

TOMATO SPOTTED WILT VIRUS: AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DEL MIGUELITO (*Zinnia elegans* Jacquin) EN EL ESTADO DE MORELOS, MÉXICO

TOMATO SPOTTED WILT VIRUS: CAUSAL AGENT OF WILT IN "MIGUELITO" (*Zinnia elegans* Jacquin) IN MORELOS, MÉXICO

Ma. Valeria Morales-Díaz, Salomé Alcacio-Rangel y Rodolfo De La Torre-Almaraz

Laboratorio de Microbiología. Unidad de Biotecnología y Prototipos. FES-Iztacala, UNAM. Avenida De los Barrios No 1. 54090. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México (droldolfo@servidor.unam.mx)

RESUMEN

Se observaron síntomas de moteado, manchas necróticas anulares, enanismo y marchitez severa en plantas de miguelito (*Zinnia elegans* Jacquin) (Fam: Compositae) cultivadas en viveros comerciales del Estado de Morelos, México. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la etiología de esta enfermedad. Se identificó al virus marchitez manchada del tomate (*Tomato spotted wilt virus*. TSWV) como el agente causal de la enfermedad del miguelito con base en los ensayos de transmisión mecánica en plantas indicadoras y de patogenicidad en plántulas sanas de *Z. elegans*, cultivadas desde semilla en el invernadero. En las plantas el virus causó los síntomas de moteado, manchas necróticas en forma de anillos concéntricos, enanismo y marchitez, idénticos a los observados en plantas de miguelito cultivados en condiciones de campo. Se detectó por serología (DAS-ELISA) sólo al TSWV en plantas de miguelito con síntomas de marchitez procedentes de viveros comerciales del Estado de Morelos, en las plantas indicadoras usadas para separar al virus y en las plantas de miguelito producidas desde semilla inoculadas con el aislamiento puro de TSWV en el invernadero. La identidad taxonómica del TSWV se confirmó mediante secuenciación directa de los productos de la RT-PCR. Las secuencias obtenidas del TSWV de muestras de campo de miguelito (número de acceso EF067862) y del mismo virus separado de *N. rustica* (número de acceso EF067863) mostraron una homología en el fragmento amplificado del gen de la proteína de la cápside del TSWV del 100% entre ellas y del 93% con las existentes en la base de datos de INCB/GenBank de aislamientos del TSWV ampliamente distribuidos en el mundo. Este trabajo es el primer reporte de la presencia del TSWV en *Z. elegans* en México y se describen dos métodos moleculares para diagnosticar e identificar este virus.

Palabras clave: *Zinnia elegans*, plantas ornamentales, TSWV, virus.

ABSTRACT

Mottle symptoms, necrotic ring spots, dwarfism, and severe wilt were observed on "miguelito" (*Zinnia elegans* Jacquin) (Fam: Compositae) plants cultivated in commercial nurseries in the State of Morelos, México. Therefore, this study was conducted to determine the etiology of the disease. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) was identified as the causal agent of the disease in miguelito by mechanical transmission tests on indicator plants and pathogenicity tests on healthy *Z. elegans* seedlings cultivated from seed in a greenhouse. On these plants the virus caused mottled symptoms, necrotic spots in the form of concentric rings, dwarfism and wilt, identical to those observed in miguelito plants cultivated in field conditions. Through serology (DAS-ELISA) only TSWV was detected in miguelito plants with wilt symptoms from commercial nurseries in the State of Morelos, in indicator plants used to separate the virus, and in miguelito plants produced from seed and inoculated with a pure isolate of TSWV in the greenhouse. Taxonomical identity of TSWV was confirmed by direct sequencing of the RT-PCR products. The TSWV sequences obtained from field samples of miguelito (access number EF067862) and the same virus separated from *N. rustica* (access number EF067863) showed 100% homology in the amplified fragment of the capsid protein gene of TSWV, while with the samples of TSWV isolates widely distributed over the world existing in the INCB/GenBank there was 93% homology. This paper is the first report of the presence of TSWV in *Z. elegans* in México, and two molecular methods for diagnosing and identifying this virus are described.

Key words: *Zinnia elegans*, ornamentals, TSWV, virus.

INTRODUCTION

The ornamental species *Zinnia elegans* L. (Fam: Compositae), locally known as "miguelito" was originated in México. From January to April 2006, during explorations of commercial ornamental nurseries in Cuautla, Morelos, numerous *Zinnia elegans* L. plants were found with chlorotic and necrotic concentric ring spots, short stems, severe loss of petal color and floral structure, and finally,

Recibido: Mayo, 2007. Aprobado: Diciembre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 335-347. 2008.

INTRODUCCIÓN

Durante recorridos, de enero a abril de 2006, en viveros comerciales de ornamentales en Cuautla, Morelos, se encontraron numerosas plantas de una especie ornamental de origen mexicano conocida localmente como miguelito (*Zinnia elegans* L.) (Fam: Compositae), con síntomas de manchas cloróticas y necróticas en forma de anillos concéntricos, reducción del tamaño de tallos, pérdida severa del color de pétalos y estructura floral, finalmente marchitez generalizada del follaje que fue el síntoma más conspicuo para reconocerla (Figura 1).

La información disponible no permitió determinar los patógenos que afectan al miguelito en México, ni tampoco se conoce el volumen y valor de la producción de esta planta, que se cultiva en maceta o en cepellón para adornar jardines y que se comercializa en viveros locales o en las centrales de abasto y mercados en el Distrito Federal. A pesar de la severidad de los daños causados por la marchitez en plantas comerciales de miguelito, no se conocen las pérdidas económicas causadas en el proceso productivo ni la distribución de esta enfermedad en todos los viveros dedicados a la producción de esta planta (observación personal).

Conocer a los patógenos relacionados con la marchitez del miguelito es importante para establecer medidas preventivas o curativas que reduzcan su impacto en la misma especie o en otras especies de ornamentales importantes cultivadas en el Estado de Morelos (Sosa *et al.*, 1997). El análisis fitopatológico del material recolectado, en nuestro laboratorio, no mostró la presencia de hongos, bacterias o nemátodos; entonces se sospechó que estos daños pudieran ser causados por algún virus o patógenos similares. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la etiología de la enfermedad marchitez del miguelito (*Z. elegans* L.) que se produce en Morelos, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras

Se recolectaron plantas de miguelito producidas en maceta de enero a abril del 2006 en invernaderos comerciales de Cuautla, Morelos, que tenían síntomas de mosaico, manchas cloróticas y necróticas en forma de anillos, enanismo y marchitez. Se maceraron hojas enfermas en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M, pH 7.2; se espolvoreó carborundum sobre dos hojas de cada planta indicador, se humedeció un hisopo de algodón con el extracto y se frotraron las hojas. Las plantas indicadoras usadas para la separación de

generalized wilting of foliage, which was the most conspicuous symptom (Figure 1).

The available information was not sufficient to determine the pathogens affecting miguelito in México, nor are volume and value of the production of this plant known. It is cultivated in pots or gardens, and is sold in local nurseries or wholesale and retail markets in México City. In spite of the severity of the damage caused by the wilt disease in commercial miguelito plants, there are no data on economic losses during the productive process or on the distribution of the disease in the nurseries where this plant is produced (personal observation).

