

## Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) en México

First report of *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch) in Mexico

Ocampo Ocampo T<sup>1</sup>, DL Ochoa Martínez<sup>1</sup>, S Ramírez Rojas<sup>2</sup>, G Valdovinos Ponce<sup>1</sup>, C Nava Díaz<sup>1</sup>

**Resumen.** El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), a través del Campo Experimental "Zacatepec" en el estado Morelos, inició un programa de mejoramiento genético de plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena ("nochebuena de sol"). Dicho programa requiere de la generación de una base de datos fitosanitarios con tolerancia a los principales patógenos. México no cuenta con información sobre las enfermedades causadas por virus en la nochebuena de sol, por lo que el objetivo de la presente investigación fue generar datos preliminares sobre los virus asociados a estos materiales. Con base en los resultados obtenidos en las técnicas DAS-ELISA y RT-PCR, se reportan por primera vez en México los virus *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena.

**Palabras clave:** Nochebuena silvestre; Nochebuena semicultivada; Virus; DAS-ELISA; RT-PCR.

**Abstract.** The Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), in Zacatepec Morelos, started a genetic improvement program of wild and semi-cultivated poinsettia plants ("nochebuena de sol"). It is important to generate a phytosanitary database that allows the release of new varieties and hybrids that provide tolerance to the major pathogens reported in cultivated poinsettia plants. The phytosanitary status of the "nochebuena de sol" plants is not available in Mexico, so the objective of this research was to generate preliminary data about viruses associated to these materials. Based on DAS-ELISA and RT-PCR results, we reported the presence of the *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) in wild and semi-cultivated poinsettia plants for the first time in Mexico.

**Keywords:** Wild poinsettia; Semi-cultivated poinsettia; Virus; DAS-ELISA; RT-PCR.

<sup>1</sup>Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Posgraduados Km 36,5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México. C.P. 56230.

<sup>2</sup>Laboratorio de Fitopatología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatepec Km. 0,5 Carretera Zacatepec-Galeana, Zacatepec, Morelos, México. C.P. 62780.

Address Correspondence to: Guadalupe Valdovinos Ponce. Tel.: 01(595) 95-2-02-00 Ext.1612, e-mail: gvapon@colpos.mx

Recibido / Received 21.X.2012. Aceptado / Accepted 11.II.2013.

## INTRODUCCIÓN

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch), perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es una planta de ornato utilizada en interiores en la época navideña (Ecke et al., 1990). En cuestión fitosanitaria, los virus que se han reportado en el cultivo de nochebuena comercial son *Euphorbia leaf curl virus* (ELCV), *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) y *Poinsettia latent virus* (PnLV), los cuales se encuentran distribuidos en China (Ma et al., 2004); Estados Unidos de América (Fulton y Fulton, 1980); Canadá (Chiko, 1983); Australia (Guy, 1985); Alemania (Koenig y Lesemann, 1980; Bradel et al., 2000); Inglaterra (Lesemann et al., 1983); Corea (Chung et al., 2004); Nueva Zelanda (Lebas et al., 2007); Japón (Okano et al., 2010); Noruega (Spetz et al., 2008); Venezuela (Carballo et al., 2001), y en Alemania e Italia (Bellardi y Bertaccini, 1989; Koenig y Lesemann, 1980). Hasta la fecha, en México no se tienen registros sobre la presencia de estos virus en nochebuena comercial.

El INIFAP, a través del Campo Experimental Zacatepec en el estado de Morelos, inició un programa de mejoramiento genético de plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena (“nochebuena de sol”) con el objetivo de generar variedades mexicanas que disminuyan los costos de producción al ofertar genotipos competitivos con precios accesibles al productor. Dicho programa requiere de la generación de una amplia base de datos genéticos y fitosanitarios que permitan la liberación permanente de nuevas variedades e híbridos con características deseables para los productores y consumidores, y con tolerancia a los principales patógenos.

