

DETECCIÓN DE COMPLEJOS PATOGENICOS VIRALES EN LECHUGA POR ELISA Y CONFIRMADOS POR RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Graciela Hortensia Niño-Mendoza, Ma. Fabiola León-Galván y Martha Juana Navarro-León

RESUMEN

Se evaluaron los híbridos Mixteca, Stallion, Antigua, Cartagena y Centauro de lechuga (*Lactuca sativa*), en dos fechas de plantación y tres localidades en los municipios de Corregidora, Pedro Escobedo y Huimilpan, Querétaro, México. Se evaluó por ELISA la presencia de los virus BWYV, CMV, LMV, AMV y TSWV, a los 30, 45 y 60 días después del trasplante, y se confirmó por RT-PCR. Por serología la frecuencia de los cinco virus fue de 9,8; 23,6; 0,9; 2,2 y 9,3%, respectivamente. De las 39 muestras analizadas por RT-PCR, el 69,9% resultaron negativas y el 30,1% presentaron infec-

ciones bien sea monovirales o complejos de dos y tres virus. Los virus detectados se presentaron como infecciones de un solo virus en el 41,0% de las muestras, como complejos de dos virus en el 33,3%, de tres virus en el 15,4%, y como muestras negativas a los cinco virus en el 10,3%. A partir del análisis de RT-PCR, la frecuencia de los virus BWYV, CMV, AMV y TSWV fue de 38,5; 48,7; 10,3 y 56,4; respectivamente. La mayor infección viral por ELISA y RT-PCR fue de CMV, BWYV y TSWV, los cuales estuvieron presentes en las tres localidades estudiadas.

Introducción

La importancia del cultivo de lechuga ha aumentado en los últimos años, debido a la diversificación de variedades y al incremento de su consumo (Suárez y Serrano, 2012). En México, en el año 2014 la superficie cultivada fue de 19440ha, con una producción de 406678t. Los principales estados productores fueron: Guanajuato, Zacatecas, Puebla, Aguascalientes, Baja California, y Querétaro, con 102639, 69041, 51702, 44330, 22085 y 26064t, respectivamente (SIAP, 2014). Para 2014, en los estados de Guanajuato y Querétaro se cultivaron 6033 y 732ha con un rendimiento promedio de 17,64 y 28,55t·ha⁻¹, respectivamente (SIAP, 2014).

La lechuga es afectada por una serie de enfermedades que merman su producción. La incidencia y severidad de éstas depende del organismo causante, la susceptibilidad de la planta y el medio ambiente. Entre los principales factores a considerar en el proceso productivo de la lechuga están las enfermedades virales, las que han aumentado en las regiones productoras de lechuga (Moreno *et al.*, 2004). Se ha reportado al virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*; LMV) como uno de los patógenos más importantes a nivel mundial y probablemente la transmisión por semilla es el factor principal en la dispersión de este virus. Estudios sobre la transmisión por semilla del LMV en lechuga mostraron tasas de transmisión en

híbridos tolerantes y susceptibles del 1,9 y 16,5%, respectivamente (Jadao *et al.*, 2002). En la región de Murcia y Navarra, España, los principales virus que afectan a esta hortaliza son, además del LMV, el CMV (*Cucumber mosaic virus*) del pepino, el TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) del tomate y el BWYV (*Beet western yellows virus*) de la remolacha, los cuales son transmitidos por varias especies de áfidos y trips (Moreno *et al.*, 2004). Fletcher *et al.* (2005) encuentran a los virus BWYV, CMV y LMV como de los más importantes que afectan a la lechuga en Nueva Zelanda; sin embargo, reportan no haber detectado al TSWV. Pavan *et al.* (2008) mencionan a los virus LMV, TSWV y CMV como de los

más importantes que afectan a la lechuga en Brasil. Soleimani *et al.* (2011), indican que en la Provincia de Terán, Irán, en un estudio realizado en los cultivares de lechuga Mantilia y Terocadero, obtuvieron porcentajes de infección por LMV, CMV y TSWV de 21, 16 y 10%, respectivamente; en infecciones mixtas reportan que la co-infección por LMV-CMV fue de 16%, LMV-TSWV 8%, CMV-TSWV 8% y LMV-CMV-TSWV del 5%. Estos autores indican que independientemente de que la infección haya sido simple o mixta se detectaron a los virus LMV, CMV y TSWV en 49, 44 y 31% de las muestras analizadas.

Los principales insectos plaga del cultivo de lechuga son los trips y áfidos, los que

PALABRAS CLAVE / Frecuencia Viral / *Lactuca sativa* / Marcadores Moleculares / Serología / Virus Fitopatógenos /

Recibido: 25/06/2014. Modificado: 15/07/2016. Aceptado: 20/07/2016.

Luis Pérez-Moreno. Ingeniero Agrónomo Fitotecnista, Universidad de Guadalajara (UdeG), México. Maestro en Ciencias Especialista en Fitopatología, Colegio de Postgraduados, México. Doctor en Ciencias Especialista en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV-IPN, Irapuato, México. Profesor-Investigador, Universidad de Guanajuato

(UG), México. Dirección: Departamento de Agronomía, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, UG (DICIVA-CIS-UG). Km 9 carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Guanajuato. C.P. 36500, México. e-mail: luispm@ugto.mx

Graciela Hortensia Niño-Mendoza. Ingeniera Agrónoma, Instituto Tecnológico de Roque,

México. Maestra en Protección Vegetal de Hortalizas, DICIVA-CIS-UG, México. Asistente de Investigación, DICIVA-CIS-UG, México.

Ma. Fabiola León-Galván. Ingeniera Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, México. Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y Doctora en Ciencias en Biología Molecular, Instituto Poto-

sino de Investigación Científica y Tecnológica, México. Profesora-Investigadora, DICIVA-CIS-UG, México.

Martha Juana Navarro-León. Ingeniera Agrónoma y Maestra en Protección Vegetal de Hortalizas, DICIVA-CIS-UG, México. Profesora, DICIVA-CIS-UG, México.

