

ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 33, NÚMERO 2, 2015



Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena

Search for sources of resistance to *Poinsettia mosaic virus* in wild poinsettia plants

Omar Jacobo Villegas, ***Guadalupe Valdovinos Ponce**, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Texcoco, Estado de México C.P. 56230, **Sergio Ramírez Rojas**, 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 y **Camilo Hernández Juárez**, Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México C.P. 56230. *Correspondencia: gvapon@colpos.mx.

Recibido: Abril 01, 2015.

Aceptado: Junio 28, 2015.

Jacobo-Villegas O, Valdovinos-Ponce G, Ramírez-Rojas S y Hernández-Juárez C. 2015. Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 219-231.

Resumen. La nochebuena, como especie mejorada, es una de las plantas ornamentales de mayor importancia comercial a nivel mundial. En el 2013, el valor de su producción en México fue superior a los 416 millones de pesos; sin embargo, esta cifra puede reducirse debido a la presencia del PnMV, el cual está reportado en algunos países de América, Asia y Europa causando alteraciones foliares que demeritan su comercialización. Considerando que México importa las variedades mejoradas de nochebuena para su producción y comercialización, y que estas variedades se originaron a partir de las plantas silvestres que Robert Poinsett obtuvo del país y envió a Estados Unidos, el objetivo de esta investigación fue buscar una fuente de resistencia al virus en plantas silvestres de nochebuena. Se recolectaron plantas silvestres de nochebuena

Abstract. Poinsettia, as an improved species, is one of the most economically important ornamental plants worldwide. In 2013, the value of poinsettia production in Mexico was higher than 416 million pesos; however, this amount can be reduced by PnMV, which has been reported in some countries of the Americas, Asia and Europe inducing symptoms that affect its marketing. Taking into account that Mexico imports improved varieties of poinsettia for production and marketing, and that these varieties were developed originally from wild plants collected by Robert Poinsett in Mexico and sent them to USA, the objective of this research was to search for a virus resistant source in wild poinsettia plants. Symptomless wild poinsettia plants and plants with symptoms associated with virus were collected in four states of Mexico. DAS-ELISA and RT-PCR were done in order to determine the virus presence as well as mechanical and graft inoculations. Results showed that the wild poinsettia plants are non-hosts for PnMV, so they may be a source of resistance to this virus. This is the first report of PnMV in improved poinsettia plants in Mexico.

asintomáticas y con síntomas asociados a virus en cuatro estados de la República Mexicana. Se realizó DAS-ELISA y RT-PCR para determinar la presencia del virus, así como inoculaciones mecánicas y por injerto. Los resultados indicaron que las plantas silvestres de nochebuena no son hospedantes del PnMV, por lo que podrían representar una fuente de resistencia para este patógeno. Este es el primer reporte en México del PnMV en plantas mejoradas de nochebuena.

Palabras clave: *Euphorbia pulcherrima*, resistencia, virus.

En México, la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) se cultiva en traspatios y jardines, como especie mejorada y se encuentra en estado silvestre desde el noroeste de México hasta el sur de Guatemala (Trejo *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014). Las plantas de nochebuena que se cultivan en jardines y traspatios reciben el nombre de “nochebuena de sol”; se utilizan como plantas medicinales, flor de corte y para adornar espacios públicos (Colinas, 2009; Canul *et al.*, 2014). No se tienen datos oficiales sobre la superficie cultivada con “nochebuena de sol”. En el 2010, en el estado de Morelos, se cultivaron alrededor de 20,000 m² con mercado a nivel regional, estatal y nacional, y sin contrato para su comercialización (Galindo *et al.*, 2012).

En contraste, la nochebuena, como especie mejorada (de aquí en adelante nombrada como nochebuena comercial), es una de las plantas ornamentales de mayor importancia a nivel mundial. De acuerdo con los registros de la producción de cultivos florícolas de Estados Unidos de América, su venta en el 2013 fue de 146 millones de dólares (USDA, 2014). En este mismo año, el valor de la producción en México fue superior a los 416 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

Key words: *Euphorbia pulcherrima*, resistance, virus.