México no cuenta con información científica sobre los virus que están infectando plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena, por lo que el objetivo de la presente investigación fue generar datos preliminares sobre los virus asociados a estos materiales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta del material vegetal.** Entre el 2010 y 2011 se recolectaron plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena asintomáticas (13 plantas) y plantas con síntomas putativos a virosis (clorosis, mosaicos, variegado, deformaciones foliares y manchas blancas) en los estados de Morelos (18 plantas), Guerrero (13 plantas), Distrito Federal (5 plantas), Michoacán (12 plantas), México (12 plantas), Puebla (9 plantas), Veracruz (13 plantas), Oaxaca (16 plantas), Nayarit (7 plantas) y Sinaloa (3 plantas). Se tomaron varetas y esquejes de 30 centímetros de largo y se mantuvieron en papel periódico húmedo dentro de una hielera para su posterior traslado al Campo Experimental “Zacatepec” del INIFAP (longitud 99° 12'02.9", latitud 18°39'11.3", 911 msnm).

**Establecimiento de plantas.** Las varetas y esquejes recolectados se enraizaron en macetas de 16 L con una mezcla de sustrato de ocochal, atocle y polvillo de coco (60:20:20 v/v). Las macetas se mantuvieron bajo una malla aluminizada en el Campo Experimental para su posterior análisis e identificación de virus.

**Prueba serológica DAS-ELISA.** Para determinar la presencia de los virus TMV y PnMV se realizó la prueba DAS-ELISA con los anticuerpos y conjugados correspondientes (Agdia®). Se evaluó tejido vegetal de todas las muestras recolectadas y establecidas en el campo experimental del INIFAP, según el protocolo de la empresa.

Los valores de absorbancia de las muestras se midieron a los 45 y 60 minutos de incubación en un lector de placas ELISA (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que tuvieron valores de absorbancia mayores al promedio de los controles negativos más dos veces su desviación estándar (Sutula et al., 1986).

**Inoculación de plantas indicadoras.** Como fuente de inóculo se utilizaron las hojas de nochebuena de sol que fueron positivas a TMV y PnMV en la prueba DAS-ELISA y que presentaron los mayores valores de absorbancia.

Las plantas utilizadas como indicadoras del PnMV fueron *Nicotiana benthamiana* y *N. clevelandii* (Chung et al., 2004; Lebas et al., 2007) y para el TMV, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi y *N. tabacum* cv. Samsun (Dovas et al., 2004). Cada virus se inoculó mecánicamente en dos plantas por especie indicadora. De manera independiente, el tejido foliar infectado con cada virus se maceró en una solución de buffer de fosfatos 0,01 M más ácido dietilditiocarbámico (DIECA) pH 7,2, en una proporción de 1:10 peso/volumen (Chung et al., 2004). Sobre la superficie de tres hojas de cada planta se espolvoreó carborundum de 600 mallas y con un hisopo humedecido con el macerado se frotaron las láminas. Como tratamiento control se inoculó una planta de cada especie indicadora con la solución de buffer de fosfatos más DIECA pH 7,2 1:10. Las inoculaciones se hicieron en los meses de octubre del 2011, y en febrero y marzo del 2012. Las plantas se mantuvieron en invernadero a temperatura de 10-35 °C durante 45 días. Para verificar la presencia de los virus en las plantas inoculadas se hizo RT-PCR de las hojas que mostraron síntomas putativos a virus.

**RT-PCR.** Los resultados positivos obtenidos a partir de las pruebas serológicas se corroboraron mediante RT-PCR. La extracción de ARN se realizó de acuerdo al protocolo de Harris (2002), con algunas modificaciones. En nitrógeno líquido se maceraron independientemente 250 mg de hoja y raíz. El macerado se colocó en un tubo eppendorf estéril con 500 µL de buffer salino de lavado. Las muestras se agitaron en

un vórtex y se centrifugaron por 5 min a 14 000 rpm. Se decantó la fase acuosa de los sólidos sedimentados, se agregaron 600 µL de buffer CTAB, y se mezclaron con un vortex. Las muestras se incubaron a 55 °C durante 30 min y se adicionaron 400 µL de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló con vortex para emulsificar y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se adicionó una mezcla de acetato de amonio 7,5 M: isopropanol a una proporción 1:10 según el volumen colectado.