PATHOGENIC VIRAL COMPLEXES DETECTED IN LETTUCE BY ELISA AND CONFIRMED BY RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Graciela Hortensia Niño-Mendoza, Ma. Fabiola León-Galván and Martha Juana Navarro-León

SUMMARY

Five lettuce (*Lactuca sativa*) hybrids were evaluated: Mixteca, Stallion, Antigua, Cartagonova and Centaurin, with two planting dates at three locations in Corregidora, Pedro Escobedo and Huimilpan counties, Queretaro state, Mexico. By means of ELISA, five viruses were evaluated: BWYV, CMV, LMV, AMV and TSWV, at 30, 45 and 60 days after planting and findings were confirmed by RT-PCR. Serologically, the five detected viruses had frequencies of 9.8, 23.6, 0.9, 2.2 and 9.3%, respectively. Of the 39 samples analyzed by RT-PCR, 69.9% were negative and

30.1% had either single virus infection or viral complexes of two and three viruses. Detected viruses were presented in 41.0% of the samples as a single virus infection, in 33.3% as a complex of two viruses, in 15.4% of three viruses, and in 10.3% as negative samples to the five viruses. Frequencies from RT-PCR analysis for BWYV, CMV, AMV and TSWV viruses were 38.5, 48.7, 10.3 and 56.4%, respectively. Most of the viral infections detected by ELISA and RT-PCR were CMV, BWYV and TSWV, and these viruses were also detected in all three counties.

DETECÇÃO DE COMPLEXOS PATOGENICOS VIRAIS EM ALFACE POR ELISA E CONFIRMADOS POR RT-PCR

Luis Pérez-Moreno, Graciela Hortensia Niño-Mendoza, Ma. Fabiola León-Galván e Martha Juana Navarro-León

RESUMO

Avaliaram-se os híbridos Mixteca, Stallion, Antigua, Cartagonova e Centauro de alface (*Lactuca sativa*), em duas datas de plantação e três localidades nos municípios de Corregidora, Pedro Escobedo e Huimilpan, Querétaro, México. Avaliou-se por ELISA a presença dos vírus BWYV, CMV, LMV, AMV e TSWV, aos 30, 45 e 60 dias depois do transplante, e se confirmou por RT-PCR. Por serologia a frequência dos cinco vírus foi de 9,8; 23,6; 0,9; 2,2 e 9,3%, respectivamente. Das 39 amostras analisadas por RT-PCR, 69,9% resultaram negativas e 30,1% apre-

sentaram infecções bem seja monovirais ou complexos de dois e três vírus. Os vírus detectados se apresentaram como infecções de um só vírus em 41,0% das amostras, como complexos de dois vírus em 33,3%, de três vírus em 15,4%, e como amostras negativas aos cinco vírus em 10,3%. A partir da análise de RT-PCR, a frequência dos vírus BWYV, CMV, AMV e TSWV foi de 38,5; 48,7; 10,3 e 56,4; respectivamente. A maior infecção viral por ELISA e RT-PCR foi de CMV, BWYV e TSWV, os quais estiveram presentes nas três localidades estudadas.

además del daño al follaje, afectan la calidad de la cabeza (SDR, 2010). Sin embargo, los daños indirectos que provocan los trips en el cultivo de lechuga son más graves y consisten en la transmisión del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), siendo el trips occidental (*Frankliniella occidentalis* (Pergande)) la especie vectora más importante (Lacasa y Contreras, 1993; Agrios, 2005).

El presente estudio tuvo como objetivo detectar los virus presentes, ya sea en forma simple y/o en complejos virales en follaje de lechuga mediante análisis por ELISA y confirmarlo por RT-PCR.

Materiales y Métodos

Híbridos de lechuga evaluados

En las tres localidades de prueba fueron evaluados los híbridos de lechuga (*Lactuca sativa*) conocidos como Mix-

teca, Stallion, Antigua, Cartagonova y Centauro.

Localización de los cinco experimentos y las fechas de plantación

En una primera fecha de plantación, el 09/02/2010, se establecieron dos experimentos: el primero en el Rancho Vanegas, en el municipio de Corregidora (20°36'-20° 22'N y 100°22'-100°30'O, 1820msnm) y el segundo en el Rancho Noria Nueva, en el municipio de Pedro Escobedo (20°35'01.90"-20°21'N y 100°04'-100°18'O, 1920msnm). En la segunda fecha de plantación, el 01/06/2010, se establecieron tres experimentos: el primero en el Rancho Vanegas en Corregidora, el segundo en el Rancho Noria Nueva, en Pedro Escobedo y el tercero en el Rancho el Milagro, en el municipio de Huimilpan (20°36'-20°22'N y 100°11'-100°24'O, 1970msnm). Los tres municipios pertenecen al estado de Querétaro, México.

Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para evaluar la presencia de virus fitopatogénicos fue de bloques completos al azar, con tres repeticiones. Cada uno de los cinco experimentos tuvo 15 parcelas o unidades experimentales, las cuales consistieron de un surco de 5m de largo por 1m de ancho; se establecieron dos hileras de plántulas de lechuga por surco, con una separación entre hileras de 0,30m y una distancia entre plantas de 0,30m, para una densidad de población de 65000 plantas/ha.

Evaluación viral

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, México. Se evaluó la presencia del luteovirus: virus del amarillamiento occidental de la remolacha (*Beet western yellows*

virus; BWYV), del cucumovirus: virus mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*; CMV), del potyvirus: virus mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*; LMV), del alfamovirus: virus mosaico de la alfalfa (*Alfalfa mosaic virus*; AMV), y el tospovirus: virus de la marchitez manchada del tomate (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV). Para la detección de los virus se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática (ELISA; Clark y Adams, 1977; Cruz y Frías, 1997). Para la determinación de los virus, se utilizaron los kits de Agdia Inc., conjugándose con la enzima fosfatasa alcalina. Los controles positivo y negativo (extracto de hojas de lechuga) fueron obtenidos de Agdia Inc. La absorbancia se determinó en el espectrofotómetro BIO-RAD Modelo 3550-UV, a 405nm. Para la confirmación de los resultados obtenidos con ELISA se usó la técnica de RT-PCR (Pérez-Moreno et al., 2013).