Knowledge of the pathogens related to wilt of miguelito is important for establishing preventive or curative measures to reduce its impact on this or other important ornamental species cultivated in the State of Morelos (Sosa *et al.*, 1997). In our laboratory, the phytopathological analysis of the material collected did not exhibit presence of fungi, bacteria or nematodes; thus it was suspected that this damage could be caused by a virus or similar pathogens. Therefore, the objective of this study was to determine the etiology of the disease wilt of miguelito (*Z. elegans* L.) in plants produced in Morelos, México.

MATERIALS AND METHODS

Separation of virus and susceptibility tests in indicator plants

Miguelito plants produced in pots were collected from January to April 2006 in commercial greenhouses in Cuautla, Morelos,



Figura 1. Síntomas de marchitez en hojas y flores en miguelito (*Zinnia elegans*) producida en maceta y recolectada en viveros en el Estado de Morelos.

Figure 1. Wilt symptoms in miguelito (*Zinnia elegans*) leaves and flowers produced in pots and collected from nurseries in the State of Morelos.

virus fueron *Nicotiana clevelandii*, *N. occidentalis* L., *N. rustica*, *N. tabacum* var. *Xanthi* L., *N. glutinosa* L. y *N. benthamiana* Domin., *Datura stramonium* L., *Solanum esculentum* M., *Capsicum annuum* L., *Gonphrena globosa*, *Chenopodium quinoa* y *Ch. amaranticolor*. Se seleccionaron hojas con síntomas de estas plantas y se inocularon un nuevo grupo de plantas indicadoras sanas. Estos experimentos se repitieron tres veces y en cada ocasión se usó una planta por especie. Las plantas con hojas inoculadas se incubaron en invernadero (25-35 °C; 70% humedad relativa; y 12 h luz) hasta por 30 d, registrando los síntomas en cada especie indicadora (Kurstak, 1981; Walkey, 1986).

Las plántulas de las especies indicadoras usadas para separar y caracterizar los virus asociados al miguelito fueron producidas desde semilla libres de virus en invernadero y que pertenecen al Banco de Semillas del Laboratorio de Virología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Pruebas de patogenicidad

Para probar los postulados de Koch, adaptados para el caso de virus, se seleccionaron 10 plántulas de *Z. elegans* con 10 hojas verdaderas de 15 cm de alto, producidas desde semilla, certificadas de estar libres de virus, mantenidas individualmente en vasos de unicel con suelo estéril en invernadero. Luego fueron inoculadas por transmisión mecánica con macerados de hojas de *N. rustica* y *D. stramonium*, las especies de hospedantes que mostraron los mismos síntomas en los diferentes ensayos de separación de virus, al inocularse con los macerados de hojas de miguelito con síntomas de marchitez seca recolectadas en campo (Dijkstra y De Jager, 1998).

Detección serológica de proteína viral por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Se hizo la detección serológica de infecciones virales en muestras de miguelito recolectadas en campo, mediante la técnica ELISA (Clark y Adams, 1977; Chantler y Clayton, 1988), usando antisueros específicos comerciales para *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Impatiens necrotic spotted virus* (INSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) y *Tobacco etch virus* (TEV) (Agdia, USA), a una dilución de 1/200. El ensayo serológico se hizo en las plantas indicadoras y en las usadas en las pruebas de patogenicidad. Las lecturas de las placas se hicieron a una longitud de onda de 405 nm (De La Torre *et al.*, 2002).

Electroforesis de ARN de doble cadena de origen viral (ARN-dc)

Se obtuvo ARN de doble cadena de origen viral a partir de 3.5 g de hojas de diferentes plantas de miguelito con síntomas de manchas en forma de anillos cloróticos y marchitez, inoculadas con el virus procedente de muestras de campo. El ARN-dc se

region. The plants had mosaic symptoms, chlorotic and necrotic ring spots, dwarfism, and wilt. The diseased leaves were macerated in a buffer solution of 0.02 M sodium phosphate with pH 7.2, and a cotton swab was moistened with the extract. Carborandum powder was sprinkled on two leaves of each indicator plant and the extract was rubbed onto the indicator plant leaves with the cotton swab. The indicator plants used were *Nicotiana clevelandii*, *N. occidentalis* L., *N. rustica*, *N. tabacum* var. *Xanthi* L., *N. glutinosa* L. and *N. benthamiana* Domin., *Datura stramonium* L., *Solanum esculentum* M., *Capsicum annuum* L., *Gonphrena globosa*, *Chenopodium quinoa* and *Ch. amaranticolor*. Leaves of these plants with symptoms were selected, and a new group of healthy indicator plants were inoculated. These experiments were repeated three times and on each occasion one plant per species was used. Plants with inoculated leaves were incubated in a greenhouse (25-35 °C, 70% relative humidity, and 12 h light) up to 30 d; and the symptoms on each indicator species were recorded (Kurstak, 1981; Walkey, 1986).

Seedlings of indicator species used to separate and characterize the viruses associated with miguelito were produced in a greenhouse from virus-free seed belonging to the seed bank of the virology laboratory of the Department of Parasitología Agrícola at the Universidad Autónoma Chapingo.

Pathogenicity tests

To test Koch's postulates, adapted for the case of viruses, we selected ten 15-cm *Z. elegans* seedlings produced from certified virus-free seed with 10 true leaves and kept in a greenhouse individually in polystyrene cups with sterile soil. These were then inoculated by mechanical transmission with leaf macerates of *N. rustica* and *D. stramonium*, the host species that exhibited the same symptoms in different virus separation tests when inoculated with leaf macerates from miguelito with wilt symptoms collected in the field (Dijkstra and De Jager, 1998).

Serological detection of viral protein by enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

Serological detection of viral infections was performed on field collected miguelito samples using the ELISA technique (Clark and Adams, 1977; Chantler and Clayton, 1988) with specific commercial antisera for *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Impatiens necrotic spotted virus* (INSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), and *Tobacco etch virus* (TEV) (Agdia, USA), at a 1/200 dilution. The serological assay was carried out on indicator plants and on those used in the pathogenicity tests. Plates were read at a wavelength of 405 nm (De la Torre *et al.*, 2002).

Electrophoresis of double-stranded viral RNA (ds-RNA)

Viral double-stranded RNA was obtained from 3.5 g of different miguelito plants with chlorotic ring spots and wilt

analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (6%), usando un minigel (1.75 mm×7 cm×8 cm) montado en una cámara Biorad doble. El volumen del extracto de ARN-dc viral de las muestras fue 40 μ L por carril. Se incluyeron como marcadores de peso molecular (PM) el ARN-dc viral de CMV y una mezcla de ARN-dc viral de TSWV con CMV, ambos obtenidos de plantas tabaco (*N. tabacum*) inoculadas en invernadero; el testigo negativo fue un extracto de ARN-dc de plantas sanas de miguelito producidas en invernadero. La electroforesis se hizo a 100 V por 2:15 h a temperatura de laboratorio. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y después con solución de nitrato de plata (0.011 M) (Valverde *et al.*, 1990).