Los tubos se mezclaron siete veces por inversión, se incubaron en hielo por 10 min y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min para precipitar los ácidos nucleicos. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. Se decantó el etanol y la pastilla de ARN se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 50 µL de agua estéril libre de ARNsas en baño María a 55 °C durante 15 min.

La integridad del ARN se verificó bajo electroforesis a 90 V durante 45 minutos en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Invitrogen®) en buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). La calidad del ARN se cuantificó en un nanodrop® (ND - 1 000 V 3.2.1).

Se utilizaron los iniciadores universales para el género *Tobamovirus* debido a que los antisueros utilizados en la prueba DAS-ELISA para identificar al TMV también pueden detectar al *Tomato mosaic virus* (ToMV) y al *Sunm hemp mosaic virus* (SHMV) (Dovas et al., 2004).

La RT-PCR se realizó según el protocolo propuesto por Dovas et al. (2004) con algunas modificaciones. Para la retrotranscripción del ARN se utilizó una mezcla de reacción de 25 µL con 2,5 µL de Tris HCl pH 8,8 100 mM; 1,25 µL de KCl 1 M; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 2,5 µL de Tritón X-100 al 1%; 0,6 µL de dNTP's 10 mM; 1,25 µL de DTT 100 mM; 1,25 µL de DMSO al 100%; 0,3 µL de Inhibidor de ARNasa 40 U/µL (Roche®); 0,025 µL de Superscript II ARNsa H transcriptasa reversa 280 U (Invitrogen™); 0,2 µL de reversa transcriptasa M-MLV 40 U (Promega®); 2 µg de ARN de la muestra problema, y 2,5 µL de los iniciadores Tob RT up 1 (5'-GARTAYSCIGCIYTICARAC-3') y Tob RT do 2 (5'-BGCYTCAAARTTCCA-3') 10 µM.

La RT se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo de 43 °C durante 60 minutos; un ciclo de 50 °C por 2 minutos; un ciclo de 94 °C por 4 minutos; 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 43 °C y 15 segundos a 72 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 46 °C y 15 segundos a 72 °C; y una extensión final a 72 °C por 2 minutos.

La PCR se hizo con 5 µL de ADN complementario; 2 µL de Tris HCl pH 8,8 100 mM; 1 µL de KCl 1 M; 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 2 µL de Tritón X-100 al 1%; 0,5 µL de dNTP's 10 mM; 0,16 µL de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®), y 2 µL de cada uno de los iniciadores TobN up3 (5'-GGCGYTGACARACIATHGTTITAYCA-3'), TobN do4 (5'-GTRTTICCIATRAAIGTI-GTIACRTC-3') y TobN

do4G (5'-GCCGATRAAGGTGGTGACRTC-3') 10 µM en un volumen final de 20 µL que amplifican un fragmento de 400 pb. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 3 minutos a 94 °C; dos ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 51 °C y 15 segundos a 72 °C; 26 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 26 segundos a 61 °C y 15 segundos a 72 °C; y una extensión final por 2 minutos a 72 °C.

Como testigo positivo se incluyó ARN total obtenido de una hoja de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con TMV.

**PnMV** Los iniciadores PnMV-F (5'-GTGCCAGC-CGCCGTTCTTCT-3') y PnMV-R (5'-TGAGCCGGC-GACTCCATCCA-3'), que amplifican un fragmento de 700 pb, se diseñaron a partir del genoma completo de PnMV (número de accesoión NC\_002164.1) con el programa NCBI/Primer-BLAST.

La RT se realizó con una mezcla de 12 µL con 2 µg de ARN y 1 µL de los iniciadores PnMV-F y PnMV-R 10 mM. Las muestras se incubaron a 65 °C por 10 min, se transfirieron a hielo y se agregó una mezcla con 4 µL de buffer RT 5X; 2 µL de DTT 0.1 M; 1 µL de dNTP's 10 mM, y 1 µL de reversa transcriptasa M-MLV 200 U (Promega®). Posteriormente, las muestras se incubaron en el termociclador a 42 °C y 70 °C por 60 y 10 min, respectivamente.