Fechas de evaluación y colectas

La detección viral se realizó en tres fechas de muestreo, a los 30, 45 y 60 días después del trasplante (ddt). Para formar la muestra a evaluar, se recolectó una hoja de cada una de cinco plantas de la parcela experimental; dependiendo del híbrido plantado, las plantas podían presentar síntomas presuntivos de una virosis, como por ejemplo: enchimamiento, mosaico, amarillamiento, necrosis y enanismo, o ser asintomáticas. Se analizaron 225 muestras (3x15x5), obtenidas al realizar tres muestreos en cada una de las 15 unidades experimentales de los cinco experimentos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en congelación (-20 °C) hasta su procesamiento.

Evaluación por ELISA y determinación del límite de detección

Se obtuvieron lecturas de cada muestra por duplicado y se asignó el valor medio de cada par. El valor del control sano se calculó con base en el promedio de los dos valores de absorbancia del testigo sano (negativo) para cada virus. Como criterio para determinar el límite de detección, se usó el valor medio del control negativo +0,05 de densidad óptica; todo valor mayor a este límite se consideró positivo (Cruz y Canseco, 1995).

Detección de los virus por RT-PCR

Los resultados obtenidos en la detección viral por ELISA, se corroboraron por RT-PCR. En las muestras de follaje de lechuga seleccionadas por su resultado obtenido con la técnica de ELISA se realizó la extracción de RNA total, utilizando el método del Trizol (Trizol®; Invitrogen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para la retrotranscripción (síntesis de cDNA) se empleó 1µg del RNA de cada muestra ana-

lizada. Para su síntesis se utilizó la enzima Super Script IIA (Invitrogen) y se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante.

Los oligonucleótidos para cada virus fueron diseñados en regiones específicas del gen que codifica para la proteína de la cápside.

BWYV F 5'-CGTGGGTAGGAGAACAATCAATG-3'
BWYV R 5'-TAAGACGCTGTAACGCCGC-3'
CMV F 5'-GGGTAGTGAGCGTTGTAACCTGG-3'
CMV R 5'-ATGTGGGAATGCGTTGGTGC-3'
LMV F 5'-AAGAAGGACGACGACTCCAACG-3'
LMV R 5'-CTCCATCCATCCAAACAGTCTG-3'
TSWV F 5'-GCATACTCTTCCCTCTTCCACC-3'
TSWV R 5'-CTTCAGACAGGATTGGAGCCAC-3'
AMV F 5'-TAATGGGCTCGGCGTGAGATTC-3'
AMV R 5'-CAAACAGAGGGCTACGGCATAG-3'

Para obtener los amplicones de cada virus se utilizaron las siguientes condiciones en un termociclador C1000 DUAL de Biorad: para todos se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3min, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30s, temperatura de alineamiento por 60s, de 61,4°C para BWYV; de 61,0°C para CMV; de 64,1°C para LMV; de 61,0°C para AMV; y de 60,2°C para TSWV; una extensión a 72°C por 90s, y un ciclo con una extensión final de 72°C para los cinco virus por 7min. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador con luz UV.

Resultados

Detección de virus por ELISA

Se detectó la presencia de los cinco virus en 225 muestras de follaje de lechuga. En la primera, segunda y tercera fechas de muestreo se detectó el BWYV con una frecuencia, respectivamente, de 4,0; 9,3 y 16,0%; el CMV con 16,0; 18,7 y 36,0%; el LMV con 1,3; 1,3 y 0,0%; el AMV con 5,3; 0,0 y 1,3%; y el TSWV con 8,0; 1,3 y 18,7%. La frecuencia promedio de los virus BWYV, CMV,

LMV, AMV y TSWV fue de 9,8; 23,6; 0,9; 2,2; y 9,3%, respectivamente (Figura 1).

De las 39 muestras positivas al menos a un virus por ELISA, el 100% presentaron infecciones simples, complejos de dos, tres y cuatro virus. Los virus detectados se presentaron como infecciones de un solo virus en el 79,5%; como complejos de dos virus en el 12,8%; de tres virus en el 5,1%; y de cuatro virus en el 2,6% (Figura 2).

Detección de virus presentes en follaje de lechuga por RT-PCR

La técnica de RT-PCR permitió detectar y confirmar la presencia de cuatro de los cinco virus analizados. El tamaño de los fragmentos amplificados por RT-PCR fue de 461 pb para el CMV (Figura 3), de 313 pb para el

AMV (Figura 4), de 403 pb para el TSWV (Figura 5), y de 468 pb para el BWYV (Figura 6). Finalmente, se confirmó por RT-PCR que la muestra de follaje de lechuga positiva detectada por ELISA no tenía la presencia del virus LMV. En la localidad de Pedro Escobedo se tuvo mayor frecuencia de los virus TSWV y CMV con el 30,8 y 20,5%; seguido del BWYV y AMV con 18,0 y 7,7%, respectivamente. En Corregidora se encontró que los virus BWYV, CMV y TSWV presentaron una frecuencia del 15,4%; seguido del AMV con 2,6%. En Huimilpan se tuvo mayor frecuencia del virus CMV con 12,8%; seguido del TSWV y BWYV con 10,3 y 5,1%, respectivamente. Finalmente, el virus LMV no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas de las tres localidades (Figura 7).