In Mexico, poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) is cultivated in backyards and gardens, as an improved species, and is located as a wild plant from Northwestern Mexico to the South of Guatemala (Trejo *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014). Poinsettia plants cultivated in gardens and backyards are known as “nochebuena de sol”; they are used as medicinal and cut flowers plants, and for decorating public spaces (Colinas, 2009; Canul *et al.*, 2014). There are no official data about the cultivated area with “nochebuena de sol”; in 2010, in the state of Morelos, they were cultivated around of 20,000 m² for regional, state and national markets, and without trade agreements (Galindo *et al.*, 2012).

In contrast, poinsettia, as an improved species (hereinafter referred as commercial poinsettias), is one of the most important ornamental plants worldwide. According to the United States of America flower production records, poinsettia sales in 2013 were \$146 million dollars (USDA, 2014). In the same year, the production value in Mexico was over \$416 million pesos (SAGARPA, 2014).

Wild poinsettia plants have been under a constant selection pressure, so they have developed some traits that add value as a genetic resource (SINAREFI, 2010) with potential for research and marketing. Therefore, it is necessary to protect and incorporate this species to genetic improvement programs (Canul *et al.*, 2010). In this regard, INIFAP at the Zacatepec Experimental Field is developing a genetic improvement program for “nochebuena de sol” and wild poinsettia plants, aimed to obtain Mexican varieties with commercial and phytosanitary features that benefit farmers.

Commercial poinsettias are regular hosts for both *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) and *Poinsettia*

La nochebuena silvestre ha estado bajo una constante presión de selección, por lo que ha desarrollado caracteres que le confieren valor como recurso fitogenético (SINAREFI, 2010) con potencial para investigación y comercialización, por lo que es necesario conservarla e incorporarla a programas de mejoramiento genético (Canul *et al.*, 2010). En este sentido, el INIFAP del Campo Experimental Zacatepec está desarrollando un programa de mejoramiento genético de plantas de “nochebuena de sol” y silvestres con la finalidad de obtener variedades mexicanas con atributos comerciales y fitosanitarios que beneficien a los productores.

La nochebuena comercial es hospedante regular del *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) y del *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005). A la fecha no se han reportado síntomas en plantas infectadas con el PnLV (aus dem Siepen *et al.*, 2005), pero el PnMV induce distorsión de brácteas, mosaico y moteado foliar, causando pérdidas importantes en la comercialización (Lebas, 2007).

En México, el estudio de virus fitopatógenos en plantas de “nochebuena de sol” y silvestres es reciente. Se tienen dos reportes en donde se asocia la presencia de estos patógenos con síntomas de clorosis, mosaico, variegado y deformación foliar. En el 2012, en un diagnóstico preliminar con inmuno-tiras, se detectaron al *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). La presencia del CMV y TMV se corroboró posteriormente con la prueba DAS-ELISA (Ocampo, 2012). En el 2013, se detectó mediante DAS-ELISA al TMV en plantas de “nochebuena de sol” que se recolectaron en Morelos, Guerrero, Distrito Federal, Michoacán, Estado de México, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Nayarit. La presencia de este virus se corroboró con RT-PCR en las plantas del Estado de México y Nayarit. También se determinó la presencia del PnMV en plantas de “nochebuena de sol” de Michoacán,

latent virus (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005). Even though no symptoms have been reported on plants infected by PnLV (aus dem Siepen *et al.*, 2005) so far, it is known that PnMV induces bracts distortion, mosaic and leaf mottling, which cause important marketing losses (Lebas, 2007).