Caracterización molecular por secuenciación de productos de la transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se obtuvo ARN total de 0.1 g de hojas de *Z. elegans*, *G. globosa* y de *N. rustica*, inoculadas con macerados de hojas de miguelito con síntomas de marchitez seca, usando el kit RNA Reagent (InvitroGen, USA) y ARN-dc de origen viral por cromatografía con celulosa CF-11 (Valverde, 1990; Okuda y Hanada, 2001). El ARN se usó para el ensayo de la RT-PCR en un solo paso usando el Kit One-step RT-PCR Access (Promega, USA) con los oligonucleótidos TSWV-Sense (5'-ATG TCT AAG GTT AAG CTC-3') y TSWV-Antisense (5'-TTA AGC AAG TTC TGT GAG-3'), que amplifican un segmento del gen de la proteína de la nucleocápside (N) del componente S del TSWV (Pappu *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1998). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, por 35 ciclos y un solo ciclo a 72 °C por 10 min. Los productos de la RT-PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.0%, y su PM se calculó por comparación con el marcador de PM 1kb plus (GIBCO BRL) incluido en el mismo gel. La electroforesis se corrió a 80 V/85 min a temperatura de laboratorio (Surzycki, 1999).

Los productos de la RT-PCR de las plantas de *Z. elegans* y de *N. rustica* se extrajeron y purificaron directamente del gel de agarosa con el reactivo de Wizar SV (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados directamente en un GeneticAnalyzer 3100 (Applied Biosystem, USA). La secuencia nucleotídica obtenida de *Z. elegans* se depositó en el GenBank para obtener su número de acceso. Las secuencias del virus separado de miguelito y de plantas *N. rustica* inoculadas en el invernadero se alinearon entre ellas y después con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank), utilizando el método BLAST (NCBI, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consulta abril/2007) y se compararon usando Clustal W. La construcción de los dendrogramas se realizó con el modelo de Kimura con dos parámetros, la prueba de Bootstrap y máxima Parsimonia con 101 repeticiones, usando el programa MEGA versión (MegAline, 3.1. DNASTAR software, London) (Surzycki, 1999).

symptoms inoculated with the virus from field samples. The ds-RNA was analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gels (6%) using a minigel (1.75 mm×7 cm×8 cm) mounted on a double Biorad camera. The volume of viral ds-RNA extract from the samples was 40 μ L per track. Included as molecular weight (MW) markers were viral ds-RNA from CMV and a mixture of TSWV with CMV, both obtained from tobacco (*N. tabacum*) plants inoculated in the greenhouse, and, as a negative check, ds-RNA extract from healthy miguelito plants produced in a greenhouse. Electrophoresis was performed at 100 V for 2:15 h at laboratory temperature. The gels were dyed with ethidium bromide and later with a solution of silver nitrate (0.011 M) (Valverde *et al.*, 1990).

Molecular characterization by sequencing products from reversetranscription linked to polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA of 0.1 g was obtained from *Z. elegans*, *G. globosa* and *N. rustica* leaves, inoculated with macerates of miguelito leaves with dry wilt symptoms using the RNA Reagent Kit (InvitroGen, USA) and viral ds-RNA by CF-11 cellulose chromatography (Valverde, 1990; Okuda and Hanada, 2001). The RNA was used for the one-step RT-PCR assay using the One-step RT-PCR Access Kit (Promega, USA) with the oligonucleotides TSWV-Sense (5'-ATG TCT AAG GTT AAG CTC-3') and TSWV-Antisense (5'-TTA AGC AAG TTC TGT GAG-3'), which amplify a segment of the nucleocapsid protein gene (N) of the S component of TSWV (Pappu *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1998). The conditions of the PCR were the following: denaturalization at 94 °C for 30 s, alignment at 52 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, for 35 cycles and a single cycle at 72 °C for 10 min. The RT-PCR products were analyzed by 1.0% agarose gel electrophoresis, and its MW was calculated by comparison with the MW marker 1kb plus (GIBCO BRL) that was included in the same gel. Electrophoresis was run at 80 V/85 min at laboratory temperature (Surzycki, 1999).

The RT-PCR products from *Z. elegans* and *N. rustica* plants were extracted and purified directly from the agarose gel with the reagent Wizar SV (Promega, USA), following the manufacturer's instructions. Fragments were sequenced directly in a GeneticAnalyzer 3100 (Applied Biosystems, USA). The nucleotide sequence obtained from *Z. elegans* was deposited in the GeneBank to obtain its access number. The sequences of the virus separated from miguelito and *N. rustica* plants inoculated in the greenhouse were aligned and later, with the sequences available in the data base of the GeneBank, using the BLAST method (NCBI, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consulta abril/2007), were compared using Clustal W. The construction of the dendrograms was performed with the two parameter Kimura model, the Bootstrap test and the Parsimonia maxim with 101 replications, using the MEGA software version (MegAline, 3.1. DNASTAR software, London) (Surzycki, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación de virus por plantas indicadoras

Se confirmó la presencia de un solo virus en plantas de miguelito con síntomas de marchitez, recolectadas en invernaderos en Morelos, al inocular por transmisión mecánica los macerados de sus hojas a plantas sanas de las distintas especies indicadoras. Todas las plantas indicadoras usadas en los ensayos de transmisión mecánica mostraron alguna clase de síntomas 15 a 25 d después de la inoculación, tanto en los experimentos de inoculación directa de macerados de hojas de miguelito con síntomas de marchitez recolectados en campo como en los experimentos de separación de virus de plantas indicadoras a nuevas plantas indicadoras (Cuadro 1). Se seleccionaron plantas de *N. rustica*, *D. stramonium* y *G. globosa* como fuente de inóculo fresco del virus aislado de miguelito, por la persistencia de los síntomas y la longevidad de las plantas de estas especies en los invernaderos donde se incubaron.

Por la constancia en el tipo de síntomas observados en las especies de las plantas indicadoras usadas en este trabajo se concluyó preliminarmente que TSWV era el virus asociado con los síntomas de marchitez del miguelito. Por ejemplo, en *C. annuum* y *D. stramonium* se observaron en las hojas inoculadas lesiones locales cloróticas en forma de anillos concéntricos, que se transformaron en manchas anulares necróticas. Luego apareció necrosis de nervaduras y, finalmente, mosaico con deformación sistémica de las hojas apicales (Figura 2A). Pero en las distintas especies de tabaco, como *N. rustica* y *N. glutinosa*, se observaron lesiones locales cloróticas en forma de anillos concéntricos y después manchas anulares necróticas, mosaico y deformación sistémica severa de hojas apicales y, finalmente, necrosis y marchitez (Figura 2 B y C).

Se descartó la presencia del TEV asociado a los síntomas de marchitez en plantas de miguelito, ya que este virus sólo causa mosaico y jaspeado sistémico en plantas de tabaco, aunque es más típico en *N. tabaco* var. *Xanthii* y en *D. stramonium* mosaico y deformación, pero nunca manchas necróticas en forma de anillo y marchitez. Se descartó la presencia de TMV en plantas de miguelito ya que este virus causa lesiones locales necróticas a los 4 o 5 d postinoculación sin movimiento sistémico en *D. stramonium*, *N. rustica* y *N. glutinosa*. Situación similar es el caso del CMV, pues no se conoce si infecta naturalmente al miguelito, que causa moteados cloróticos en hojas inoculadas, eventualmente en forma de anillos cloróticos y mosaico sistémico en todas las especies de tabaco y chile,

RESULTS AND DISCUSSION

Separation of virus by indicator plant

The presence of a single virus was confirmed in miguelito plants with wilt symptoms, collected in greenhouses in Morelos by mechanical transmission inoculation of leaf macerates to healthy indicator plants of different species. All of the indicator plants used in the mechanical transmission tests exhibited some type of symptom 15 to 25 d after inoculation, in both the experiments of direct inoculation with macerates of miguelito leaves collected in the field and those of virus separation from indicator plants to new indicator plants (Table 1). *N. rustica*, *D. stramonium* and *G. globosa* plants were selected as sources of fresh inoculum of the virus isolated from miguelito because of the persistence of the symptoms and the longevity of these plant species in the greenhouses where they were incubated.