La PCR se hizo en una mezcla de 25 µL con 5 µL de buffer de PCR 5X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,5 µL de dNTP's 10 mM; 1 µL de los iniciadores PnMV-F y PnMV-R 10 mM; 0,5 µL de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®), y 5 µL de ADN complementario. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 60 segundos a 72 °C; y una extensión final por 7 minutos a 72 °C.

Como positivo se utilizó tejido liofilizado del control positivo para PnMV de Agdia®.

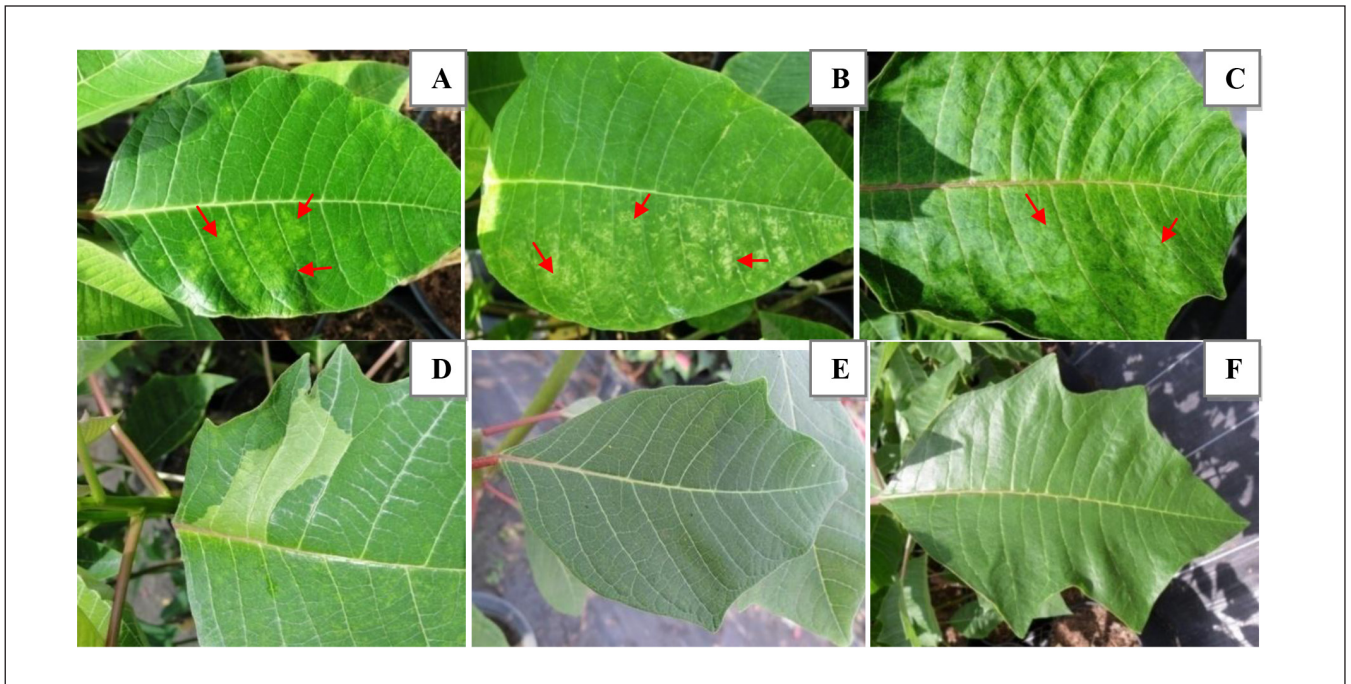
En todas las RT-PCRs se incluyó un control negativo consistente en la mezcla de reacción sin el templado de ADN complementario.

La electroforesis de todos los productos de RT-PCR se realizó en un gel de agarosa al 1,8% (p/v) disuelto en buffer TBE 1X a 90 V durante 40 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador (Gene Wizard, Syngene Bio Imaging) y se purificaron con el Wizard SV Gel y Sistema de limpieza de PCR (Promega®) siguiendo el protocolo de la empresa. La secuenciación de los amplicones se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## RESULTADOS

Después del establecimiento del material vegetal recolectado en campo en las instalaciones del INIFAP, las plantas de nochebuena mostraron síntomas putativos a los inducidos por virus, tales como clorosis, mosaico, variegado, deformación foliar y manchas blancas (Fig. 1).