In Mexico, research about phytopathogenic virus in “nochebuena de sol” and wild poinsettia plants is recent. There are two reports where the presence of such pathogens was associated with symptoms of chlorosis, mosaic, variegation and leaf deformation. In 2012, results of a preliminary test using immune strips showed the presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). The presence of CMV and TMV was later confirmed using DAS-ELISA (Ocampo, 2012). In 2013, TMV was detected using DAS-ELISA in “nochebuena de sol” plants collected in Morelos, Guerrero, Mexico City, Michoacán, State of Mexico, Puebla, Veracruz, Oaxaca and Nayarit. The presence of this virus was confirmed by RT-PCR in plants collected in the State of Mexico and Nayarit. PnMV was also detected in “nochebuena de sol” plants collected in Michoacán, State of Mexico, Veracruz and Oaxaca; these results were further confirmed by RT-PCR only in plants collected in Michoacán and Oaxaca (Ocampo *et al.*, 2013). In wild poinsettia plants collected in Morelos, Guerrero and Nayarit, the presence of TMV was only detected by DAS-ELISA (Ocampo, 2012).

Considering that Mexico imports commercial varieties of poinsettia for their production and commerce, that these varieties were developed from wild plants collected in Mexico, and that PnMV is one of the causes of economic losses in the production of this ornamental plant, the objective of this research was to search for a source of resistance to PnMV in wild poinsettia plants.

Estado de México, Veracruz y Oaxaca; ratificando el resultado con RT-PCR solamente en las plantas que se recolectaron en Michoacán y Oaxaca (Ocampo *et al.*, 2013). En plantas silvestres de nochebuena recolectadas en los estados de Morelos, Guerrero y Nayarit, solo se determinó la presencia del TMV con la prueba DAS-ELISA (Ocampo, 2012).

Considerando que México importa las variedades comerciales de nochebuena para su producción y comercialización, que estas variedades se originaron a partir de plantas silvestres que se colectaron en México, y que el PnMV es una de las causas de pérdidas económicas en la producción de esta ornamental, el objetivo de esta investigación fue buscar una fuente de resistencia al PnMV en plantas silvestres de nochebuena.

En 2013 y 2014 se recolectaron plantas silvestres de nochebuena asintomáticas y con síntomas asociados a virus en los municipios de Jiutepec, Morelos (10 plantas); Tehuilotepec, Guerrero (9 plantas); Xilitla, San Luis Potosí (2 plantas) y en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), en el Estado de México (11 plantas). Además se consiguieron plantas de nochebuena (como especie mejorada) de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” en la empresa “Vivero Internacional” ubicada en el estado de Morelos. A partir de dos de las nueve plantas recolectadas en Tehuilotepec y las dos obtenidas de Xilitla, se obtuvieron esquejes que se establecieron en un cubículo aislado del invernadero de virus fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

La detección del PnMV se realizó serológicamente con la prueba DAS-ELISA en hojas tiernas y raíces de todas las plantas que se recolectaron en Jiutepec y Tehuilotepec, y solamente se analizó el tejido foliar de las plantas obtenidas del invernadero de la UACH y de las plantas de nochebuena

In 2013 and 2014, wild poinsettia plants with virus-associated symptoms and symptomless were collected in Jiutepec, Morelos (10 plants); Tehuilotepec, Guerrero (9 plants); Xilitla, San Luis Potosí (2 plants), and in a greenhouse at the Chapingo Autonomous University (UACH) in the State of Mexico (11 plants). Likewise, “Freedom” and “Red Prestige” commercial poinsettia plants were got at the “Vivero Internacional” company located in Morelos state. Shoots from two out of the nine plants collected in Tehuilotepec and two from Xilitla were placed into an isolated room in the virus greenhouse of the UACH Agricultural Parasitology Department.

The PnMV was detected using DAS-ELISA in young leaves and roots of all the plants collected in Jiutepec and Tehuilotepec, and only foliar tissue from the UACH greenhouse and commercial plants (5 “Freedom” and 4 “Red Prestige” plants) was analyzed. The detection protocol was carried out following the manufacturer instructions (Reagent Set SRA 90700/0096 Agdia®). Absorbance values were measured after 60 min of incubation in an ELISA micro-plates reader (Multiskan EX, Labsystems) at 405 nm. Samples were considered positive when their absorbance values exceeded the average of the negative controls multiplied by 2 (García *et al.*, 2014).