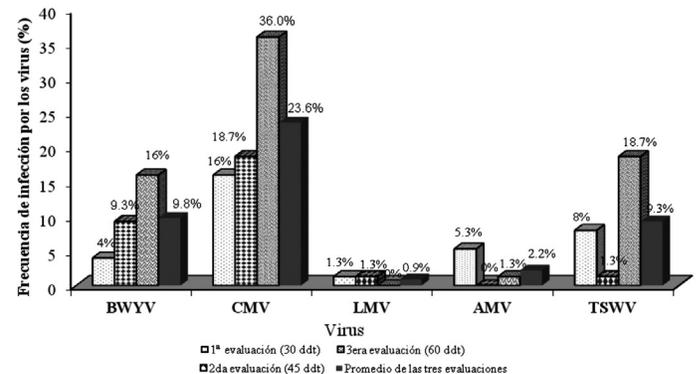


Figura 1. Frecuencia (%) de infección por los virus BWYV, CMV, LMV, AMV y TSWV en follaje de lechuga, en tres fechas de muestreo, durante el periodo de Febrero-Julio de 2010.

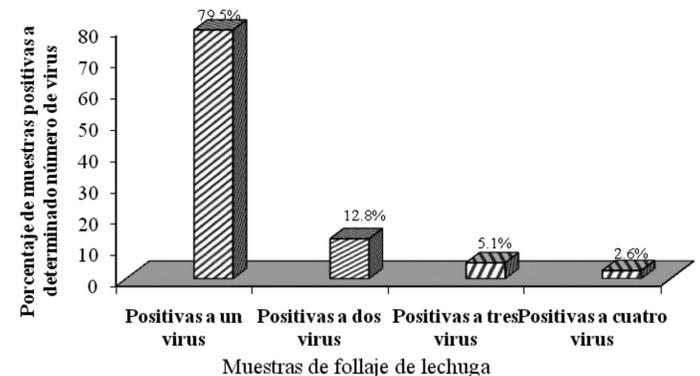


Figura 2. Porcentaje de muestras positivas por ELISA a los diferentes virus evaluados en el follaje de lechuga, durante el periodo de Febrero-Julio de 2010.

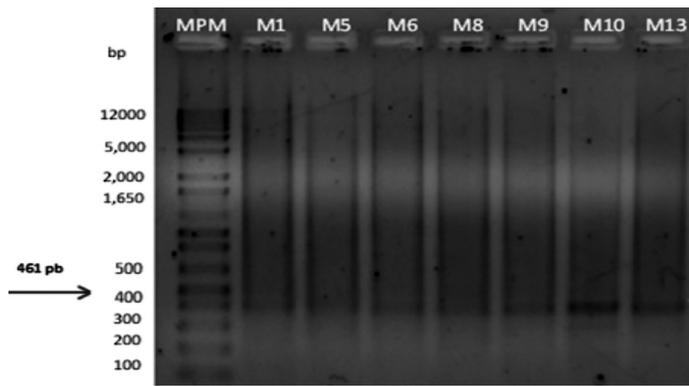


Figura 3. Virus CMV. Marcador de tamaño molecular y muestras (localidad, híbrido y fecha de plantación -fp). MPM: Marcador de tamaño molecular (Invitrogen 1kb + ladder); M1: Corregidora, Stallion, segunda fp); M5: Corregidora, Mixteca, primera fp; M6: Corregidora, Cartagonova, primera fp; M8: Corregidora, Centaruro, segunda fp; M9: Corregidora, Cartagonova, segunda fp; M10: Corregidora, Antigua, segunda fp; M13: Corregidora, Cartagonova, primera fp.

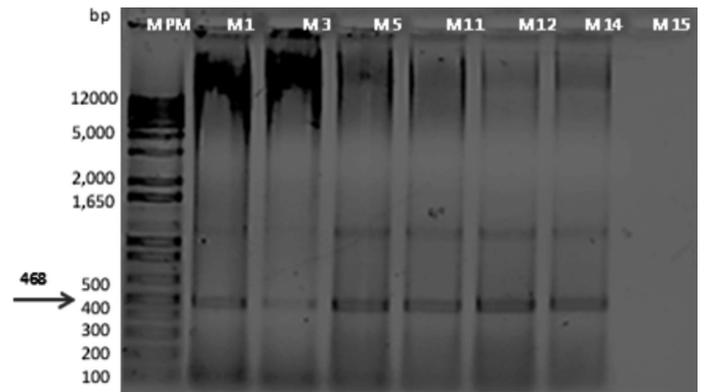


Figura 6. Virus BWYV. Marcador de tamaño molecular y muestras (localidad, híbrido y fecha de plantación -fp). MPM: Marcador de tamaño molecular (Invitrogen 1kb + ladder); M1: Corregidora, Stallion, segunda fp; M3: Corregidora, Antigua, primera fp; M5: Corregidora, Mixteca, primera fp; M11: Corregidora, Antigua, primera fp; M12: Corregidora, híbrido Mixteca, primera fp; M14: Pedro Escobedo, Stallion, segunda fp; M15: Pedro Escobedo, Satillon, segunda fp.

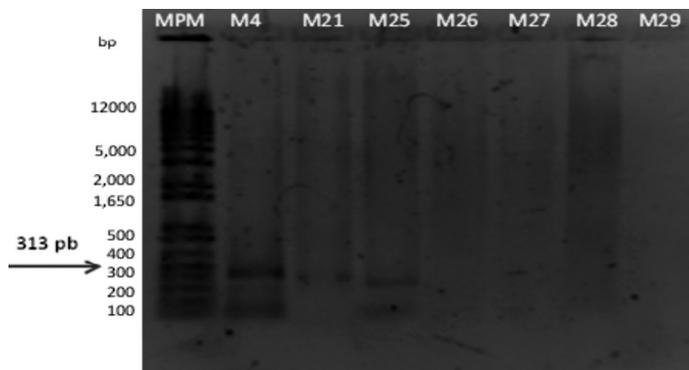


Figura 4. Virus AMV. Marcador de tamaño molecular y muestras (localidad, híbrido y fecha de plantación -fp). MPM: Marcador de tamaño molecular (Invitrogen 1kb + ladder); M4: Corregidora, Mixteca, primera fp; M21: Pedro Escobedo, Centauro, primera fp; M25: Pedro Escobedo, Antigua, primera fp; M26: Pedro Escobedo, Antigua, segunda fp; M27: Pedro Escobedo, Mixteca, segunda fp; M28: Pedro Escobedo, Centauro, primera fp; M29: Pedro Escobedo, Antigua, primera fp.

