proposed to demonstrate Koch's postulates of PnMV in vinca, for this the inoculation of the virus was carried out in the plants previously detected in RT-PCR as free of PnMV, using a phosphate solution in the preparation of the inoculum and generating lesions on the leaves, to corroborate

the transmission of the virus, RT-PCR was performed on the plants 30 days after inoculation, however, this was not satisfactory.

Palabras clave: Poinsettia, virus, transmisión, inoculation.

6.3 Introducción

Poinsettia mosaic virus (PnMV) fue reportado por primera vez en 1980 en plantas de *Euphorbia pulcherrima* en Estados Unidos (Fulton y Fulton, 1980), pertenece a la familia Tymoviridae, su distribución es a nivel mundial y su rango de hospederos naturales se limita al género *Euphorbia* destacando *E. pulcherrima*; las plantas infectadas por este virus presentan mosaicos sistémicos, moteados, malformaciones, las brácteas no desarrollan su coloración por completo. (Fløistad *et al*., 2011; Subramanya *et al*., 2019). En el cultivo comercial de la nochebuena, la transmisión de este virus es por propagación vegetativa e inoculación mecánica, no se transmite por contacto entre plantas, ni por semillas o polen, tampoco se conocen vectores (Haenni y Monod, 2009). Sin embargo, Blystad y Fløistad, (2002) plantean la posibilidad de que PnMV si sea transmitido por insectos, específicamente por trips.

Los viriones de PnMV son isométricos de aproximadamente 25 ± 26 nm de diámetro y sedimentan como componentes superior e inferior; el componente superior no es infeccioso, mientras que el inferior si lo es. Su genoma consta de una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de 6,099 nucleótidos, y la cápside está compuesta por subunidades proteicas de 21,7 kDa (Bradel *et al*., 2000; Subramanya *et al*., 2019).

El principal hospedero de PnMV es *E. pulcherrima*, conocida también como poinsettia, nochebuena, o flor de pascua, es reconocida a nivel mundial por ser símbolo contemporáneo de la Navidad pero es originaria de México, en donde se puede encontrar en estado silvestre en varias regiones del país, su domesticación y mejoramiento genético se ha hecho principalmente en el extranjero desde el siglo pasado (Taylor *et al*., 2011). Para 2022, la producción de nochebuena en México fue

de más de 21 millones de plantas, con un valor de producción de más de 902 millones, siendo Morelos el principal estado productor (SADER 2023). Los síntomas que induce PnMV reducen la calidad y estética de la nochebuena, lo que dificulta su comerciabilidad que resulta en pérdidas económicas (Jacobo-Villegas *et al*., 2020). Para México ya se ha documentado la infección de nochebuena comercial y de silvestre o de sol mediante ELISA y RT-PCR (Jacobo-Villegas et al., 2015; Ocampo et al., 2013). Si, bien, PnMV se limita a infectar el género *Euphorbia*, no se descarta la posibilidad de que otras plantas puedan llegar a infectarse con este virus. Hammond *et al*., (2023) señala que los virus pueden adaptarse a nuevos hospederos e infectar plantas de familias completamente distantes en sentido taxonómico.

En este trabajo se detectaron por primera vez plantas de *Catharanthus roseus* (conocida comúnmente en México como vinca) infectadas con PnMV. Se han documentado algunos virus que infectan a esta planta, tales como: Cucumber mosaic virus (Samad *et al*., 2008), Carnation mottle virus (Singh *et al*., 2005), Potato yellow vein virus (Salazar *et al*., 2000), Tomato spotted wilt virus (Chatzivassiliou *et al*., 2000), y Catharanthus mosaic virus (Conceiçãoa *et al*., 2011). Vinca es originaria de las islas de Madagascar, actualmente es común encontrarla en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, pertenece a la familia Apocynaceae, es una planta herbácea de hoja perenne que llega a crecer hasta 1 m de alto, sus hojas son de ovaladas a alargadas y están dispuestas en pares opuestos, sus flores son de color rosa, morado y blanco. Es conocida por sus efectos antitumorales, antidiabéticos, antimicrobianos, antioxidantes y antimutagénicos; de los más de 130 alcaloides que produce, algunos son utilizados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Ali *et al*., 2021; Padmaa Paarakh *et al*., 2019).

La detección de PnMV se llevó a cabo mediante RT-PCR y RT-LAMP, además, se propuso el inocular plantas de vinca con este virus con la finalidad de demostrar los postulados de Koch.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Muestreo de plantas

Se tomaron 5 muestras de plantas de vinca comercializadas en el municipio de Cuernavaca, Morelos, los síntomas que mostraban dos de ellas eran hojas y flores más pequeñas respecto a las demás plantas, así como ligero amarillamiento de hojas (**Figura 6.1**). Posteriormente se analizaron más plantas con la finalidad de encontrar vincas libres de PnMV y poder realizar los postulados de Koch.

Figura 6.1. Plantas de vinca con y sin síntomas.

a, b) Plantas con síntomas: hojas y flores más pequeñas; **c,d)** Plantas sin síntomas de enfermedad.

Adicionalmente, se tomaron también muestras de nochebuena comercial de las variedades “Prestige Red”, “Primer Red” y “Winter Red”, proporcionadas por el Dr. Irán Alia Tejacal, así como de nochebuena de sol, estas últimas fueron proporcionadas por el Dr. Dante Vladimir Galindo García de colectas previas realizadas en el Estado de Morelos. Los síntomas que presentaban las hojas de nochebuena comercial eran hojas deformes, puntos y líneas amarillas en las hojas, mientras que en las de sol prevalecía

la clorosis y el moteado, aunque también se llegaron a encontrar hojas deformes (**Figura 6.2**).

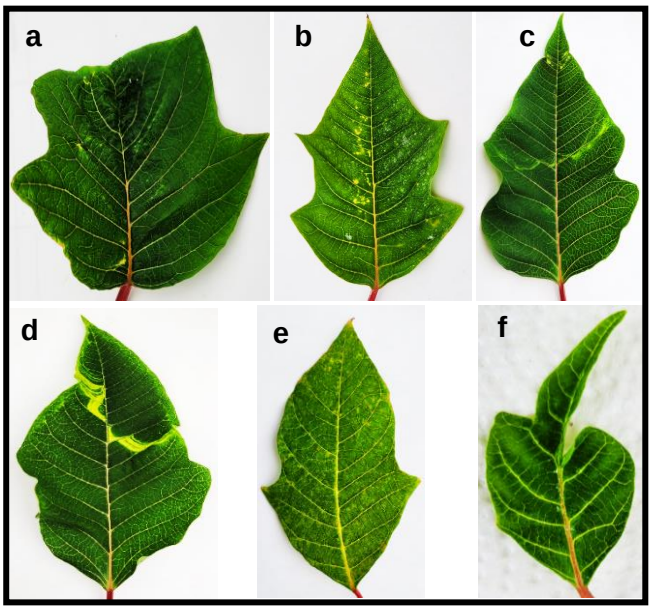


Figura 6.2. Hojas de nochebuena con síntomas de virosis.

a-d) Hojas de nochebuena comercial con síntomas; **e-f)** Hojas de nochebuena de sol con síntomas.