Because of the constancy in the type of symptoms observed in the indicator plant species used in this study, the preliminary conclusion was that TSWV was the virus associated with the wilt symptoms in miguelito. For example, in *C. annuum* and *D. stramonium* local concentric ring-shaped chlorotic lesions were observed in inoculated leaves; these later transformed into necrotic ring spots. Vein necrosis and, finally, mosaic and severe systemic deformation in apical leaves appeared (Figure 2A). But in the different tobacco species, such as *N. rustica* and *N. glutinosa*, local concentric ring-shaped chlorotic lesions were observed and later necrotic ring spots, mosaic and severe systemic deformation of apical

Cuadro 1. Síntomas de hospedantes inoculadas con TSWV aislado de *Zinnia elegans*.

Table 1. Symptoms of hosts inoculated with TSWV isolated from *Zinnia elegans*.

Hospedante	Síntomas
<i>Gomphrena globosa</i>	LLN
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLC y LLN
<i>Ch. amaranticolor</i>	LLC, LLN
<i>Capsicum annuum</i>	LLC, AC, AN, M, MA
<i>Datura stramonium</i>	LLC, LLN, AC, AN, M, DH
<i>Solanum esculentum</i>	LLN, DH, MA
<i>Nicotiana clavelandii</i>	LLN, MA
<i>N. occidentalis</i>	LLN, MA
<i>N. rustica</i>	LLC, LLN, AN, MA
<i>N. xanthi</i>	LLC, LLN, M
<i>N. glutinosa</i>	LLC, LLN, AN, MA
<i>N. benthamiana</i>	LLC, AN, LLN, DH, MA

AC: anillos cloróticos; AN: anillos necróticos; DH: deformación de hojas; LLN: lesiones locales necróticas; LLC: lesiones locales cloróticas; MA: marchitez; M: mosaico.

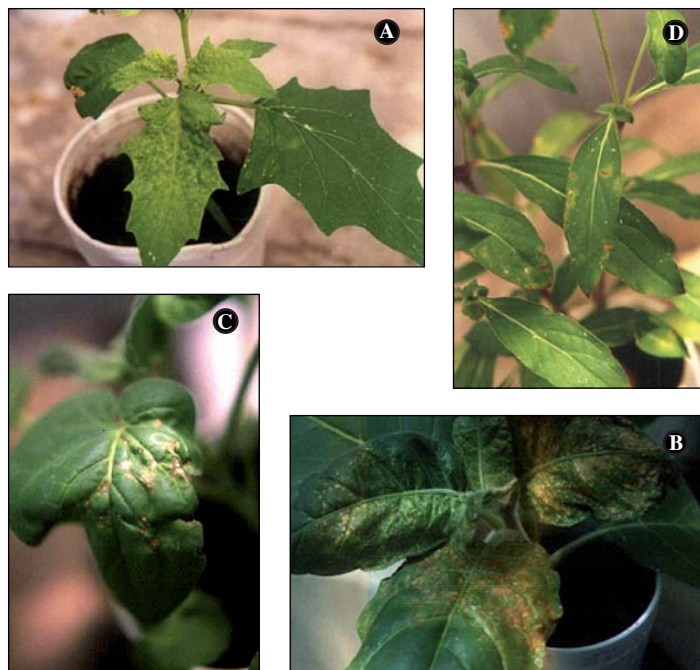


Figura 2. Síntomas causados por un aislado de TSWV separado de *Z. elegans* en inoculación por transmisión mecánica en plantas hospedantes. A) mosaico y deformación de hojas en *D. stramonium*. B) Lesiones locales necróticas y mosaico en *N. rustica*. C) Lesiones locales necróticas y deformación de hojas en *N. glutinosa*. D) Lesiones locales necróticas irregulares en *G. globosa*.

Figure 2. Symptoms caused by a TSWV isolated separated from *Z. elegans* and used to inoculate host plants by mechanical transmission. A) Mosaic and leaves deformation in *D. stramonium*. B) Necrotic local lesions and mosaic in *N. rustica*. C) Necrotic local lesions and leaves deformation in *N. glutinosa*. D) Irregular necrotic local lesions in *G. globosa*.

pero no causa ningún síntoma en *D. stramonium* (De La Torre *et al.*, 2002).

Zinnia elegans es susceptible experimentalmente a 76 especies de virus entre las que destacan *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Esta especie aparentemente no es susceptible al INSV, CMV y TMV entre los virus más conocidos (Brunt *et al.*, 1996). Por tanto, se concluyó que el virus causante de la marchitez del miguelito era el TSWV considerando el conjunto de los síntomas observados en las plantas indicadoras inoculadas con los macerados de hojas de miguelito con síntomas de marchitez recolectadas en Morelos.

Pruebas de patogenicidad

Se observaron síntomas de moteados cloróticos al inicio de la infección; después se transformaron en manchas cloróticas en forma de anillo en las hojas de miguelito producidas en el invernadero e inoculadas con macerados de hojas de *N. rustica* o *D. stramonium*. El virus se mantuvo aislado de plantas de miguelito con marchitez recolectadas en campo y que por las pruebas de inoculación en plantas diferenciales indicó la posible presencia del TSWV (Figura 3A). En estos anillos aparecieron después pequeñas y numerosas manchas necróticas que al coalescer causaron la necrosis del área afectada, que se distribuyó en toda la planta causando marchitez (Figura 3B). Las plantas

leaves, and finally, necrosis and wilt occurred (Figure 2B and 2C).

The presence of TEV associated with the wilt symptoms in miguelito plants was ruled out since this virus causes only systemic mosaic and mottle in tobacco plants, most typically in *N. tabaco* var. Xanthii, and mosaic and deformation in *D. stramonium*, but never necrotic ring spots or wilt. The presence of TMV in miguelito plants was also ruled out since this virus causes local necrotic lesions 4 or 5 d after inoculation with no systemic movement in *D. stramonium*, *N. rustica* and *N. glutinosa*. The case of CMV is similar, and it is not known whether it infects miguelito naturally. This virus causes chlorotic mottle on inoculated leaves and eventually chlorotic rings and systemic mosaic in all of the tobacco and chili species, but it does not cause any symptom in *D. stramonium* (De la Torre *et al.*, 2002).

Zinnia elegans is experimentally susceptible to 76 species of virus, among which *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) are notable. This species is apparently not susceptible to INSV, CMV or TMV, among the most well-known viruses (Brunt *et al.*, 1996). Therefore, it was concluded that the virus causing wilt in miguelito was TSWV, considering the group of symptoms observed in indicator plants inoculated with macerates of miguelito leaves with wilt symptoms collected in Morelos.