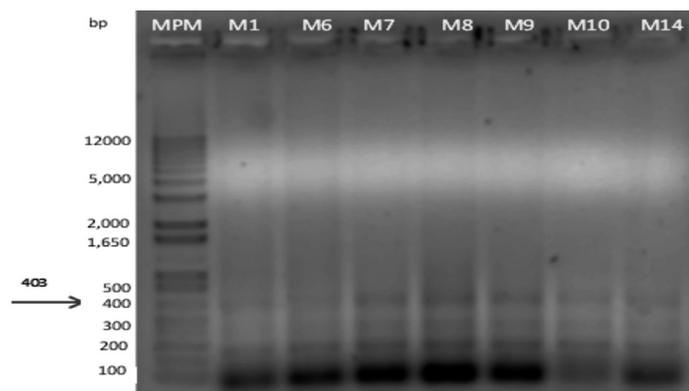


Figura 5. Virus TSWV. Marcador de tamaño molecular y muestras (localidad, híbrido y fecha de plantación -fp). MPM: Marcador de tamaño molecular (Invitrogen 1kb + ladder); M1: Corregidora, Stallion, segunda fp; M6: Corregidora, Cartagonova, primera fp; M7: Corregidora, Centauro, segunda fp; M8: Corregidora, Centauro, segunda fp; M9: Corregidora, Cartagonova, segunda fp; M10: Corregidora, Antigua, segunda fp; M14: Pedro Escobedo, Stallion, segunda fp.

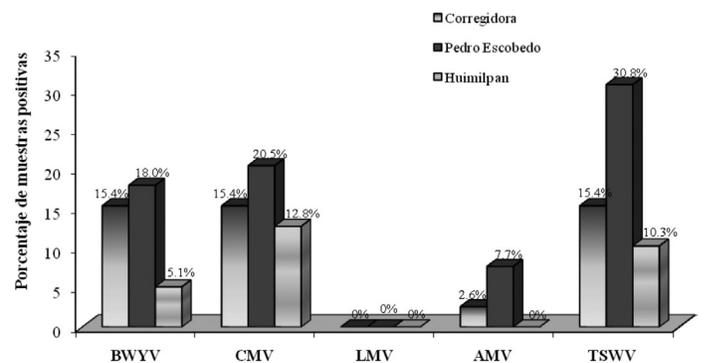


Figura 7. Porcentajes de muestras positivas a distintos virus de lechuga por RT-PCR, en las tres localidades evaluadas, durante el periodo de Febrero - Julio de 2010.

De las 39 muestras analizadas por RT-PCR, el 69,9% resultaron negativas y el 30,1% presentaron infecciones monovirales y complejos de dos y tres virus (Tabla I). Los virus detectados se presentaron como infecciones de un solo virus en el 41,0%, como complejos de dos virus en el 33,3%; de tres en el 15,4%; y como muestras negativas a los virus probados en el 10,3% (Figura 8). A partir del análisis de RT-PCR, los virus TSWV, CMV, BWYV y AMV se encontraron en el 56,4; 48,7; 38,5 y 10,3% de las muestras, respectivamente (Figura 9).

Comparación de las técnicas de ELISA y RT-PCR

Al realizar la comparación entre los resultados obtenidos

en la detección de virus en 39 muestras de follaje de lechuga con las técnicas de ELISA y RT-PCR en las tres localidades estudiadas se tuvieron 15 muestras positivas por ambas técnicas para el BWYV, 15 muestras positivas por ELISA y 19 por RT-PCR para el CMV, una muestra positiva por ELISA y ninguna por RT-PCR para LMV, cinco muestras positivas por ELISA y cuatro por RT-PCR para AMV, y 15 muestras positivas por ELISA y 22 por RT-PCR para TSWV. Con ELISA se tuvieron 51 muestras positivas de un total de 195 análisis, lo que corresponde al 26,2%, mientras que con RT-PCR se tuvieron 60 muestras positivas de un total de 195 análisis, lo que corresponde al 30,1%. (Tabla I).

TABLA I
MUESTRAS POSITIVAS POR ELISA Y RT-PCR A CINCO VIRUS EN LECHUGA, EN DOS FECHAS DE PLANTACIÓN, TRES LOCALIDADES Y CINCO HÍBRIDOS, EN FEBRERO-JULIO 2010

Nº muestra	Híbrido	Localidad	Fecha de plantación	LMV		AMV		BWYV		CMV		TSWV	
				ELISA	PCR								
1	Stallion	Corregidora	2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
2	Centauro	Corregidora	1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	Antigua	Corregidora	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	Mixteca	Corregidora	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5	Mixteca	Corregidora	1	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
6	Cartagonova	Corregidora	1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
7	Centauro	Corregidora	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8	Centauro	Corregidora	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
9	Cartagonova	Corregidora	2	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
10	Antigua	Corregidora	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	Antigua	Corregidora	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
12	Mixteca	Corregidora	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13	Cartagonova	Corregidora	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
14	Stallion	P. Escobedo	2	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
15	Stallion	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
16	Centauro	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
17	Mixteca	P. Escobedo	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
18	Mixteca	P. Escobedo	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
19	Cartagonova	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
20	Centauro	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
21	Centauro	P. Escobedo	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
22	Stallion	P. Escobedo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
23	Mixteca	P. Escobedo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
24	Centauro	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
25	Antigua	P. Escobedo	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
26	Antigua	P. Escobedo	2	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
27	Mixteca	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
28	Centauro	P. Escobedo	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
29	Antigua	P. Escobedo	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
30	Stallion	P. Escobedo	2	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
31	Cartagonova	P. Escobedo	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
32	Cartagonova	P. Escobedo	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
33	Cartagonova	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
34	Cartagonova	P. Escobedo	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
35	Cartagonova	Huimilpan	2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
36	Stallion	Huimilpan	2	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
37	Cartagonova	Huimilpan	2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
38	Mixteca	Huimilpan	2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
39	Antigua	Huimilpan	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Muestras + a cada virus por ELISA y RT-PCR				1	0	5	4	15	15	15	19	15	22

Total de muestras positivas al menos a un virus por ELISA: 51; se obtuvieron a partir de las 39 muestras seleccionadas por los cinco virus, dando un total de 195 análisis, lo cual corresponde al 26.2% de muestras positivas.