**Fig. 1.** Hojas de nochebuena de sol con síntomas putativos de virus (A-E). A) Pequeñas manchas cloróticas, B) Manchas blancas, C) Mosaico, D) Variegado, E) Deformaciones, F) Hoja asintomática.

**Fig. 1.** Poinsettia leaves with putative virus symptoms (A-E). A) Small chlorotic spots, B) White spots, C) Mosaic, D) Variegated, E) Deformation, F) Asymptomatic leaf.

**Tabla 1.** Virus detectados mediante la prueba serológica DAS-ELISA.

**Table 1.** Virus detected by DAS-ELISA test.

Estado	Número de plantas sintomáticas	Número de plantas positivas a TMV	Número de plantas positivas a PnMV	Número de plantas coinfectadas TMV-PnMV
Morelos	18	5	0	2
Guerrero	13	6	0	1
Distrito Federal	5	2	0	0
Michoacán	12	2	2	0
Estado de México	12	2	0	1
Puebla	9	3	0	1
Veracruz	13	7	0	2
Oaxaca	16	6	2	3
Nayarit	7	4	0	0
Sinaloa	3	0	0	1

La evaluación de los síntomas y la identificación serológica de los virus se hicieron del material establecido en el Campo Experimental del INIFAP en Zacatepec, Morelos.

**Prueba serológica DAS-ELISA.** Cincuenta y dos de las 108 plantas sintomáticas fueron positivas a virus. De este grupo de plantas, 37 estuvieron infectadas con TMV, 4 con PnMV y 11 coinfectadas con ambos virus (Tabla 1).

**RT-PCR.** La presencia de TMV y PnMV se corroboró molecularmente en 7 de las 52 muestras analizadas (Tabla 2). Los iniciadores universales para tobamovirus y para el virus PnMV amplificaron un fragmento de aproximadamente 400

y 700 pb, respectivamente (Figs. 2 y 3). Las secuencias de estos fragmentos fueron 88 y 96% similares a las secuencias de TMV y PnMV reportadas en el GenBank, respectivamente, lo que confirmó su presencia en el tejido foliar y radical de plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena.

**Inoculación de plantas indicadoras.** Solamente una de las dos plantas de *N. glutinosa* inoculadas con el TMV presentó síntomas de clorosis y manchas necróticas. Estos mismos síntomas se presentaron en una de las dos plantas de *N. benthamiana* y *N. clevelandii* inoculadas con PnMV (Tabla 3). Los síntomas se expresaron 10 días después de la inoculación en las plantas infectadas en octubre del 2011 y febrero del 2012, mientras que en las inoculadas en marzo del 2012 se presentaron a los 7 días. Estas plantas se analizaron mediante RT-PCR para confirmar la presencia de los virus, pero en ningún caso hubo amplificación.

Tabla 2. Virus detectados mediante RT-PCR.

Table 2. Virus detected by RT-PCR.

Estado	Número de plantas sintomáticas	Número de plantas positivas a TMV	Número de plantas positivas a PnMV
Michoacán	12	0	1
Estado de México	12	1	0
Oaxaca	16	0	4
Nayarit	7	1	0

La evaluación de los síntomas y la identificación molecular de los virus se hicieron del material establecido en el Campo Experimental del INIFAP en Zacatepec, Morelos.

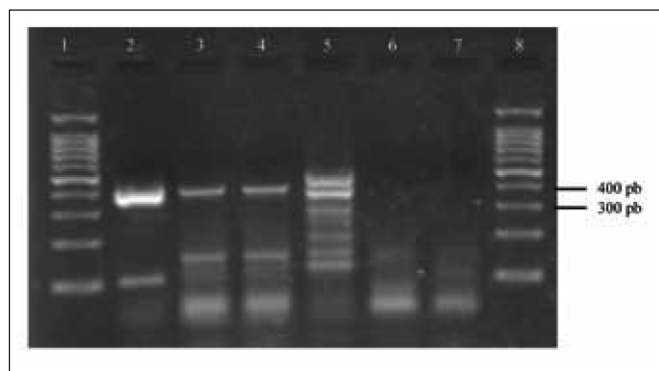


Fig. 2. Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR para el género *Tobamovirus*. Carriles 1 y 8 marcador de peso molecular 100 pb (USB®); carril 2 control positivo de hoja de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con TMV; carriles 3 y 5 tejido foliar; carriles 4 y 6 tejido radical; carril 7 control negativo.