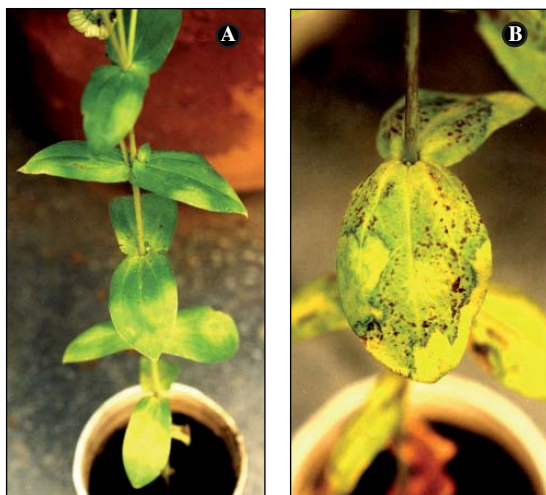


Figura 3. Síntomas inducidos por un aislado de TSWV separado de miguelito en plantas de miguelito producidas desde semilla en el invernadero. A) Lesiones locales cloróticas en forma de anillo 15 d después de la inoculación. B) Manchas necróticas en los bordes de los anillos cloróticos en la misma planta 25 d después de la inoculación.

Figure 3. Miguelito plant produced from seed in the greenhouse with symptoms induced by a TSWV isolate separated from diseased miguelito plants. A) Local chlorotic ring lesions 15 d after inoculation. B) Necrotic spots on the edges of chlorotic rings on the same plant 25 d after inoculation.

afectadas no crecieron completamente, presentando enanismo (Figura 4A) y deformación de hojas, reducción del tamaño y pérdida del color de la flor (Figura 4B). Todas las plantas con estos síntomas murieron por marchitez idéntica a la observada en las plantas recolectadas en los invernaderos comerciales de Morelos.

TSWV causa típicamente manchas en forma de anillos concéntricos en la mayoría de sus hospedantes susceptibles, pero es común que también cause mosaicos, necrosis de tallos, pecíolos y flores, así como enanismo (Kurstak, 1981; Walkey, 1986; Index of Viruses, 2006). La similitud entre los síntomas causados por TSWV y los asociados con algunos hongos, bacterias u otros patógenos virales puede causar confusión y dificultar su identificación. Sin embargo, los análisis fitopatológicos realizados en nuestro laboratorio al material de miguelito con marchitez no reveló la presencia de hongos y bacterias, pero se separó consistentemente un solo virus de plantas de miguelito con síntomas de marchitez en las diferentes especies de plantas indicadoras, de donde se tomaron hojas frescas con síntomas y con sus macerados inocular plantas sanas de miguelito producidas desde semilla en el invernadero, que reprodujeron los mismos síntomas observados en campo. Así, de acuerdo con los

Pathogenicity tests

Chlorotic mottle symptoms were observed at the beginning of the infection; these later became chlorotic ring spots on leaves of miguelito produced in the greenhouse and inoculated with macerates of *N. rustica* or *D. stramonium* leaves. In this experiment the virus was isolated from miguelito plants with wilt collected in the field, and the inoculation tests on differential plants indicated the possible presence of TSWV (Figure 3A). Later, numerous small necrotic spots appeared in the ring spots and, when they coalesced, they caused necrosis in the affected area, which spread to the entire plant and caused wilt (Figure 3B). The affected plants did not complete growth, exhibiting dwarfism (Figure 4A) and leaf deformation, reduction in flower size and loss of color (Figure 4B). All of the plants with these symptoms died from wilt identical to that observed in plants collected in commercial greenhouses in Morelos.

TSWV typically causes concentric ring spots in most of its susceptible hosts, but it is common that it also causes mosaic, necrosis in stems, petioles and flowers, as well as dwarfism (Kurstak, 1981; Walkey, 1986; Index of Viruses, 2006). The similarity between the symptoms caused by TSWV and those associated with fungi, bacteria or other viral pathogens can cause confusion and make identification difficult. However, the phytopathological analyses of the miguelito material with wilt performed in our laboratory did not reveal presence of fungi or bacteria, but only one virus from miguelito plants with wilt symptoms was separated consistently from different indicator plant species, from which fresh leaves with symptoms were taken and macerated to inoculate healthy miguelito plants produced from seed in the greenhouse, and the same symptoms as those observed in the field were reproduced. Thus, in accordance with Koch's postulates, applied to viruses, it was concluded that the virus isolated from miguelito is the causal agent of wilt.

Serological detection of viral protein with enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

Only TSWV was detected by ELISA in the miguelito samples from Morelos in the indicator plants inoculated with the virus isolated from miguelito and in miguelito plants used in pathogenicity tests and incubated in the greenhouse. The absorbance readings of the positive checks varied from 0.452 to 0.649 nm; in the field samples and indicator hosts the absorbance was 1.392 nm and in miguelito plants inoculated with

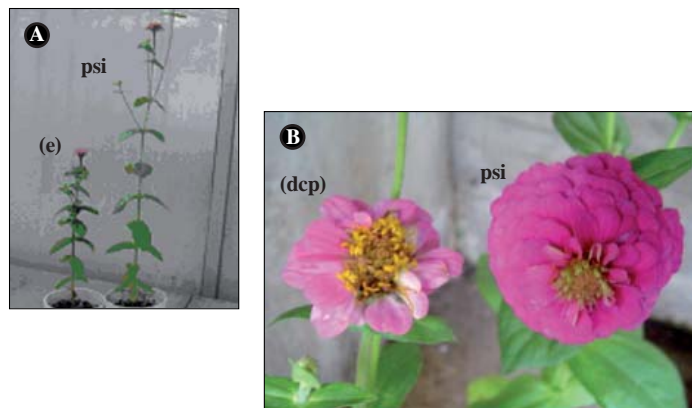


Figura 4. Síntomas inducidos por un aislado de TSWV separado de miguelito procedente de invernaderos en Cuautla, Morelos, inoculado por transmisión mecánica en plantas de miguelito producidas desde semilla en el invernadero. A) Enanismo (e). B) Deformación y pérdida de color de pétalos (dpc) comparado con plantas de miguelito sin inocular (psi).

Figure 4. Symptoms induced by a TSWV isolate separated from diseased miguelito from greenhouses of Cuautla, Morelos, and used to inoculate miguelito plants produced from seed in the greenhouse by mechanical transmission. A) Dwarfism (e). B) Deformation and loss of petal color (dpc) compared with non-inoculated miguelito plants (psi).

postulados de Koch, aplicado a virus, se concluyó que el virus aislado de miguelito es el agente causal de la marchitez.

Detección serológica de proteína viral por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Se detectó por ELISA únicamente al TSWV en las muestras de miguelito procedentes de Morelos, en las plantas indicadoras inoculadas con el virus aislado de miguelito y en las plantas de miguelito utilizadas en las pruebas de patogenicidad e incubadas en el invernadero. Las lecturas de absorbancia de los controles positivos variaron de 0.452 a 0.649 nm; en las muestras de campo y hospedantes indicadoras los valores de absorbancia tuvieron un valor de 1.392 nm y en las plantas de miguelito inoculadas con el TSWV en el invernadero el valor fue 1.485 nm. Los valores de la absorbancia fueron considerados positivos, específicos y de alta reactividad para el antisuero de TSWV usado en este trabajo y la reacción negativa para los antisueros de otros virus confirmó que el agente causal de la marchitez del miguelito es el TSWV.