6.4.2 Extracción de ARN y RT-PCR

La extracción de ARN para vinca fue con el reactivo Trizol siguiendo las indicaciones del proveedor, mientras que para nochebuena se empleó el kit Monarch® Total RNA Miniprep. La cuantificación de ARN se realizó en un espectrofotómetro *DeNovix DS-11 FX* a 260 nm, y para corroborar su integridad se prepararon geles de agarosa al 1% por 30 min a 75 V, visualizados en un fotodocumentador D-Digit® Gel Scanner. Posteriormente, se prepararon las reacciones para la síntesis del ADNc, las cuales contenían 2 µl de ARN, 1 µl de oligos dT (100 pM), 4 µl de buffer RevertAid (5X), 2 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de enzima Revert Aid RT (200 U/µl) en un volumen final de 20 µl; los tubos se incubaron a 42 °C por una hora, y 20 min a 65 °C.

Con el ADNc de la reacción anterior se prepararon las PCRs, las cuales contenían 2.5 µl del buffer de extracción, 1.25 µl de cada indicador (10 µM), 2 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2.5 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.5 µl de Taq polimerasa y 2 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial en 94 °C por 5 min; 94 °C durante 40 s, 63 °C por 40 s, 72 °C por 40 s, por 35 ciclos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Para corroborar la amplificación de producto se realizaron geles de agarosa al 2%. Los iniciadores utilizados para la identificación de PnMV fueron los iniciadores externos en LAMP (F3 y B3) que amplifican un fragmento de la proteína de la cápside de 245 pb.

Los productos de RT-PCR se purificaron y enviaron a secuenciar al Instituto Nacional de Medicina Genómica, las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en GenBank para PnMV usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6.4.3 Ensayo RT-LAMP

Las reacciones se prepararon en volúmenes de 12.5 µl, que contenían 6.25 µl de WarmStart LAMP 2X master mix, 1.25 µl de la mix de iniciadores para RT-LAMP (10X), 1 µl de ADNc, el volumen restante fue agua estéril. Los iniciadores utilizados en este ensayo se diseñaron en la página de PrimerExplorer V5, los cuales fueron: F3- AGTGGCCGCTGAGTTGAA; B3- CAGCGGCCCTATGGTAGA; FIP- GCAGCAGATTT CCGACGGAAGTCACTTCCTCCATCACCACCT; BIP- GGAGTCTGGACGAGCACG TCAGCGGGTTTGGGAAGTGTG. Las muestras se incubaron a 58, 60, 63, y 65 °C, hasta por 90 min en una placa de calentamiento, el cambio de color en la reacción de rosa a naranja o amarillo indica que la muestra es positiva a PnMV.

6.4.4 Inoculación de PnMV en vinca

Las plantas de vinca a inocular previamente fueron diagnosticadas mediante RT-PCR como libres de PnMV. Se utilizó un buffer de Fosfatos de sodio 0.01 M con pH 7.8 para preparar la solución con el inóculo, la fuente de este fue una planta de vinca positiva a PnMV, se inocularon 5 plantas negativas a PnMV, además se

estableció una de ellas como testigo a la cual solo se le aplicó la solución buffer. De la fuente de inóculo se maceraron hojas en un mortero estéril y se adicionó la solución de fosfatos en relación 1:10 p/v, con este extracto se humedeció un hisopo estéril y se frotaron 5 hojas jóvenes de cada planta a inocular asperjadas previamente con carborundum de 600 mallas (Jacobo-Villegas *et al*., 2020), a otras 5 plantas las lesiones fueron inducidas con un alfiler entomológico 00 (**Figura 6.3**). Las pruebas moleculares para comprobar la transmisión del virus se realizaron a los 30 días después de la inoculación.

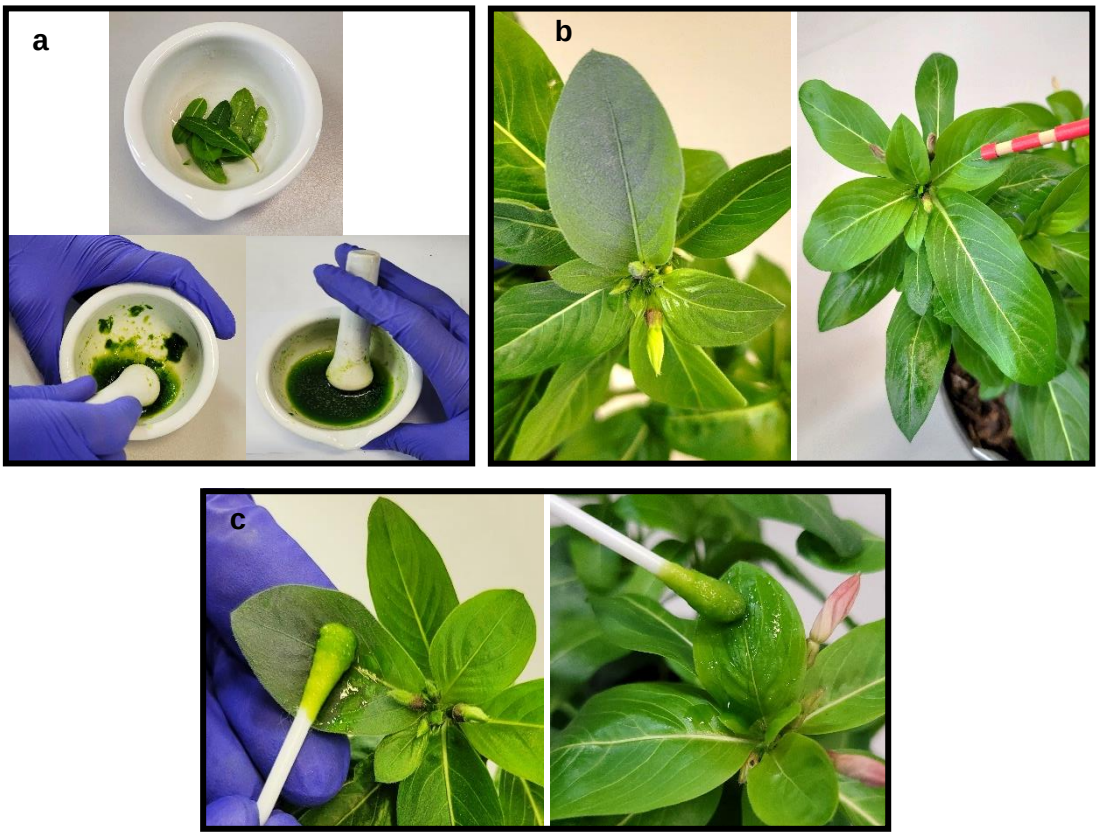


Figura 6.3. Proceso de inoculación de vinca con PnMV.

a) Preparación del inóculo; **b)** Creación de lesiones mecánicas; **c)** Colocación del inóculo en hojas con lesiones.