Fig. 2. RT-PCR amplification products of *Tobamovirus*. Lanes 1 and 8 DNA marker 100 bp (USB®); lane 2 positive control of tomato leaf (*Solanum lycopersicum*) infected with TMV; lanes 3 and 5 leaf tissue; lanes 4 and 6 root tissue; lane 7 negative control.

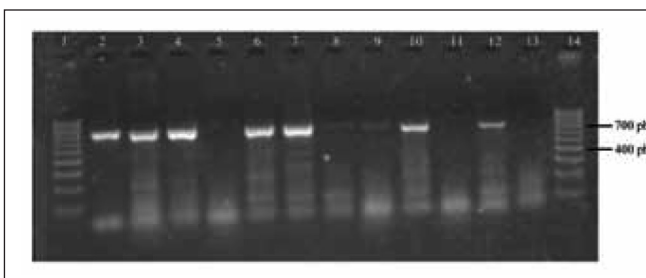


Fig. 3. Productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR para PnMV. Carriles 1 y 14 marcador de peso molecular 100 pb (USB®); carril 2 control positivo PnMV (Agdia®); carriles 3, 5, 7, 9 y 11 tejido foliar; carriles 4, 6, 8, 10 y 12 tejido radical; carril 13 control negativo.

Fig. 3. RT-PCR amplification products of PnMV. Lanes 1 and 14 DNA marker 100 bp (USB®); lane 2 PnMV (Agdia®) positive control; lanes 3, 5, 7, 9, and 11 leaf tissue; lanes 4, 6, 8, 10, and 12 root tissue; lane 13 negative control.

Tabla 3. Respuesta de plantas indicadoras infectadas artificialmente con TMV y PnMV bajo condiciones de invernadero.

Table 3. Response of indicator plants infected artificially with TMV and PnMV under greenhouse conditions.

Virus	Planta indicadora	Número de plantas inoculadas	Octubre 2011*	Febrero 2012*	Marzo 2012*
TMV	<i>Nicotiana glutinosa</i>	2	1	1	1
	<i>N. tabacum</i> cv. <i>Xanthi</i>	2	0	0	0
	<i>N. tabacum</i> cv. <i>Samsun</i>	2	0	0	0
PnMV	<i>N. benthamiana</i>	2	1	1	1
	<i>N. clevelandii</i>	2	1	1	1

\*Síntomas de clorosis y manchas necróticas.

## DISCUSIÓN

El rango natural de hospedantes del *Poinsettia mosaic virus* se restringe a especies del género *Euphorbia*, particularmente a la especie *E. pulcherrima*. El virus se ha reportado en E.U.A., Canadá, Australia, Alemania, Inglaterra, Corea, Japón, Nueva Zelanda, Noruega y Venezuela infectando plantas comerciales de nochebuena (Fulton y Fulton, 1980; Koenig y Lesemann, 1980; Chiko, 1983; Lesemann et al., 1983; Guy, 1985; Bradel et al., 2000; Carballo et al., 2001; Chung et al., 2004; Lebas et al., 2007; Spetz et al., 2008; Okano et al., 2010). En esta investigación, los análisis serológico y molecular detectaron al PnMV en hojas de nochebuena de sol con síntomas de mosaico, recolectadas en los estados de Michoacán y Oaxaca. La secuencia de los productos de RT-PCR presentaron un porcentaje de similitud del 95-96% con los genomas reportados en Alemania (número de accesión AJ271595.1), Japón (número de accesión AB550788.1, AB550792.1, AB550791.1, AB550790.1 y

AB550789.1) y Noruega (número de accesión AM412237.1). Los resultados de RT-PCR también corroboraron la presencia del *Tobacco mosaic virus* en los materiales recolectados en el Estado de México y en Nayarit. Las secuencias de los productos de RT-PCR obtenidos abarcaron las regiones conservadas de los genes RdRp del género *Tobamovirus* (Gibbs et al., 1998) y se alinearon con dichas regiones en los genomas del TMV reportados en Ohio, E.U.A. (número de accesión FR878069.1) y Taiwán (número de accesión EF392659.1).