Electroforesis de ARN de doble cadena de origen viral (ARN-dc)

El análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de ARN-dc extraído de diferentes plantas, con síntomas de marchitez seca, producto de la inoculación con extractos de hojas de miguelito con síntomas de origen viral, mostró un perfil electroforético compuesto de cuatro bandas de ARN-dc, cuyo peso aproximado fue 8.897 kb (L-RNA); 5.4 kb (M-RNA); 2.916 kb (S-RNA) y 1.0 kb, probablemente un segmento subgenómico de este virus (Figura 5, carril A). En algunas muestras sólo se observaron dos bandas (L y S), posiblemente debido a la mayor concentración de ARN-dc de estos dos componentes (Figura 5, carril

TSWV in the greenhouse absorbance was 1.485 nm. The absorbance values were considered positive, specific and highly reactive for the TSWV antiserum used in this study and the negative reaction to the antisera of other viruses confirmed that the causal agent of wilt in miguelito is TSWV.

Viral double-stranded RNA electrophoresis

The electrophoretic analysis in 1% agarose gels of ds-RNA extracted from different plants with dry wilt symptom caused by inoculation with extracts of miguelito leaves with viral symptoms exhibited an electrophoretic profile composed of four bands of ds-RNA, whose approximate weights were 8.897 kb (L-RNA), 5.4 kb (M-RNA), 2.916 kb (S-RNA), and 1.0 kb, probably a subgenomic segment of this virus (Figure 5, track A). In some samples only two bands (L and S) were observed, possibly due to a larger concentration of ds-RNA of these two components (Figure 5, track B). The electrophoretic pattern obtained was different from that of CMV and CMV mixed with ds-RNA of TSWV used for comparison (Figure 5, track A). No viral ds-RNA patterns were observed in healthy miguelito plants, indicating that these were not infected by virus. It was concluded that the electrophoretic viral ds-RNA pattern obtained from different plants used in this study and with viral symptoms corresponded only to TSWV.

The determination of the viral ds-RNA electrophoretic pattern obtained in polyacrylamide gels is an easy, inexpensive and relatively sure method of diagnosis which together with other complementary tests such as those used in our study, allows identification of most of the single strand RNA viruses, which in their replicative double-stranded (ds-RNA) form is unique to each virus, it is stable under enzymatic degradation and heat. This makes it useful in tests of molecular diagnosis such as RT-PCR or direct clonation (Valverde *et al.*, 1990).

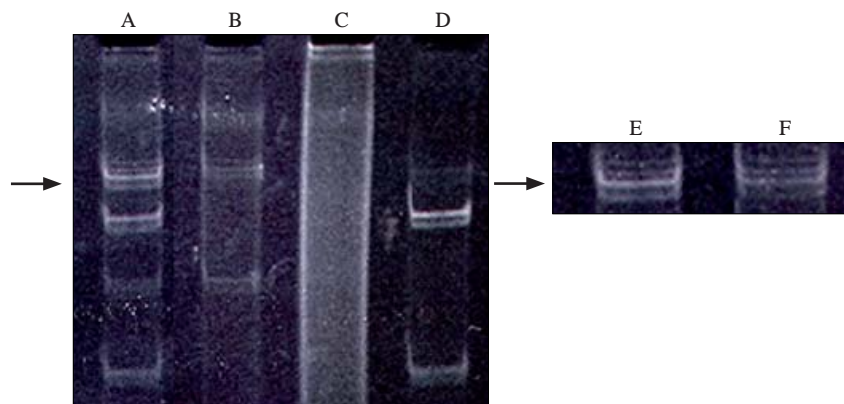


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (80 V; 2.15 h) de ARN-dc viral. Carril A) patrón electroforético del ARN-dc de TSWV obtenido de plantas de miguelito con síntomas en mezcla artificial con CMV. Carril B) ARN-dc de TSWV. Carril C) extracto ARN-dc de planta sana. Carril D) ARN-dc de CMV. Carriles E) y F) acercamiento del patrón electroforético del ARN-dc de TSWV.

Figure 5. Electrophoresis in 6% polyacrylamide gel (80 V; 2.15 h) viral ds-RNA. Track A) electrophoretic pattern of TSWV ds-RNA obtained from miguelito plants with symptoms and artificially mixed with CMA. Track B) ds-RNA of TSWV. Track C) ds-RNA extract from healthy plant. Track D) ds-RNA of CMV. Track E) and F) closeup of the electrophoretic pattern of ds-RNA of TSWV.

B). El patrón electroforético obtenido fue diferente al del CMV usado como comparación y en mezcla con el ARN-dc de TSWV (Figura 5, carril A). No se observaron patrones de ARN-dc viral en plantas de miguelito sanas, que indicó que éstas no estaban infectadas por virus. Se concluyó que el patrón electroforético ARN-dc viral obtenido de las distintas plantas utilizadas en este trabajo y con síntomas virales correspondía únicamente al TSWV.

La determinación del patrón electroforético de ARN-dc de origen viral, obtenidos en geles de poliacrilamida, es un método de diagnóstico fácil, barato, relativamente seguro, que junto con otras pruebas complementarias como las usadas en nuestro trabajo, permite identificar la mayoría de los virus de ARN de cadena sencilla; en su forma replicativa de doble cadena (ARN-dc) es única para cada virus, muy estable a la degradación enzimática y al calor. Esto permite usarlo para pruebas de diagnóstico moleculares como la RT-PCR o la clonación directa (Valverde *et al.*, 1990).

Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se obtuvo consistentemente un producto de la RT-PCR de 750 pb (Figura 6) cuando se usaron los oligonucleótidos sense/antisense (Pappu *et al.*, 1996) y el ARN obtenido de plantas de miguelito enfermas y de las distintas plantas de hospedantes inoculadas con un aislamiento del TSWV identificado previamente por serología. Para obtener un buen producto de la RT-PCR fue necesario obtener el ARN viral de plantas

Reverse transcription linked to polymerase chain reaction (RT-PCR)

An RT-PCR product of 750 pb was obtained consistently when the oligonucleotides sense/antisense (Pappu *et al.*, 1996) and RNA obtained from diseased miguelito plants and different host plants inoculated with a TSWV isolate previously identified by serology was used. To obtain a good RT-PCR product, it was necessary to obtain viral RNA from plants 15 to 25 d after inoculation with the virus and to use it immediately after extraction and purification. Although RT-PCR products were obtained with both methods of extraction and purification of viral RNA, the best source of a good product for RT-PCT to be used for sequencing was that obtained using the reagent included in the RNA Reagent Kit (InvitroGen, USA).

RT-PCR amplified nucleotide sequences of the capsid gene fragment of TSWV isolates obtained from miguelito (access number EF067862) and those obtained from *N. rustica* (access number EF067863) were 100% homologous, while it was 93% homologous when compared with TSWV sequences available in the data base of the NCBI/GenBank. This is sufficient to confirm that the virus causing wilt in miguelito is *Tomato spotted wilt virus*.

Tomato spotted wilt virus is the prototype species within the genus *Tospovirus* belonging to the family *Bunyaviridae* and is one of the main threats to production of numerous crops (Moyer, 1999; Fauquet *et al.*, 2005; Index of Viruses, 2006). This virus infects more than 650 plant species, both dicotyledons and monocotyledons (German *et al.*, 1992; Moyer,

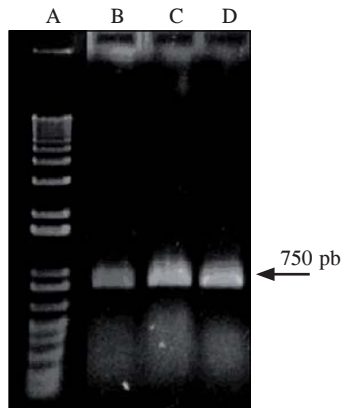


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la rt-PCR del gen de la proteína de la cápside de TSWV (750 pb) separado de plantas de miguelito y hospedantes indicadoras infectadas con TSWV por transmisión mecánica. Carril A) Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril B) *Z. elegans*. Carril C) *G. globosa*. Carril D) *N. rustica*.