RNA was isolated from 100 mg of leaf tissue of all the samples with the commercial Kit ZR Plant RNA MiniPrep™ (R2024 Zymo Research) by following the manufacturer protocol. In order to verify that there were no inhibitors in the ARN samples, one segment of the 18S gen was amplified using the specific primers 18SF (5'-ACG GAT CGC ACG GCC TTC GT -3) and 18SR (5'-ACC AGA CTT GCC CTC CAA TGG -3) (Zamboni *et al.*, 2008). A partial amplification of PnMV was done with PnMV-F (5'-GTG CCA GCC GCC GTT CTT CT-3') and PnMV-R primers (5'-TGA GCC GGC

comercial (5 de la variedad “Freedom” y 4 de “Red Prestige”. El protocolo de detección se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante (Reagent Set SRA 90700/0096 Agdia®). Los valores de absorbancia se midieron a los 60 minutos de incubación en un lector de micro-placas de ELISA (Multiskan EX, Labsystems) a 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que tuvieron valores de absorbancia mayores al promedio de los controles negativos multiplicado por dos (García *et al.*, 2014).

El ARN se aisló a partir de 100 mg de tejido foliar de todas las muestras con el Kit comercial ZR Plant RNA MiniPrep™ (R2024 Zymo Research) considerando el protocolo del fabricante. Para descartar la presencia de inhibidores, se amplificó un segmento del gen 18S con los iniciadores específicos 18SF (5'-ACG GAT CGC ACG GCC TTC GT -3) y 18SR (5'-ACC AGA CTT GCC CTC CAA TGG -3) (Zamboni *et al.*, 2008). La amplificación parcial del PnMV se realizó con los iniciadores PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGCTTCT-3') y PnMV-R (5'-TGAGCCGGCGACTCCATCCA-3') (Ocampo *et al.*, 2013). El control positivo se obtuvo de plantas comerciales de nochebuena variedad “Red Prestige” mantenidas en el invernadero de virus de la UACH. El control negativo consistió en la mezcla de reacción sin el ADN complementario. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5% p/v a 100 V durante 80 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador (Vilber Lourmat, Quantum), se purificaron con el Kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega®, siguiendo el protocolo del fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para los ensayos de transmisión, el PnMV se inoculó independientemente y de manera mecánica en cuatro plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Tehuiltepec y

GAC TCC ATC CA-3') (Ocampo *et al.*, 2013). The positive control was gotten from poinsettia commercial plants of the “Red Prestige” variety, which were kept in the UACH virus greenhouse. The negative control was the reaction mix without the complementary ADN. PCR products were resolved in an 1.5 % w/v agarose gel at 100 V for 80 min. Amplicons were visualized with an UV transilluminator (Vilber Lourmat, Quantum), purified using the commercial Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System from Promega® following the manufacturer protocol, and sent for sequencing to the UNAM Biotechnology Institute.

For transmission assays, PnMV was individually and mechanically inoculated in four wild poinsettia plants obtained from the stalks collected in Tehuiltepec and Xilitla, and from 10 species of indicator plants (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. virginia*, *N. rustica*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* and *Ch. quinoa*). The inoculum source was obtained from the “Red Prestige” and “Freedom” commercial varieties that showed the highest virus concentration, according to the serological results. Briefly, three to five young leaves were sprinkled with 600-mesh carborundum and rubbed individually with a sterile cotton swab previously dipped in the inoculum. For a negative control, carborundum was applied on the surface of the leaves, then they were rubbed with a sterile cotton swab dipped into a pH 7.4 phosphate + diethyldithiocarbamate acid (DIECA) buffer.