6.5 Resultados

6.5.1 PCR en vinca y nochebuena

Las cinco muestras de vinca analizadas resultaron positivas a PnMV, en 4 de ellas se observó claramente la banda correspondiente a PnMV y en una la banda es ligeramente perceptible (**Figura 6.4**). Las dos plantas que presentaban síntomas de hojas y flores más pequeñas que las demás resultaron positivas, sin embargo, dos que no presentaban síntomas de enfermedad también resultaron positivas.

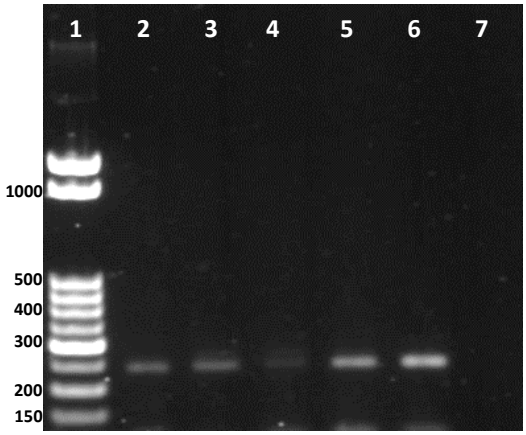
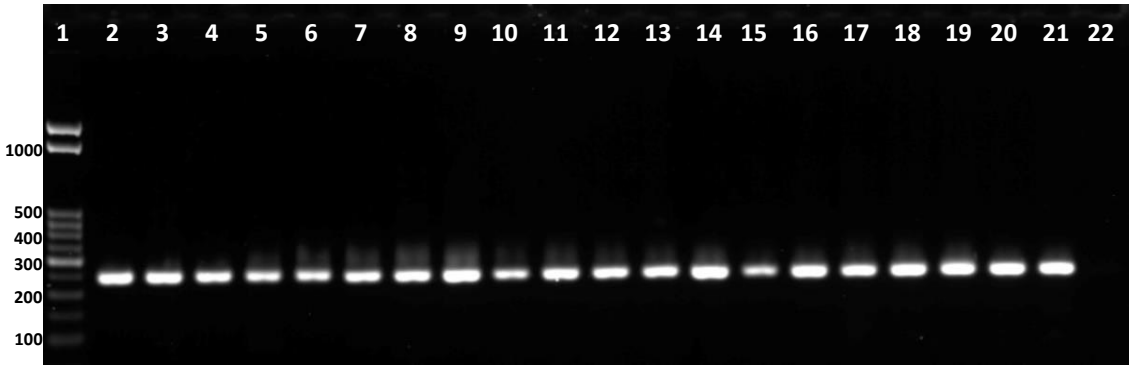


Figura 6.4. Detección de PnMV en vinca mediante RT-PCR

1) Marcador de peso molecular; 2-6) Muestras de vinca; 7) Control negativo.

Todas las muestras analizadas de nochebuena comercial de las variedades “Prestige Red”, “Primer Red” (**Figura 6.5a**) y “Winter Red” (**Figura 6.5b**) resultaron positivas a PnMV lo mismo ocurrió para las nochebuenas de sol (**Figura 6.6**), la banda observada en los geles de agarosa corresponde al producto esperado de 245 pb.

6.5a



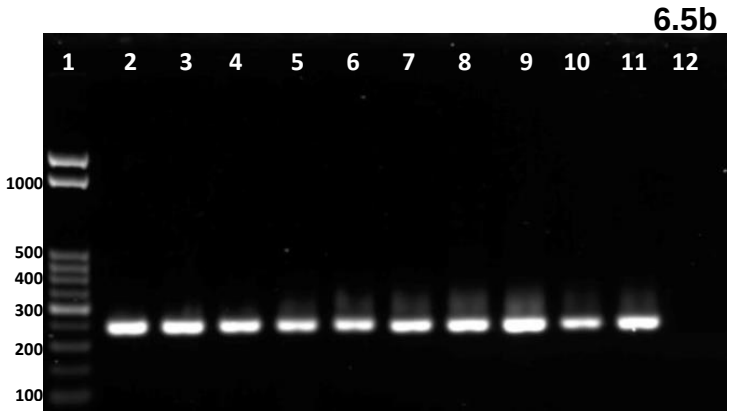


Figura 6.5. Detección de PnMV en nochebuena comercial mediante RT-PCR

6.5a. Detección de PnMV en nochebuena variedad “Prestige Red” y “Primer Red”: 1) Marcador de peso molecular; 2-11) Muestras de variedad “Prestige Red”; 12-21) Muestras de variedad “Primer Red”; 22) Control negativo. **6.5b.** Detección de PnMV en nochebuena variedad “Winter Red”: 1) Marcador de peso molecular; 2-11) Muestras de variedad “Winter Red”; 12) Control negativo.

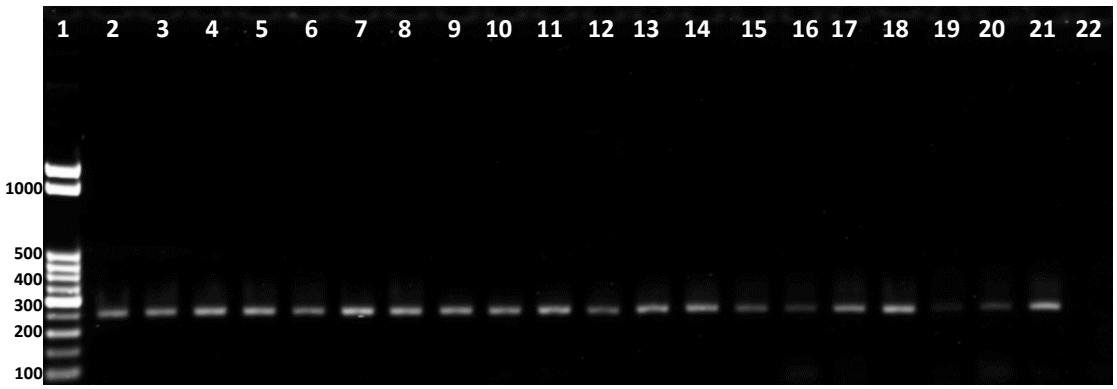


Figura 6.6. Detección de PnMV en nochebuena de sol mediante RT-PCR

1) Marcador de peso molecular; 2-21) Muestras de nochebuena de sol; 22) Control negativo.

6.5.2 Ensayo RT-LAMP

Para corroborar los resultados de RT-PCR se estableció un ensayo con RT-LAMP, en donde se analizaron muestras de ADNc de vinca y nochebuena, además de una con ARN de vinca. Se probaron temperaturas de 60 y 65 °C en nochebuena y vinca, para esta última, se observó un ligero cambió de color en la reacción con ARN

a 65 °C a partir de los 60 min, pero en todas las demás no hubo cambio de color (**Figura 6.7**), en el gel de agarosa tampoco se observaron bandas para ninguna de las reacciones.