Debe señalarse que no se tiene la certeza que las plantas positivas a PnMV y/o TMV se hayan infectado en los sitios de muestreo, debido a que todos los materiales que se recolectaron se establecieron en las instalaciones del campo experimental del INIFAP para su posterior análisis serológico y molecular. Esto implica la próxima verificación de la presencia de los virus en plantas de nochebuena silvestre y semicultivada en los sitios de origen.

Aunque TMV infecta varias especies de plantas ornamentales como *Petunia hybrida* y *Eustoma grandiflorum*, entre otras, en las que induce síntomas de mosaico (Gera y Cohen, 1990; Alexandre et al., 2000), a la fecha no se tenía información en donde se reportara a la nochebuena como hospedante de este virus.

Las plantas indicadoras inoculadas con TMV o PnMV mostraron síntomas putativos a virus entre los 7 y 10 días después de haberlas infectado. Los síntomas se manifestaron como clorosis y manchas necróticas, pero no se corroboró la presencia de los virus mediante el análisis molecular, lo que sugiere que no se transmitieron. Sin embargo, debe mencionarse que dicho análisis se hizo únicamente con tejido foliar, y debido a que algunos virus presentan movimiento sistémico, se recomienda analizar las raíces de las plantas inoculadas para corroborar los resultados (Jung et al., 2002; Kelaniyangoda y Madhubashini, 2008).

Es probable que la falta de transmisión se haya debido a que las partículas se agregaron y precipitaron porque el pH y la fuerza iónica del medio de homogenización utilizado no fueron los adecuados (Kado, 1972). Para TMV se ha utilizado amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7,0 (Adkins et al., 2003) y para el PnMV amortiguador de fosfatos 0,03 M a pH 8,0 (Fulton y Fulton, 1980; Chiko, 1983; Spetz et al., 2008).

Es importante señalar que algunos factores intrínsecos a la planta y/o al virus probablemente también estén involucrados con la falta de transmisión. Es posible que la concentración del virus en la planta de nochebuena a partir de la cual se obtuvo el inóculo haya sido muy baja; que la etapa fenológica de la planta indicadora no haya sido la adecuada al momento de la inoculación; o que la presencia de algún metabolito secundario en la planta donadora y/o en las receptoras haya actuado como inhibidor de la infección. También debe considerarse que las condiciones ambientales presentes antes, durante y después de la inoculación pueden determinar el éxito de la transmisión, infección y manifestación de síntomas (Kado, 1972; Kelaniyangoda y Madhubashini, 2008).

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los análisis serológico y molecular en plantas silvestres y semicultivadas de nochebuena en México se informa (1) por primera vez la presencia del PnMV, y (2) al TMV como un nuevo patógeno en dichas plantas. Además, en base al análisis serológico, 11 de las plantas de nochebuena silvestre y semicultivada se encontraron coinfectadas con PnMV y TMV.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto MOR-2009-C02-120661 financiado por FOMIX CONACYT-MORELOS y al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304, del Colegio de Postgraduados, por el financiamiento para la realización de la presente investigación.