Furthermore, young shoots of “Red Prestige” and “Freedom” plants that were PnMV positives by DAS-ELISA were grafted on three wild poinsettia plants obtained from stalks collected in Tehuiltepec, which were PnMV negative according to DAS-ELISA test. Each plant was cut obliquely; grafts were cut like a wedge shaped and inserted

Xilitla, y en 10 especies de plantas indicadoras (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. virginia*, *N. rustica*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*). La fuente de inóculo se obtuvo de las plantas de nochebuena comercial “Red Prestige” y “Freedom” que presentaron la mayor concentración del virus según los resultados serológicos obtenidos. Brevemente, tres a cinco hojas jóvenes de las plantas se espolvorearon con carborundum de 600 mallas y se frotaron de manera independiente con un hisopo estéril previamente humedecido con el inóculo. Como control negativo se aplicó carborundum en la superficie de las hojas y se frotaron con un hisopo estéril humedecido con amortiguador de fosfatos + ácido dietilditiocarbámico (DIECA) pH. 7.4.

Adicionalmente, brotes tiernos de las variedades “Red Prestige” y “Freedom” que fueron positivos al PnMV con DAS-ELISA, se injertaron en tres plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Tehuilotepec y que fueron negativas al PnMV, según los resultados DAS-ELISA. A cada planta silvestre se le hicieron dos incisiones oblicuas; los injertos se cortaron en forma de cuña y se insertaron en las incisiones hechas en las plantas silvestres, de acuerdo con la metodología de Jayasinghe y Chuquillanqui (1992). Las plantas se mantuvieron en observación en un cubículo aislado del invernadero de virus de la UACH. Como control negativo se utilizaron dos plantas de nochebuena silvestre, una como injerto (brotes nuevos) y otra como portainjerto (plantas generadas a partir de las estacas recolectadas en Guerrero y San Luis Potosí).

Solamente en algunas de las plantas silvestres de nochebuena que se recolectaron en Jiutepec y en el invernadero de la UACH se observaron síntomas de moteado, deformación foliar, mosaico y manchas anulares (Figura 1). El moteado y la deformación de

into the cuts made on the wild poinsettia plants, according to Jayasinghe and Chuquillanqui (1992) methodology. Plants were kept under observation in the UACH virus greenhouse. Two wild poinsettia plants were used as negative control controls, one as a graft (young shoots) and another as a rootstock (plants developed from stalks collected in Guerrero and San Luis Potosí).

Only some of the wild poinsettia plants collected in Jiutepec and in the UACH greenhouse showed chlorosis, leaf deformation, mosaic and ring spots symptoms (Figure 1). Mottling and leaf deformation matched with symptoms induced by PnMV on poinsettia commercial plants grown in commercial nurseries in Venezuela (Carballo *et al.*, 2001) a New Zealand (Lebas *et al.*, 2007); however, the serological and molecular tests done in this research did not detect the virus. The 32 wild poinsettia plants were negative for the antiserum assessed. In general, the average absorbance of the leaf samples was 0.113 (Table 1); while root tissue assessed from the same plants collected in Tehuilotepec and Jiutepec, as well as one of the wild poinsettia plant from UACH green house, was 0.134 (Table 2). These results did not either match with those reported by Ocampo *et al.* (2013) in “nochebuena de sol” plants collected in Michoacán and Oaxaca, where the ELISA test showed that only 4 out of 28 plants with chlorosis, mosaic, variegation, leaf deformation and white spots symptoms were positive for PnMV. These symptoms, expressed after the plants were established at the INIFAP facilities (Zacatepec Experiment Field) from the twigs collected in the indicated sites, do not match with those induced by PnMV in commercial poinsettia plants, and they could be caused by insects. However, the fact that PnMV had been detected in the sap suggests that these samples became contaminated with the positive controls or that the infection caused by