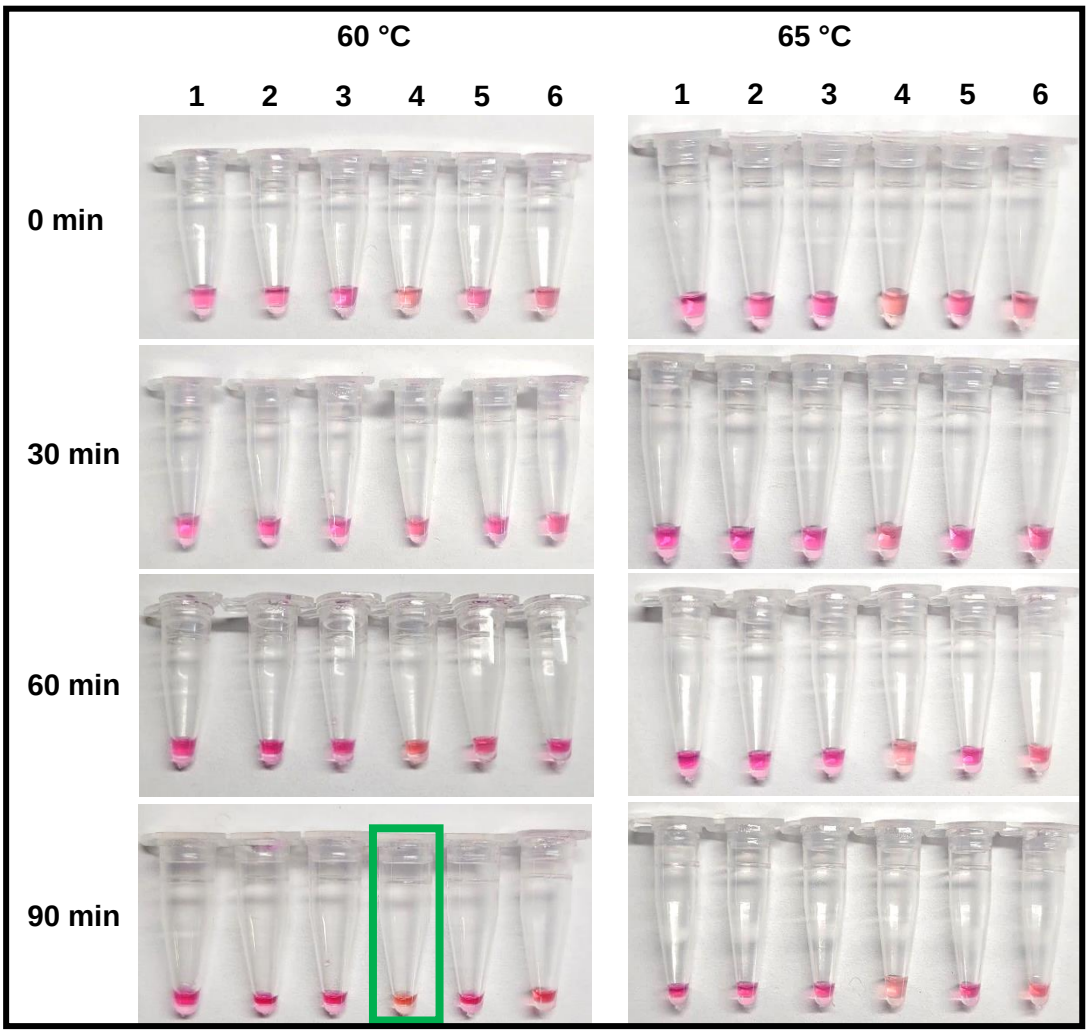


Figura 6.7. Detección de PnMV mediante RT-LAMP a 60 y 65 °C

1) Muestra de nochebuena de sol; 2) Muestra de nochebuena comercial; 3) Muestra de vinca; 4) Muestra de vinca (ARN); 5) Control negativo; 6) NTC.

Posteriormente se prepararon nuevas reacciones y se incubaron a 58 y 63 °C solo para nochebuena, esta vez el cambió de color se dio a partir de los 30 min, sin embargo, después de 90 min el cambio no fue sustancial y en el gel las bandas no son

claras (**Figura 6.8**). A 58 °C el cambio de color fue menor que a 63 °C, las bandas observadas en el gel tampoco son visibles.