Figure 6. Electrophoresis in 1% agarose gel of RT-PCR of the TSWV capsid protein gene (759 pb) separated from miguelito plants and indicator hosts infected with TSWV by mechanical transmission. Track A) molecular weight marker 1 Kb. Track B) *Z. elegans*. Track C) *G. globosa*. Track D) *N. rustica*.

de 15 a 25 d después de la inoculación con el virus y usándolo inmediatamente después de su extracción y purificación. Aunque se obtuvieron productos de la RT-PCR con ambos métodos de extracción y purificación de ARN viral, la mejor fuente para obtener un buen producto para la RT-PCR y usarlo para su secuenciación fue usando el reactivo incluido en el kit RNA Reagent (InvitroGen, USA).

La comparación de la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen de la cápside amplificado por RT-PCR, de los aislamientos de TSWV obtenidas del miguelito (número de acceso EF067862) con la obtenida de *N. rustica* (número de acceso EF067863) mostraron una homología del 100%, mientras que la homología fue 93% al compararlo con las secuencias de TSWV disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank. Esto es suficiente para confirmar que el virus causante de la marchitez del miguelito es el *Tomato spotted wilt virus*.

Tomato spotted wilt virus es la especie tipo dentro del género *Tospovirus* ubicada en la familia *Bunyaviridae* y es una de las principales amenazas a la producción de múltiples cultivos (Moyer, 1999; Fauquet *et al.*, 2005; Index of Viruses, 2006). Este virus infecta a más de 650 especies de plantas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (German *et al.*, 1992; Moyer, 1999) y es una seria amenaza para hortalizas como chile (Adkins, 2003), tomate (Zitter, 1991) y tomatillo (De La Torre *et al.*, 1998) y para un gran número de especies ornamentales (Daughtrey *et al.*, 1995; Pappu, 1997). Puede ser distribuido en plantas propagadas vegetativamente con infecciones asintomáticas y los tubérculos, cormos, rizomas y bulbos infectados son fuente excelente de inóculo de este virus (Daughtrey *et al.*, 1995). Se ha destacado que numerosas especies de malezas asociadas a cultivos son hospedantes naturales de trips y la principal fuente de inóculo del TSWV (Hobbs *et al.*, 1993; Groves *et al.*, 2002).

Este virus es transmitido persistentemente de planta a planta sólo por adultos de al menos ocho especies

(1999) and is a serious threat to vegetables such as chili (Adkins, 2003), tomato (Zitter, 1991) and husk tomato (De la Torre *et al.*, 1998) and to a large number of ornamental species (Daughtrey *et al.*, 1995; Pappu, 1997). It can spread by means of plants propagated vegetatively with asymptomatic infections, and infected tubers, corms, rhizomes and bulbs are sources of inoculum (Daughtrey *et al.*, 1995). It has been highlighted that numerous crop-related weed species are natural hosts to thrips and are the main source of TSWV inoculum (Hobbs *et al.*, 1993; Groves *et al.*, 2002).

This virus is persistently transmitted from plant to plant only by adults of at least eight species of thrips and only the larvae can acquire the virus. After its replication in the insect, the adults, and occasionally the second larval stage, can transmit the virus. The adults can ingest the virus from infected plants, but they do not become viruliferous due to barriers in the middle throat that impede passage of the virus to internal tissues of the insect (Ullman *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 2003; Assis *et al.*, 2004). Thrips have a wide range of hosts, which favors distribution, permanence and genetic variation of TSWV or the occurrence of crops that were not originally their hosts (Ullman *et al.*, 1992). TSWV has been detected in México in tomato, chili and ornamental species, causing wilt, and it has been demonstrated that diverse variants of this virus cause the same symptoms in indicator hosts used in the present study (De la Torre *et al.*, 1998; De la Torre *et al.*, 2002).

Because of the great diversity of symptoms that TSWV causes in its different hosts and that can be confused with those caused by fungi, bacteria and other viruses, in México diagnosis of TSWV is most frequently done by serology using commercial antisera. However, TSWV has a large number of host plants and interacts with several species of its vector insect where it replicates efficiently, favoring a high rate of genetic variation (German *et al.*, 1992;

de trips y sólo el estado larval puede adquirir el virus. Después de su replicación en el insecto, los adultos y algunas ocasiones el segundo estadio larval puede transmitir el virus. Los adultos pueden ingerir el virus de plantas infectadas pero no llegan a ser virulíferos debido a las barreras de la garganta media que impiden el paso del virus a los tejidos internos del insecto (Ullman *et al.*, 1992; Mason, *et al.*, 2003; Assis *et al.*, 2004). Los trips tienen un amplio intervalo de hospedantes, lo que facilita la distribución, permanencia y variación genética de TSWV o la ocurrencia en cultivos que no eran sus hospedantes originales (Ullman *et al.*, 1992). TSWV se ha detectado en México en tomate, chile y otras especies de ornamentales causando marchitez y se ha demostrado que diversas variantes de este virus causan los mismos síntomas en las hospedantes indicadoras usadas en este trabajo (De La Torre *et al.*, 1998; De La Torre *et al.*, 2002).

Por la gran diversidad de síntomas que causa el TSWV en sus diferentes hospedantes, que pueden ser confundidos por los causados por hongos, bacterias y otros virus, en México el diagnóstico más frecuente para TSWV se hace principalmente por serología, usando antisueros comerciales. Sin embargo, TSWV tiene un amplio número de plantas hospedantes e interactúa con varias especies de su insecto vector donde se replica eficientemente, lo que favorece una alta tasa de variación genética (German *et al.*, 1992; De Avila *et al.*, 1993). Por tanto, es factible que de este virus se encuentre un alto número de variantes sin identificar en los cultivos que infecta, e incluso pueden estar presentes nuevas especies de Tosposvirus que se han identificado y diagnosticado en otras partes del mundo en cultivos importantes e incluso en su insecto vector, principalmente por métodos moleculares (Okuda *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2003); no sólo por serología, donde la clonación y secuenciación de los productos de la RT-PCR de los diferentes componentes genómicos son fundamentales (Jain *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

Se identificó al virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) como el agente causal de la marchitez seca del miguelito (*Z. elegans* L.) que se cultiva en viveros comerciales en el Estado de Morelos, México, mediante pruebas de transmisión mecánica en plantas indicadoras y después en ensayos de patogenicidad inoculando por transmisión mecánica un aislamiento puro de este virus en plántulas sanas de miguelito, producidas desde semilla, en las que causó moteados, manchas en anillos concéntricos, enanismo y marchitez, síntomas idénticos a los observados en condiciones de campo.

De Avila *et al.*, 1993). Thus, it is feasible that a large number of unidentified variants of this virus are found in crops it infects, and even new species of Tosposvirus may be present that have been identified and diagnosed in other parts of the world in important crops and even in its vector insect, mainly by molecular methods (Okuda *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2003), not just by serology in which cloning and sequencing of RT-PCR products of different genomic components are fundamental (Jain *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 2001).