## REFERENCIAS

- Adkins, S., I. Kamenova, D. Achor y D.J. Lewandowski (2003). Biological and molecular characterization of a novel tobamovirus with a unique host range. *Plant Disease* 87: 1190-1196.
- Alexandre, M.A.V., R.M. Soares, E.B. Rivas, L.M.L. Duarte, C.M. Chagas, H. Saunal, M.H.V. Van Regenmortel y L.J. Richtzheim (2000). Characterization of a strain of *Tobacco mosaic virus* from *Petunia*. *Journal of Phytopathology* 148: 601-607.
- Bellardi, M.G. y A. Bertaccini (1989). Virus diseases of ornamental shrubs. III. Angular mosaic of *Euphorbia fulgens*. *Phytopathologia Mediterranea* 28: 79-82.
- Bradel, B.G., W. Preil y H. Jeske (2000). Sequence Analysis and Genome Organization of *Poinsettia Mosaic Virus* (PnMV) Reveal Closer Relationship to Marafiviruses than to Tymoviruses. *Virology* 271: 289-297.
- Carballo, O., M.L. Izaguirre y E. Marys (2001). Detection of *Poinsettia mosaic virus* infecting *Poinsettias* (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease* 85: 1208.
- Chiko, A.W. (1983). *Poinsettia mosaic virus* in British Columbia. *Plant Disease* 67: 427-428.
- Chung, B.N., E.K. Lee, M.I. Jeong y H.R. Kim (2004). First report on *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20: 220-223.
- Dovas, C.I., K. Efthimiou y N.I. Katis (2004). Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. *Journal of Virological Methods* 117: 137-144.
- Ecke, P.Jr., O.A. Matkin y D.E. Hartley (1990). The poinsettia manual. 3<sup>rd</sup> Edition. Paul Ecke Poinsettia. Encinitas, California, USA. 267 p.
- Fulton, R.W. y J.L. Fulton (1980). Characterization of a tymolike virus common in *Poinsettia*. *Phytopathology* 70: 321-324.
- Gera, A. y J. Cohen (1990). The natural occurrence of *Bean yellow mosaic*, *Cucumber mosaic* and *Tobacco mosaic viruses* in *lisianthus* in Israel. *Plant Pathology* 39:561-564.

- Gibbs, A., J. Armstrong, A.M. Mackenzie y G.F. Weiller (1998). The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridization-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *Journal of Virological Methods* 74: 67-76.
- Guy, P. (1985). New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *Australasian Plant Pathology* 14: 12-13.
- Harris, A. (2002). Nepoviruses and their diagnosis in plants: a novel Polymerase chain reaction diagnostic test for Nepoviruses in nursery stock. Biosecurity Australia. 110 p.
- Jung, H.W., W.S. Yun, Y.I. Hahm y K.H. Kim (2002). Characterization of *Tobacco mosaic virus* isolated from potato showing yellow leaf mosaic and stunting symptoms in Korea. *Plant Disease* 86: 112-117.
- Kado, C.I. (1972). Mechanical and biological inoculation principles. En: Kado, C. I. y H. O. Agrawal (eds), pp. 3-31. Principles and Techniques in Plant Virology. Van Nostrand Reinhold Company, New York, U.S.A. 688 p.
- Kelaniyangoda, D.B. y L.W.M. Madhubashini (2008). Indicator plants: Tools for detecting *Papaya Ring spot potyvirus* and *Cucumber mosaic cucumovirus*. *Journal of Food and Agriculture* 1: 64-69.
- Koenig, R. y D.E. Lesemann (1980). Two isometric viruses in poinsettias. *Plant Disease* 64: 782-784.
- Lebas, B.S.M., F.M. Ochoa-Corona, D.R. Elliott, J.Z. Tang y B.J.R. Alexander (2007). Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *Plant Disease* 91: 110.
- Lesemann, D.E., R. Koenig, W. Huth, A.A. Brunt, S. Phillips y R.J. Barton (1983). Poinsettia mosaic virus: A tymovirus? *Phytopathology* 107: 250-262.
- Ma, X.Y., J.H. Cai, G.X. Li, B.X. Qin y X.P. Zhou (2004). Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal Phytopathology* 152: 215-218.
- Okano, Y., K. Maejima, T. Shiraishi, M. Hashimoto, H. Senshu, J. Ozeki, S. Takahashi, K. Komatsu, Y. Yamaji y S. Namba (2010). Genetic heterogeneity found in the replicase gene of *Poinsettia mosaic virus* isolates. *Archives of Virology* 155: 1367-1370.
- Spetz, C., R. Moe y D.G. Blystad (2008). Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of *Poinsettia mosaic virus*. *Archives of Virology* 153: 1347-1351.
- Sutula, C.L., J.M. Gillett, S.M. Morrissey y D.C. Ramsdell (1986). Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70: 722-726.