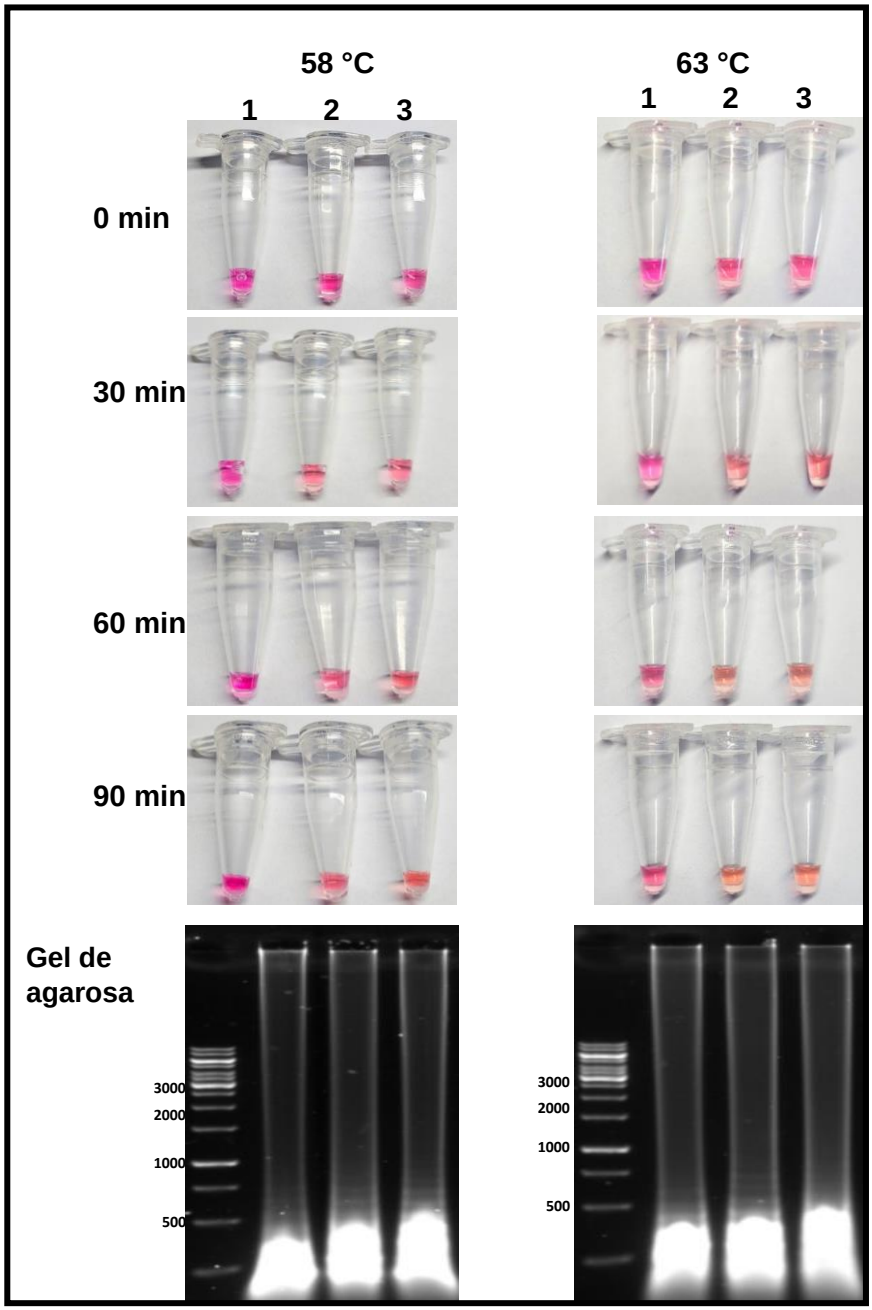


Figura 6.8. Detección de PnMV mediante RT-LAMP a 63 y 58 °C

1) NTC; 2) Muestra de nochebuena de sol; 3) Muestra de nochebuena comercial.

6.5.3 Inoculación de PnMV en vinca

Para confirmar la transmisión mecánica de PnMV en vinca, se realizaron RT-PCR a las plantas inoculadas 30 días después, sin embargo, en ninguna de ellas se obtuvo amplificación de producto, salvo en el control positivo (**Figura 6.9**). Al obtener estos resultados no es posible continuar con los postulados de Koch, por lo que este ensayo no se pudo concluir.

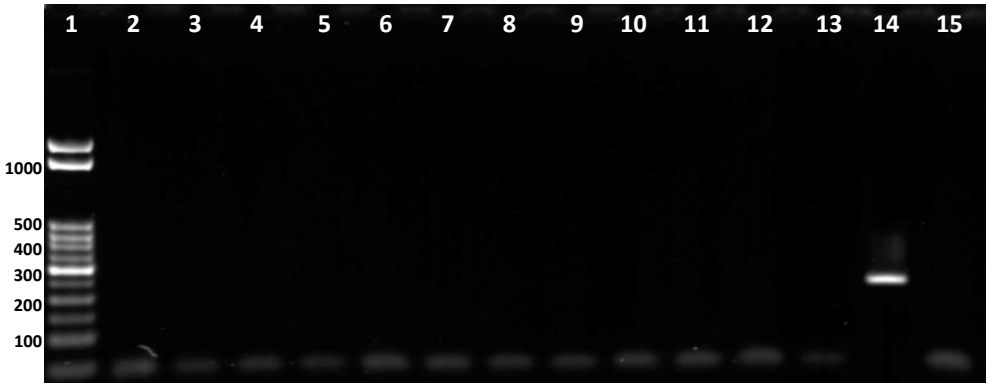


Figura 6.9. Detección de PnMV en plantas de vinca inoculadas

1) Marcador de peso molecular; 2-13) Muestras de vinca; 14) Control positivo; 15) Control negativo.

Los síntomas que se observaron en las plantas posterior a la inoculación fueron únicamente la cicatrización de las lesiones producidas en las hojas tanto por el carborundum como por el alfiler entomológico (**Figura 6.10**).

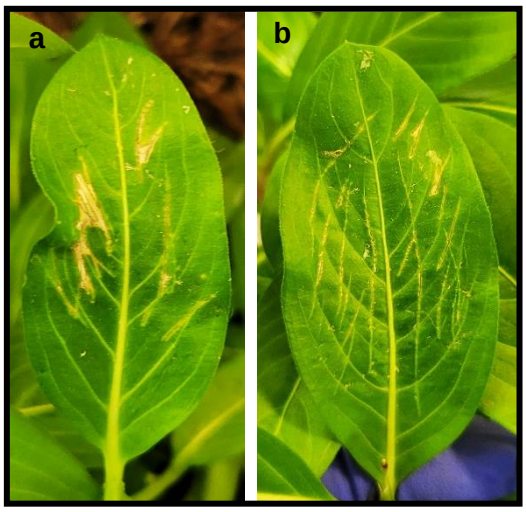


Figura 6.10. Cicatrización de lesiones producidas a hojas inoculadas con PnMV
a) Cicatrices de lesiones producidas con carborundum; **b)** Cicatrices de lesiones producidas con alfiler entomológico.

6.5.4 Secuenciación de PnMV en vinca y nochebuena

Los productos amplificados en RT-PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa MEGA 11 para conseguir la secuencia consenso de cada muestra, posteriormente estas fueron comparadas entre sí: la secuencia de vinca obtuvo un 93 % de identidad con la de nochebuena de sol, y de 94 % con la de nochebuena comercial, el porcentaje de identidad entre las secuencias de nochebuena fue del 97%.

El análisis BLAST arrojó que la secuencia obtenida de PnMV en vinca tiene una similitud de nucleótidos del 96 % con la reportada para el mismo virus por Knierim *et al.,* (2021) con número de acceso OK181764, con otras secuencias de PnMV la similitud baja de 95-93%. Por otro lado, para nochebuena comercial el porcentaje más alto de semejanza fue de 98 % con las secuencias NC_002164.1 y AJ271595.1, y para nochebuena de sol la similitud más alta fue de 96 % con las secuencias OR082777.1, NC_002164.1 y AJ271595.1. Finalmente, el porcentaje de identidad de aminoácidos fue del 99, 95, y 94 % para vinca, nochebuena de sol, y nochebuena comercial, respectivamente.

6.6 Discusión

Es la primera vez que se reporta PnMV en vinca, una planta diferente del género *Euphorbia*. Hasta el momento este virus se había considerado como exclusivo de *Euphorbia*, sin embargo, al no existir reportes de infecciones en otras plantas tampoco se descarta la posibilidad de encontrar nuevos hospederos. Los síntomas que destacaron en las plantas positivas fueron que las hojas y flores tenían menor tamaño en comparación con las otras, aunque las demás no presentaban síntomas de enfermedad también resultaron positivas al virus, lo que indica que al igual que en nochebuena se pueden presentar plantas de vinca asintomáticas (Jacobo-Villegas *et al*., 2020). Cuando se introducen nuevas especies de plantas, con frecuencia hay poca o ninguna información sobre la susceptibilidad a los virus que ocurren en su hábitat nativo, los cuales pueden adaptarse fácilmente a hospederos de familias de plantas taxonómicamente distantes (Hammond *et al*., 2023). La evolución de PnMV mediante las variaciones de su genoma para adaptarse con la planta de nochebuena ha sido documentada por Okano *et al*. (2010), tal evolución pudo haber ido más allá de solo adaptarse a *Euphorbia* y ahora puede encontrarse en otras especies además de *Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*.