Total de muestras positivas al menos a un virus por RT-PCR: 60; se obtuvieron a partir de las 39 muestras seleccionadas por los cinco virus, dando un total de 195 análisis, lo cual corresponde al 30.1% de muestras positivas.

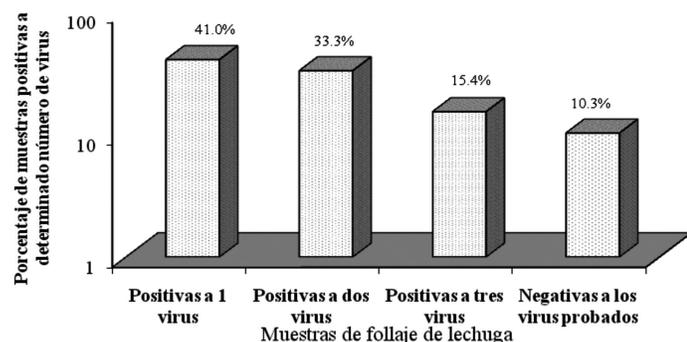


Figura 8. Muestras positivas por RT-PCR a los diferentes virus evaluados en el follaje de lechuga, durante el periodo de Febrero - Julio de 2010.

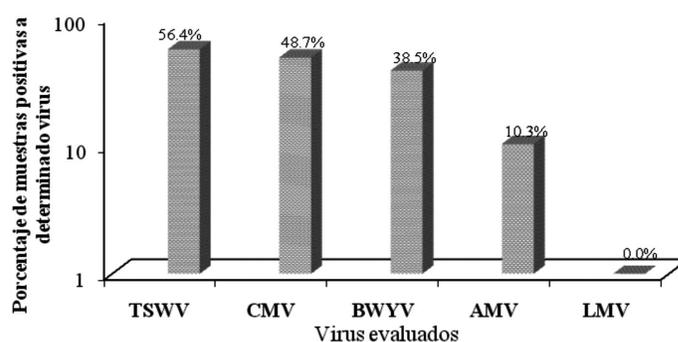


Figura 9. Detección de los cinco virus evaluados en 39 muestras de follaje de lechuga por RT-PCR, durante el periodo de Febrero - Julio de 2010.

En la localidad de Corregidora se tuvieron seis muestras positivas por ELISA y cinco por RT-PCR para el BWYV, cinco muestras positivas por ELISA y siete por RT-PCR para el CMV, una muestra positiva por ELISA y ninguna por RT-PCR para LMV, dos muestras positivas por ELISA y una por RT-PCR para AMV, y cuatro muestras positivas por ELISA y seis por RT-PCR para TSWV (Tabla I). En Pedro Escobedo se tuvieron seis muestras positivas por ELISA y siete por RT-PCR para el BWYV, seis muestras positivas por ELISA y ocho por RT-PCR para el CMV, ninguna muestra positiva por ELISA o por RT-PCR para LMV, tres muestras positivas por ELISA y tres por RT-PCR para AMV y once muestras positivas por ELISA y doce por RT-PCR para TSWV (Tabla I). En Huimilpan se tuvieron tres muestras positivas por ELISA y tres por RT-PCR para el BWYV, cuatro muestras positivas por ELISA y cuatro por RT-PCR para el CMV, ninguna muestra positiva por ELISA o por RT-PCR para LMV y AMV, y ninguna muestra positiva por ELISA y cuatro positivas por RT-PCR para TSWV (Tabla I).

La mayor infección viral detectada por las técnicas de DAS-ELISA y RT-PCR en follaje de lechuga fue de CMV, BWYV y TSWV, los cuales estuvieron presentes en las tres localidades estudiadas (Tabla I).

Detección de complejos virales por ELISA

Se encontraron complejos de virus en las tres localidades. En la localidad de Corregidora se presentaron cinco complejos: tres formados cada uno de dos virus, siendo éstos BWYV+CMV en tres muestras, CMV+TSWV en una muestra y CMV+AMV en una muestra; el complejo de tres virus BWYV+CMV+TSWV en una muestra; y el complejo de cuatro virus CMV+LMV+AMV+TSWV en una muestra. En Pedro Escobedo se presentaron tres complejos: dos formados

cada uno de dos virus, BWYV+CMV en cinco muestras, CMV+TSWV en tres muestras y el complejo de tres virus BWYV+CMV+TSWV en cuatro muestras. En Huimilpan se presentó el complejo formado de dos virus BWYV+CMV en dos muestras (Figura 10).

Detección de complejos virales por RT-PCR

Se encontraron complejos de virus en las tres localidades. En Corregidora se presentaron tres complejos: dos formados de dos virus: BWYV+CMV en una muestra y CMV+TSWV en cuatro muestras, y el de tres virus BWYV+CMV+TSWV en una muestra. En Pedro Escobedo se presentaron tres complejos: dos formados de dos virus BWYV+TSWV en dos muestras, CMV+TSWV en cuatro muestras y uno de tres virus BWYV+CMV+TSWV en tres muestras. En Huimilpan se presentaron tres complejos: dos formados de dos virus BWYV+TSWV en una muestra, CMV+TSWV en una muestra y uno de tres virus BWYV+CMV+TSWV en dos muestras (Figura 11).

Discusión

Los resultados obtenidos en relación a la frecuencia de los virus en el follaje de lechuga indican que los virus están presentes en los híbridos probados, en las dos fechas de plantación y en las tres localidades evaluadas. Las frecuencias de los virus evaluados variaron en los diferentes muestreos, siendo pocos los que aumentaron de un muestreo a otro, lo cual no significa que los virus hayan desaparecido del follaje del primer al segundo muestreo, sino que posiblemente se haya reducido su concentración y por lo ello la prueba de ELISA resultó negativa. Estos resultados coinciden con los de Rosales *et al.* (2006), quienes reportan una mayor frecuencia viral en comparación con las encontradas en el presente estudio.