CONCLUSIONS

Tomato spotted wilt virus (TSWV) was identified as the causal agent of dry wilt of miguelito (*Z. elegans* L.), which is cultivated in commercial nurseries in the state of Morelos, México, by mechanical transmission tests in indicator plants, and later by pathogenicity tests in which a pure isolate of the virus was used to inoculate, by mechanical transmission, healthy miguelito seedlings produced from seed, causing mottle, concentric ring spots, dwarfism and wilt, identical to those symptoms observed in the field.

With serology (DAS-ELISA), only TSWV was detected in samples from commercial nurseries with dry wilt symptoms, in indicator host plants used to separate the virus, as well as in miguelito plants used in pathogenicity tests. ds-RNA, the replicative form of the genomic components of the single-strand viral RNA, was purified, allowing identification of the specific TSWV electrophoretic pattern; this method can be a complementary tool for diagnosis.

Taxonomic identity of TSWV was confirmed by reverse transcription linked to PCR (RT-PCR) and direct sequencing of its products. TSWV sequences obtained from miguelito plants collected in commercial nurseries aligned and compared with sequences obtained from *N. rustica* plants inoculated with the same virus had a nucleotidic homology of 100% and of 93% when compared with the sequences of other TSWV isolates available in the NCBI/GeneBank databases and distributed over the world.

This is the first report of the presence of TSWV in miguelito, an ornamental plant of Mexican origin. Two molecular methods are described for the diagnosis and identification of this virus.

—End of the English version—



Se detectó por serología (DAS-ELISA) únicamente al TSWV en muestras procedentes de viveros comerciales con síntomas de marchitez seca, en las plantas

hospedantes indicadoras usadas para separar a este virus, así como en las plantas de miguelito usadas en los ensayos de patogenicidad. Se purificó el ARN-dc, la forma replicativa de los componentes genómicos de los virus de ARN de cadena sencilla, que permitió identificar el patrón electroforético específico del TSWV, que podría ser una herramienta complementaria para su diagnóstico.

Se confirmó la identidad taxonómica del TSWV por transcripción inversa ligada a la PCR (RT-PCR) y secuenciación directa de sus productos. Las secuencias obtenidas, alineadas y comparadas de los aislamientos de TSWV de las plantas de miguelito procedentes de viveros comerciales con las secuencias obtenidas de plantas de *N. rustica* inoculadas con el mismo virus, mostraron una homología nucleotídica del 100% y del 93% con las secuencias disponibles en el NCBI/GenBank databases de otros aislados de TSWV distribuidos en el mundo.

Este informe es el primero de la presencia del TSWV en miguelito, planta ornamental de origen mexicano. Se describen dos métodos moleculares para el diagnóstico e identificación de este virus.

RECONOCIMIENTO

Esta investigación fue totalmente financiada por el Proyecto SAGARPA-CONACYT No 077. Se contó también con el apoyo logístico del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- Adkins, S. 2003. Tomato spotted wilt virus. *In*: K. Pernezny, P. D. Roberts, J. F. Murphy, and N. P. Golberg. (eds). Compendium of Pepper Diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. MN, USA. pp: 39-40.
- Assis Filho, F. M. de, C. M. Deom, and J. L. Sherwood. 2004. Acquisition of *Tomato spotted wilt virus* by adults of two thrips species. *Phytopathology* 94: 333-336.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher. (eds). 1996 onwards. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide> (Consultado nov/2007).
- Chantler, M. S., and A. L. Clayton. 1988. The use of ELISA for rapid viral diagnosis: Viral antigen detection in clinical specimens. *In*: Kemeny, D. M., and S. J. Challacombe (eds). ELISA and other Solid Phase Immunoassays. J. Wiley and Sons. New York. pp: 279-301.
- Chu, F.-H., C. -H. Chao, Chen C. -C., and S. -D. Yeh. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91: 361-368.
- Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Daughtrey, M. L., R. L. Wick, and J. L. Peterson. 1995. Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. MN, USA. pp: 69-72.
- De Avila, A. C., P. De Haan, R. Kormelink, R. O. Resende, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1993. Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* 74: 153-159.
- De La Torre, A. R., D. Téliz O., E. Cárdenas S., B. L. Barrón R., E. García L., M. Cárdenas A., y R. Rivera B. 1998. Identificación de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la Región Centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 16: 1-11.
- De La Torre, A. R., L. Cervantes D., H. Houston A., y R. A. Valverde. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia* 36(2): 211-221.
- Dijkstra, J., and P. C. De Jager. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises.* Edit. Springer, Berlin. 459 p.
- Fauquet, C., M. Mayo A., J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. (eds). 2005. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier/Academic Press, USA. 1259 p.
- German, L. T., E. D. Ullman, and W. J. Moyer. 1992. Tospovirus: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 315-348.
- Groves, R. L., J. F. Walgenbach, J. W. Moyer, and G. G. Kennedy. 2002. The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Dis.* 86: 573-582.
- Hobbs, H. A., L. L. Black, R. N. Story, R. A. Valverde, W. P. Bond, J. M. Jr. Gatti, D. O. Schaeffer, and R. R. Johnson. 1993. Transmission of tomato spotted wilt virus from pepper and three weeds hosts by *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* 77: 797-799.
- Index of Viruses. 2006. *Bunyaviridae.* *In*: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (ed). Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm (Abril/ 2007).
- Jain, R. K., S. S. Pappu, H. R. Pappu, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Molecular diagnosis of tomato spotted wilt tospovirus infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Dis.* 82: 900-904.
- Kurstak, E. 1981. *Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 935 p.
- Mason, Giovanna, P. Roggero, and L. Tavella. 2003. Detection of Tomato spotted wilt virus in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virological Methods* 109: 69-73.
- Moyer, J. W. 1999. *Tospoviruses (Bunyaviridae).* *In*: Granoff A., and R. G. Webster (eds). *Encyclopedia of Virology.* Academic Press, San Diego, CA. pp: 1803-1807.
- NCBI. 2007. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/\(Nov, 2007\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/(Nov, 2007)).
- Okuda, Mitsuru, and K. Hanada. 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *J. Virological Methods* 96: 149-156.
- Pappu, H. R., A. K. Culbreath, P. F. Bertrand, A. S. Csinos, and C. L. Niblett. 1996. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of the Tomato spotted wilt virus isolate from Georgia, USA. *Acta Horticulturae* 431: 237-243.
- Pappu, H. R. 1997. Management of emerging virus threats of crops: Impact of biotechnology in controlling tospoviruses. *Biotechnol. Dev. Monitor* 31: 14-17.
- Sosa, M. C., F. Perdomo R., C. W. D. Brathwaite, y J. J. Salazar Cruz. 1997. *Manual de Técnicas para el Diagnóstico de las Enfermedades de las Plantas.* IICA/México. 221 p.
- Surzycki, S. 1999. *Basic Techniques in Molecular Biology.* Springer-Verlag. Berlin. pp: 233-262.
- Valverde, R. A., T. S. Nameth, and L. R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.* 74: 255-258.

- Ullman, D. E., J. J. Cho, R. F. L. Mau, D. M. Westcot, and D. M. Cantone. 1992. Midgut epithelial cells act as a barrier to Tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology* 85: 456-463.
- Walkey, D. G. A. 1986. *Applied Plant Virology*. John Wiley & Sons. New York. USA. 329 p.
- Zitter, T. A. 1991. Tomato Spotted wilt. *In*: Jones, J. B., J. P. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter (eds). *Compendium of Tomato Diseases*. APS PRESS. The American Phytopathological Society. MN. USA. pp: 40.