La forma en cómo las plantas de vinca llegaron a infectarse con PnMV es incierta, aunque de acuerdo con las formas de transmisión reportadas es probable que en el mismo invernadero el virus haya sido transmitido por medio de las herramientas de trabajo, o bien, tomando la hipótesis de Blystad y Fløistad (2002), quienes mencionan que los trips pudieran considerase como vectores de PnMV. Es por ello que las buenas prácticas de higiene y manejo en los invernaderos es de suma importancia para evitar la transmisión de patógenos entre plantas.

Para confirmar la detección de PnMV mediante RT-PCR se hicieron análisis con RT-LAMP, sin embargo, estos los resultados no son precisos, el cambio de color en las reacciones no fue el esperado. El diseño y la funcionalidad de los iniciadores LAMP es el factor más crucial en el desarrollo de métodos de detección LAMP (Notomi et al.,

2000). La dificultad en el diseño de cebadores LAMP se atribuye a la gran cantidad de cebadores necesarios, lo que conduce a una mayor probabilidad de formar estructuras de horquilla y dímeros de cebador. De acuerdo con Galvez *et al*. (2020), la falta de amplificación puede deberse a la formación de estas estructuras secundarias del iniciador.

De acuerdo con las secuencias obtenidas y el análisis BLAST para cada una de ellas, se encontró una alta identidad de nucleótidos y aminoácidos respecto a otras secuencias de PnMV ya reportadas, indicando que existen mínimas diferencias entre cada muestra. Karavina y Gubba (2017), sugieren que esas diferencias menores entre las secuencias son evidencia de que se están produciendo algunas mutaciones en el virus, sin embargo, para poder explicar tales mutaciones es necesario realizar análisis más a fondo.

Con la finalidad de demostrar los postulados de Koch y corroborar que los síntomas presentes en vinca al momento de su muestreo eran originados por PnMV, se inocularon plantas libres de este virus previamente analizadas con RT-PCR, a las que se les provocaron lesiones con carborundum de 600 mallas y un alfiler entomológico, la fuente de inóculo fue una planta de vinca positiva al virus y después de 30 días se realizaron nuevamente RT-PCRs para confirmar la transmisión del virus, sin embargo, el resultado fue negativo para todas las plantas, es probable que las características biológicas de la planta, la solución amortiguadora utilizada, la concentración del virus en fuente de inóculo, el tiempo demorado entre la preparación y la aplicación del inóculo a las plantas sanas hayan evitado la transmisión mecánica de PnMV en vinca. Ocampo *et al*. (2013) señala que las condiciones ambientales antes, durante y después de la inoculación también influyen en el éxito de la transmisión, infección y manifestación de síntomas. El porcentaje de transmisión de PnMV en plantas indicadoras que se ha reportado no supera el 50 % (Blystad y Fløistad, 2002).

Respecto a nochebuena, se identificó PnMV en tres variedades, para una de ellas: “Prestige Red” ya se tenía registro de su infección por este virus en México (Jacobo-Villegas *et al*., 2020), pero para las otras dos: “Primer Red” y “Winter Red” es la primera vez. Los síntomas que presentaban las plantas al momento del muestreo concuerdan con Subramanya *et al*. (2019) quienes mencionan que las malformaciones y moteados son comunes en plantas infectadas con PnMV. En cuanto a la nochebuena de sol, también todas las plantas analizadas resultaron positivas, aunque ya se tenían antecedentes de la presencia de PnMV en estas plantas en los estados de Michoacán y Oaxaca (Ocampo *et al*., 2013), con este estudio, Morelos se une a la lista. La importancia económica de la nochebuena ha impulsado la generación de nuevas variedades y su mejoría, en este caso, se ha intentado eliminar PnMV de nochebuena comercial, sin embargo, solo Fløistad *et al*. (2011) han logrado su eliminación sin perder otras características importantes como es la ramificación libre, por otro lado, mediante la ingeniería genética se ha conseguido plantas resistentes a PnMV (Clarke *et al*., 2011; Islam *et al*., 2013).

6.7 Conclusiones

Es la primera vez que se detecta PnMV mediante RT-PCR en *Catharanthus roseus*. Algunas plantas de *C. roseus* positivas a este virus presentaban síntomas, sin embargo, también se presentaron plantas asintomáticas. Los resultados de RT-PCR no se pudieron confirmar con RT-LAMP, además de que la inoculación de PnMV en plantas de vinca no resultó satisfactoria con el protocolo utilizado, por lo que no se pudo continuar con los postulados de Koch.

Se detectó PnMV en dos nuevas variedades de nochebuena comercial: “Primer Red” y “Winter Red” en México mediante RT-PCR, y en nochebuena de sol proveniente del Estado de Morelos.

6.8 Perspectivas

Al haber detectado PnMV en algunas plantas de vinca mediante RT-PCR, se sugiere ampliar el tamaño de muestra, así como incluir más sitios de muestreo,

también es conveniente utilizar otro método de detección para corroborar los resultados. Si bien, en este trabajo no se logró esa comprobación con RT-LAMP, se recomienda realizar más ensayos en donde se incluyan nuevas temperaturas y tiempos de incubación, además del diseño e incorporación de los iniciadores *loop* a la reacción.

Al no poder continuar con los postulados de Koch debido a la transmisión mecánica fallida de PnMV a vinca se sugiere, por un lado, cambiar la fuente de inóculo, y por el otro, utilizar una solución amortiguadora diferente para la preparación del inóculo.

6.9 Referencias

Ali, S., Ahmad, Farooqui Nasiruddin Ahmad, S., Salman, M., y Mandal, S. (2021). *Catharanthus roseus* (sadabahar): a brief study on medicinal plant having different pharmacological activities. *Plant Archives*, *21*(1), 556–559.

Blystad, D., y Fløistad, E. (2002). Transmission of Poinsettia Mosaic Virus. *Acta Horticulturae*, *568*, 225–226.

Bradel, B. G., Preil, W., y Jeske, H. (2000). Sequence analysis and genome organisation of poinsettia mosaic virus (PnMV) reveal closer relationship to marafiviruses than to tymoviruses. *Virology*, *271*(2), 289–297. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0335

Chatzivassiliou, E. K., Weekes, R., Morris, J., Wood, K. R., Barker, I., y Katis, N. I. (2000). Tomato spotted wilt virus (TSWV) in greece: Its incidence following the expansion of *Frankliniella occidentalis*, and characterisation of isolates collected from various hosts. *Annals of Applied Biology*, *137*(2), 127–134. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00044.x

Clarke, J. L., Spetz, C., Haugslien, S., Dees, M. W., Moe, R., y Blystad, D. R. (2011). Production of transgenic poinsettia with resistance against poinsettia mosaic virus (PnMV) using agrobacterium-mediated transformation. *Acta Horticulturae*, *901*, 87–94. https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.901.10

Conceiçãoa, S. M., da Silva, R. F., Reis, M. S., Jadão, A. S., Rosa, D. D., Giampan, J. S., Kitajima, E. W., Rezende, J. A. M., y Camargo, L. E. A. (2011). Characterization of a new potyvirus causing mosaic and flower variegation in *Catharanthus roseus* in Brazil. *Scientia Agricola*, *68*(6), 687–690. https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000600013

Fløistad, E., Spetz, C., y Blystad, D. R. (2011). Virus elimination and retention of free branching in poinsettia. *Acta Horticulturae*, *901*, 207–214. https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.901.26

Fulton, R. W., y Fulton, J. L. (1980). Characterization of a Tymo-like Virus Common in Poinsettia. *Phytopathology*, *70*(4), 321. https://doi.org/10.1094/phyto-70-321

Galvez, L. C., Barbosa, C. F. C., Koh, R. B. L., & Aquino, V. M. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of abaca bunchy top virus and banana bunchy top virus in abaca. *Crop Protection*, *131*(January). https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105101

Haenni, A., y Monod, I. J. (2009). Tymoviruses. In M. H. V. Van Regenmortel y B. W. J. Mahy (Eds.), *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology* (Issue 1, pp. 199–207).