Por serología se encontró que en las localidades de

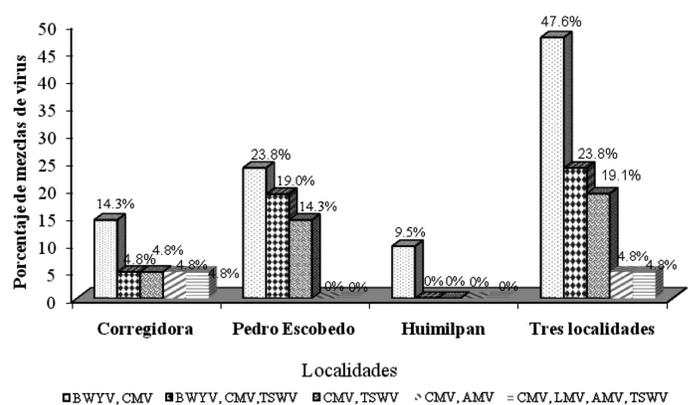


Figura 10. Combinaciones de virus en las tres localidades evaluadas por DAS-ELISA.

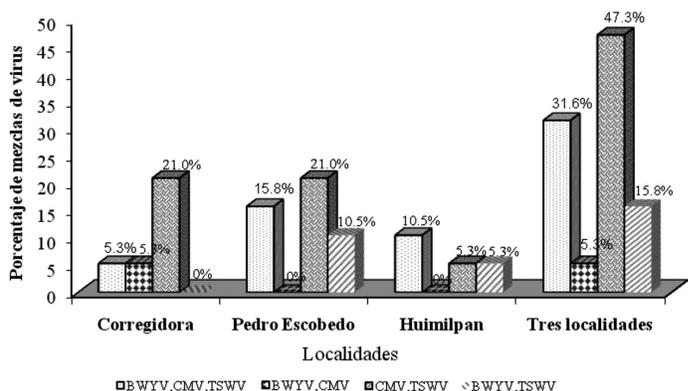


Figura 11. Combinaciones de virus en las tres localidades evaluadas por RT-PCR.

Corregidora y Pedro Escobedo los virus BWYV, CMV y TSWV fueron los más frecuentes. Esto concuerda con los resultados de Fletcher *et al.* (2005), quienes reportan a BWYV y CMV como de los más importantes que afectan a la lechuga en Nueva Zelanda; además, concuerda con los resultados de Pavan *et al.* (2008), quienes reportan a TSWV y CMV como de los más importantes en Brasil.

Al considerar las 225 muestras analizadas, se encontró que la frecuencia de los virus BWYV, CMV, LMV, AMV y TSWV fue de 9,8; 23,6; 0,9; 2,2 y 9,3%, respectivamente. Para LMV, los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por Garnica *et al.* (2007), quienes mencionan que no obtuvieron muestras positivas para este virus; esto se puede atribuir a las

condiciones climáticas similares de las localidades de evaluación y la tolerancia al virus LMV de los híbridos de lechuga evaluados Mixteca, Stallion, Antigua, Cartagonova y Centauro, lo que coincide con lo citado por Jadao *et al.* (2002). Contrariamente, Moreno *et al.* (2004) mencionan que obtuvieron el 13% de muestras positivas para este virus, y Soleimani *et al.* (2011), reportan que el 21% de las muestras analizadas fueron positivas para el LMV en infección simple y el 49% en infección mixta. La discrepancia de los resultados obtenidos para este virus en el presente estudio, con respecto a los reportados por Moreno *et al.* (2004), Pavan *et al.* (2008) y Soleimani *et al.* (2011) pudiera atribuirse a las condiciones climáticas diferentes de las localidades de evaluación y a la

susceptibilidad de los híbridos evaluados al virus LMV por los tres grupos de investigación, lo cual coincide con lo reportado por Jadao *et al.* (2002). Con respecto al TSWV, los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Soleimani *et al.* (2011), que reportan la presencia de este virus en 10% de infecciones simples y en 8% de infecciones mixtas en las muestras analizadas; contrariamente, difieren de los resultados publicados por Moreno *et al.* (2004) quienes reportaron una frecuencia de este virus del 55,5%. Con respecto al CMV la frecuencia en este estudio fue del 23,6%, que coincide con lo publicado por Moreno *et al.* (2004) quienes mencionaron una variación del 13 al 100% y con Soleimani *et al.*, (2011) quienes reportan una frecuencia del 16% en infección simple y del 5% para mixta, del total de muestras positivas, dependiendo de la localidad evaluada. Lo anterior sugiere que, dependiendo de la localidad y la estación del año en que se realice la plantación, aumenta o disminuye la incidencia de virosis. En la segunda fecha de plantación del presente estudio, la reducción de la frecuencia de virosis se pudo deber a la disminución de insectos vectores, ya que durante el ciclo de cultivo se presentaron lluvias durante un periodo de una semana, y esto pudo influir en la reducción de la infección viral.