Hammond, J., Huang, Q., Jordan, R., Meekes, E., Fox, A., Vazquez-Iglesias, I., Vaira, A. M., Copetta, A., y Delmiglio, C. (2023). International Trade and Local Effects of Viral and Bacterial Diseases in Ornamental Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *61*, 73–95. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-114618

Islam, M. A., Lütken, H., Haugslien, S., Blystad, D. R., Torre, S., Rolcik, J., Rasmussen, S. K., Olsen, J. E., y Clarke, J. L. (2013). Overexpression of the AtSHI Gene in Poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, Results in Compact Plants. *PLoS ONE*, *8*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053377

Jacobo-Villegas, O., Colinas-León, M. T., Lozoya-Saldaña, H., Alia-Tejacal, I., Camacho-Tapia, M., Leyva-Mir, S. G., Tovar-Pedraza, J. M., y Pérez-Nicolás, M. (2020). Identification of Poinsettia mosaic virus (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *38*(3), 420–433. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-3

Jacobo-Villegas, O., Valdovinos-Ponce, G., Ramírez-Rojas, S., y Hernández-Juárez, C. (2015). Búsqueda de fuentes de resistencia al Poinsettia mosaic virus en plantas silvestres de nochebuena TT - Search for sources of resistance to Poinsettia mosaic virus in wild poinsettia plants. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *33*(2), 219–231.

Knierim,D., Margaria,P., Menzel,W. and Winter,S. (2021). Secuencia OK181764.1:

Poinsettia mosaic virus isolate DSMZ PV-0340, complete genoma. GenBank.

Lebas, BSM; Ochoa, CFM; Elliott, DR; Tang, JZ y Alexander, BJR. (2007). Detection of Poinsettia mosaic virus by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *Plant Disease* 91:110.

Karavina, C., y Gubba, A. (2017). Detection and characterization of Tomato spotted wilt virus infecting field and greenhouse-grown crops in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, *149*(4), 933–944. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1243-4

Ocampo, T., Ochoa, D. L., Ramírez, S., Valdovinos, G., y Nava, C. (2013). First report of tobacco mosaic virus (TMV) and poinsettia mosaic virus (PnMV) in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* willd. ex klotzch) in Mexico. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, *82*(595), 235–241. https://doi.org/10.32604/phyton.2013.82.235

Okano, Y., Maejima, K., Shiraishi, T., Hashimoto, M., Senshu, H., Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Yamaji, Y., y Namba, S. (2010). Genetic heterogeneity found in the replicase gene of poinsettia mosaic virus isolates. *Archives of Virology*, *155*(8), 1367–1370. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0708-y

Padmaa Paarakh, M., Swathi, S., Taj, T., Tejashwini, V., y Tejashwini, B. (2019). *Catharanthus roseus* Linn—A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, *3*(10), 19–24. https://doi.org/10.31080/asps.2019.03.0393

SADER 2023 Productores de México, atienden demanda de la Flor de Nochebuena https://www.gob.mx/agricultura/yucatan/es/articulos/productores-de-mexico-atienden-demanda-de-la-flor-de-nochebuena#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20de%20Nochebuena%20cerr%C3%B3,mil%20plantas%20reportadas%20en%202021.

Salazar, L. F., Müller, G., Querci, M., Zapata, J. L., y Owens, R. A. (2000). Potato yellow vein virus: Its host range, distribution in South America and identification as a crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, *137*(1), 7–19. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00052.x

Samad, A., Ajayakumar, P. V., Gupta, M. K., Shukla, A. K., Darokar, M. P., Somkuwar, B., y Alam, M. (2008). Natural infection of periwinkle (*Catharanthus roseus*) with Cucumber mosaic virus , subgroup IB . *Australasian Plant Disease Notes*, *3*(1), 30. https://doi.org/10.1071/dn08013

Singh, H. P., Hallan, V., Raikhy, G., Kulshrestha, S., Sharma, M. L., Ram, R., Garg, I. D., y Zaidi, A. A. (2005). Characterization of an Indian isolate of carnation mottle virus infecting carnations. *Current Science*, *88*(4), 594–601.

Subramanya, K. S., Mandal, B., Hammond, J., y Scott, S. W. (2019). Encyclopedia of plant viruses and viroids. In *Alternative Medicine Review* (1st ed., Vol. 8). Springer New Delhi. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-43044-9.00130-8

Taylor, J. M., Lopez, R. G., Currey, C. J., y Janick, J. (2011). The poinsettia: History and transformation. *Chronica Horticulturae*, *51*(3), 23–28.

7. Anexos

7.1 Publicaciones

García-Chávez, M.A., Rodríguez-Arrieta, J. A., Martínez-Fernández, E., López-Martínez, V., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., y Avonce, N. (2023). Presence of flower thrips *Frankliniella schultzei* in ornamental plants. *Agro Productividad*. 16 (7), 97-101. https://doi.org/10.32854/agrop.v16i6.2529

García-Chávez, M.A., Martínez-Fernández, E., Juárez López, P., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V. y Avonce, N. (2024). Detección del Virus de la Mancha Necrótica de Impatiens (INSV) en trips y plantas ornamentales mediante RT-LAMP. *Biotecnia*. 26, 324-331. https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.2256

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2024-09-11 12:11:27 | FIRMANTE

f81QZ9lOUKxCaq8Z6Um98e9ybQPJHiTbB5sK/y8UTROg2B4YCSd22it06LA6THqlAxRVcDMV3eAV+juR/mn3VhAyzIP5PhCUSu/gC1/BCY416QfGdWpTm8+RtviaXbcKH8BFRTBD/uMxVevTlCf8VNhz2ySfCJX7KJ8eOua4bW01dZHg4LaPbTIolK58dNuWGT3GCFXRRTrx6alLIvFPuWHPgrnw7/i5zB3M67mIHZ64hYgVg6J8cZjHd2YAIjuKLTCOTgtPozWmmfm2R+pCSSfvmuZ5VZMSkWcSUZ45UtrGV7ROidX5M3PCHPd4EiIIriPzU7DNB6KBG+Bl4YOokg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

fGz1hqeJ4

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pKKq01EwsnSKLWQCjizV2uWaCSlfdRlZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. VÍCTOR LÓPEZ MARTÍNEZ

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR LOPEZ MARTINEZ | Fecha:2024-09-06 07:48:14 | FIRMANTE

m8jJBVWhxo0BG49RZKsGykyIsrVuRFwzOFETqmcdbCl9Jk6kUO30nP0KpVfC6YrqUmvUwTrBm3ggnoKpqzdht0a68FNGCVc+jad0IfY2PPvpSpcl9nbnlb48v6MzvG42jhozsvjhpIFmob+76neR6gxGqJ+VFBxtjQj1jSP7iy4kLkVHjGEUcQLpkE1wu+4NGsaB6+fFOZel6R/ngZozz2f1/f1QieqmkES0G7B5RqaoRsHd/qLnPUHNvRizKkuZyoLF3hDOIlA0uImNxA/j/Z+qe0RfNUum8aNe/fP5+6UsTZDOlkib8k/aan0LRS6kAwkbVVcMKN/CbzoouvHKig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

DKefi5obX

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pMW1MQ344PZbtjvt4efz5cUgzFG5zKDz

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PORFIRIO JUAREZ LOPEZ | Fecha:2024-09-05 10:54:32 | FIRMANTE

TN37Gaw7pSJazG6nXexR9DKYQkT9fUsSHlHEnxfkX9ujkAqrzL7wvzB2k7s/h7+GyiywtGu4oxWqb3zcTIR5OCR/l34kHjOebkhwuP2/+/blpwWNA4wJr4mALzPaK7bII4VqfkFQgJ1UD5V5C+kelCwHZfzhFc5JZ6pgLEamrL502sprXefzI2lGWr2bBVLFtmLi0quy3umEZtsSrCPlvLJ3l3klA9UcCsBhg+cy9NXm+kMlqrdoemnqyyixszs0Z6wYnsUv2C/nlepzUid2wNx5twA8kzz6jm2VQSEZLUNwWA06ZEwqPAG3lAYqhZpxmCgwDZKbGT1fnSUSVROrxA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

odgU1G0zn

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Bjt06OJ5dCCjHE4cIoj3AvGM7fo6oAF3

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. IRAN ALIA TEJACAL

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRAN ALIA TEJACAL | Fecha:2024-09-05 18:41:37 | FIRMANTE

PJSsPyiW6AiHnh0liiQiAgOHWSl4eLlzclP6rrfyzFNBWlFr4ZoYIk6vnzX88LCsf/QAD4cH6GbT1GSBgpZjrPtVa5MCdt95AnEmGMUMPXN9LpsusFxvtshA9BPCSI0Yt/bzocC0IRD/v6QJc1XyoGybnYRsJz10tJUgHn88d9dGyN8El5lBifAqhTaUqMJVuNHAexQ6AATdfszZubCsSvxDAytM5riBzQ2S1OnCLuqXpYhZuW+bOy0Mhl4/CCl7hUF4EmwGNczTMTWhz3EkByE5/3KxF/PGWaq/K4tPztu10hICO1cGUiXcAuZa2mZl9N3tMmvz80g7CQkRH9S6cQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

6x31Qq5nm

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xbirLDkqC2VDlz9GUWF3K3LnczQRt8Ji

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DRA. MARÍA CLAUDIA RUEDA BARRIENTOS

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA CLAUDIA RUEDA BARRIENTOS | Fecha:2024-09-09 22:57:39 | FIRMANTE

gpc1tEvJjLqr0iA22ywHIT9T2YSePJU9tY/+oXdxGFwxB7rQkNt4XV85ikcKZ2R0J5obO1FGifUS0Wm/0wPvMMIHWZlFopB8F7WX5sgZ8oOTyDrWCzEwKxsG6h/HxFRa/P2S1db4AycolvLaanm0xkFOw5snOzsxHXFNAuHhXsPJrkG2Bb8BETflFaw9cFy3ah1pblgZmIDz6g2Dus4vGkYqst73OGSp2Dg7DWtT6bSjamK9KdwmxcmqIuFLDLPSZso4U80oNjGfV9Lcc6bJ3+Abmq25KMc+XVLBYiJ5wxunUexq4bF8gicQ0Z3Kc5Z+a4rI8GdwAjg2m6rLdbnKZQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

dJDGHvTom

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/r10Ya2sV2WZsKiNlxayzeidiKsd61YNb

UAEM RECTORÍA 2023-2029

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES | Fecha:2024-09-05 15:52:50 | FIRMANTE

c9TMShfye0d0b3I58KZzibniOTlZ/9MMbwKru/sqWpbjJJUTqm1LZghnkug/q2cssRAsILRKf8IHSCCtABbop+uMox8+wHZbQ414fvNnd5btWPAbfBrTBYxaGZEiUSTqP1G95Mh9LU
vLBwdvx5frCteMZ/iVkeG//V203V8cHMg61iA24a56HmmtoiDPMF15+3PiGZ6Z/87R/VFtQjn4+aS36DdNFUlnYPt4os1bMdMgc05vJfrOjg++8sBGrBCwhS5ZE1Xc8PLoaX+YhZripv
8I3/gRQ7+yGVunopz3bt8QDNGaAPmAvIqxhCBSQofZI2DuoKGR4NTRG+8ZHK4YaQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

NLhRV2FuM

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ozZii5WUt4AgSBufbydSl0qD0ycS80c9

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dirección
Jefatura de los Programas Educativos de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 5 de septiembre de 2024
Asunto: voto aprobación de tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente le informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado **DETECCIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN TRIPS Y PLANTAS ORNAMENTALES (*Impatiens hawkeri, Catharanthus roseus* y *Euphorbia pulcherrima*) MEDIANTE KITS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR** que presenta la **M. en C.A. MARÍA DE LOS ÁNGELES GARCÍA CHÁVEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ** y la codirección del **DR. NELSON AVONCE VERGARA,** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL,** lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la estudiante continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
La respuesta universitaria al campo

Se anexa hoja con firma electrónica
DR. GUADALUPE PEÑA CHORA

C.i.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2024-09-05 20:29:14 | FIRMANTE

3o499rPzYhS7GBMwLie1rdyEWh1hVw0yesSp2EbwLqI7yPvl4AepA4opdfhnqqSftYUNNfDVGbh2AniZxeab2cKMdfaNSVpQERiSblwC7/+F+rnnlX2EYdqKKnu/0gvTvlaUNFKM8g6Jwx1LSqs1TPhr/rJ/NZvBHZFC0mQNcNJyaEWDuGY02pn2a6ZrFJ40GO2k8gS3ikkpeL8x3GJI0lNVnYRnZsDYUEu/NtT3dmXS+9Xd2EZo//2KW9/v+fZogAVlOr2dVpDyGu0aTeEAMW6PIa/AgIJ6eYEe2Ls3uX6Z6ArtSeLumf6E08VHc6PkDUjfY8hWIbDpz8V7yPIxoQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

dfNTuitP2

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/61L4JViLEV15qUEo5n2Y1MxSvuP5XzMd