Por RT-PCR se encontró que los virus TSWV, CMV y BWYV fueron los más frecuentes en las tres localidades; también, para las 39 muestras analizadas se encontró que la frecuencia de BWYV, CMV, AMV, LMV y TSWV fue del 38,5; 48,7; 10,3; 0,0 y 56,4%, respectivamente. La ausencia de infecciones por LMV difiere de lo reportado por Firmito *et al.* (2008) y Rosales *et al.* (2006), quienes mencionan 37,3 y 50,0% de muestras positivas al LMV, respectivamente. Con respecto a los resultados para TSWV, éstos se acercan a los reportados por Rosales *et al.* (2006), que obtuvieron un 28,0% de muestras positivas;

contrariamente, difieren de los resultados de Kamberoglu y Alan (2005), quienes reportan una frecuencia del 1,2% para TSWV en Cukurova, Turquía, y por Fletcher *et al.* (2005) quienes no detectaron el virus en Nueva Zelanda. Con respecto al virus BWYV los resultados obtenidos se aproximan a los reportados por Moreno (2005), quien indica que obtuvo una frecuencia del 20,5% de ese virus en el cultivo de la lechuga; sin embargo, no concuerdan con los publicados por Rosales *et al.* (2006), quienes mencionaron una variación en la frecuencia del BWYV en el cultivo de lechuga del 0,3 al 14,0%. Para el CMV los resultados obtenidos no se aproximan a los reportados por Lee y Ryu (2008) quienes señalan que en las muestras analizadas se obtuvieron frecuencias mayores del 85%. Finalmente, para el caso del AMV los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Aftab y Angela (2006) quienes mencionaron una variación en su incidencia en cultivos de lenteja, haba, garbanzo y lupino del 0 al 100% dependiendo del año y la localidad evaluada.

Los resultados obtenidos respecto a mezclas de virus son similares a los reportados por Moreno (2005) quien menciona que las mezclas más frecuentes encontradas en el cultivo de lechuga fueron las de TSWV+ BWYV o TSWV+CMV, y BWYV+CMV, BWYV+LMV y BWYV+TSWV. Con respecto al TSWV, los resultados coinciden con los reportados por Soleimani *et al.* (2011), que reportan la presencia de este virus en infecciones mixtas con CMV en el 8,0% de las muestras analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP), Universidad de Guanajuato, dentro de la Convocatoria 2010 para Apoyo a la Investigación; a Jorge Montes M. y Hugo Daniel García, de Agro-Guanajuato, y

a Rodrigo Mella, por las facilidades para establecer los experimentos en sus lotes comerciales de lechuga.

REFERENCIAS

- Aftab M, Angela F (2006) Temperate Pulse Viruses: Alfalfa Mosaic Virus (AMV). Department of Primary Industries. www.dpi.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/plant-diseases/grains-cereals/agl206-temperate-pulse-viruses-alfalfa-mosaic-virus-amv (Cons 01/2012).
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. 5ª ed. Academic Press. Nueva York, EEUU. 922 pp.
- Clark M, Adams A (1977) Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Cruz FM, Canseco RO (1995) *Nota Sobre la Técnica DAS-ELISA*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. 12 pp.
- Cruz FM, Frías TGA (1997) *Guía Ilustrada de la Prueba Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas para la Detección de Fitopatógenos*. Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, Diagnóstico Fitosanitario. Dirección General de Sanidad Vegetal. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. 23 pp.
- Firmito AC, Krause-Sakate R, Agenor PM, da Silva N, Minoru HS, Hiroto AR, Nietzsche T, Le GO (2008) Prevalence of Lettuce Mosaic Virus - common strain on three lettuce producing areas from São Paulo State. Nota científica. *Summa Phytopathol.* 34: 161-163.
- Fletcher JD, France CM, Butler RC (2005) Virus surveys of lettuce crops and management of Lettuce big-vein disease in New Zealand. *New Zeal. Plant Protec.* 58: 239-244.
- Garnica I, Yanguas R, Lezáun JA, Sola D (2007) *Virus del Bronceado del Tomate*. Navarra Agraria - Instituto Técnico y de Gestión Agrícola. Navarra, España. 6 pp.
- Jadao AS, Pavan MA, da Silva N, Zerbini FM (2002) Transmissão via semente do *Lettuce mosaic virus* (LMV) patótipos II e IV em diferentes genótipos de alface. *Summa Phytopathol.* 28: 58-61.
- Kamberoglu MA, Alan B (2005) Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in lettuce in cukurova region of Turkey. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 431-434.
- Lacasa A, Contreras J (1993) Comportamiento de *Frankliniella occidentalis* en la transmisión del virus del bronceado del tomate: Planteamientos para su control en cultivos hortícolas. *Phytoma* 50: 33-39.
- Lee BY, Ryu KH (2008) Incidence of virus diseases and RT-PCR detection of *Daphne* -infecting viruses in Korea. *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 127-132.
- Moreno A, De Blas C, Biurrún R, Nebreda M, Palacios I, Duque M, Fereres A (2004) The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated *Brassica* and associated natural vegetation in Spain. *Ann. Appl. Biol.* 144: 339-346.
- Moreno LA (2005) *Incidencia y Dispersión de Virus Transmitidos por Pulgones en Hortícolas de Invierno y sus Relaciones Virus-Vector*. Tesis. Universidad Politécnica de Madrid. España. 227 pp.
- Pavan MA, Krause-Sakate R, da Silva N, Zerbini FM, Le Gall O (2008) Virus diseases of lettuce in Brazil. *Plant Virus.* 2: 35-41.
- Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Ramírez-Malagón R, Mendoza-Celedón B, Núñez-aleniz HG, León-Galván MF (2013) Detección de complejos virales en ajo por ELISA y confirmados por RT-PCR. *Interciencia* 38: 364-369.
- Rosales M, Araya C, Mora R, Aljaro A (2006) Incidencia de enfermedades virales en lechuga en la Zona Central de Chile. *XVI Congr. Nac. Fitopatol.* www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/PDF/XVI.pdf (Cons. 09/2010).
- SDR (2010) *Principales Plagas de Hortalizas en el Estado*. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. México. www.sdr.gob.mx/Contenido/CadenasProductivas/PLAGAS/lpdf (Cons. 10/2010).
- SIAP (2014) *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Resumen Nacional por Producto, Cíclicos y Perenes 2014, Modalidad Riego + Temporal*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 (Cons. 04/11/2015).
- Soleimani P, Mosahebi G, Habibi MK (2011) Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of Lettuce mosaic virus from Tehran Province in Iran. *Afr. J. Agric. Res.* 6: 3029-3035.
- Suárez GMD, Serrano H (2012) Dulces sueños *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) la lechuga. *Tecno Agro* 81: 19-28.