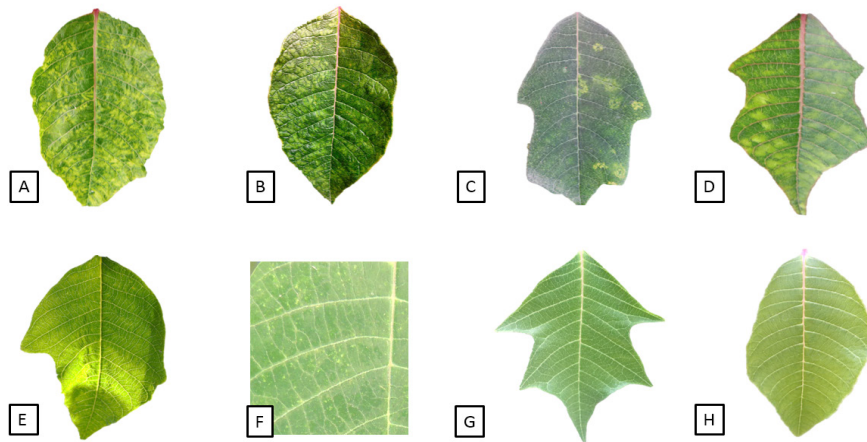


Figura 1. Hojas de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) con síntomas de posible origen viral. Hojas de plantas mantenidas en el invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo. Mosaico (A y B), manchas anulares (C) y moteado (D). Hojas de plantas recolectadas en Jiutepec, Morelos. Deformación (E) y puntos cloróticos (F). Hojas asintomáticas de plantas recolectadas en Tehuilotepec, Guerrero (G) y en Xilitla, San Luis Potosí (H).

Figure 1. Leaves of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*) showing possible viral symptoms. Plant leaves kept in Chapingo Autonomous University's greenhouse. Mosaic (A y B), ringspots (C) and mottling (D). Leaves of plants collected in Jiutepec, Morelos. Deformation (E) and chlorotic spots (F). Asymptomatic leaves of plants collected in Tehuilotepec, Guerrero (G) and in Xilitla, San Luis Potosí (H).

hojas coincide con los síntomas inducidos por el PnMV en plantas de nochebuena comercial producidas en viveros comerciales de Venezuela (Carballo *et al.*, 2001) y Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), pero los análisis serológico y molecular que se realizaron en la presente investigación no detectaron al virus. Las 32 plantas silvestres de nochebuena dieron reacción negativa al antisuero evaluado. En general, la absorbancia promedio de las muestras foliares fue de 0.113 (Cuadro 1); mientras que el tejido radical, que se evaluó de las mismas plantas recolectadas en Tehuilotepec y Jiutepec, y en una de las plantas silvestres de nochebuena del invernadero de la UACH, fue de 0.134 (Cuadro 2). Estos resultados tampoco concuerdan con lo reportado por Ocampo *et al.* (2013) en plantas de “nochebuena de sol” recolectadas en Michoacán y Oaxaca; en donde el análisis serológico por ELISA indicó que solamente 4 de 28 plantas con síntomas de clorosis, mosaico, variegado, deformación foliar

this virus is latent. If the infections are latent, it is possible that the symptomless wild poinsettia plants collected in Tehuilotepec, Jiutepec, and those developed from the twigs collected in Xilitla may provide a source of resistance to PnMV. However, as it was mentioned previously, in all these plants the DAS-ELISA test did not detect the virus, and the specific primers only amplified the expected band in the positive controls (“Freedom”). The 18S ribosomal primers retrotranscribed the expected RNA fragment that was isolated from the 32 wild poinsettia plants, showing a 99 % of similarity with the sequence recorded in the GenBank (EU326598.1) (data not shown). This suggests that the quality of the nucleic acid was good and that there were no reverse transcription inhibitors.

In improved poinsettia plants, PnMV cannot induce symptoms or it is able to cause foliar mottled, and leaf and bract distortion (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). The “Freedom” and “Red

Cuadro 1. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido foliar de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).

Table 1. Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for leaf tissue of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*).

Número de planta	Sitio de muestreo	Repeticiones		Promedio	Resultado
		I	II		
1	Tehuilotepc	0.109	0.109	0.109	-
2		0.114	0.118	0.116	-
3		0.119	0.126	0.123	-
4		0.112	0.101	0.107	-
5		0.109	0.104	0.107	-
6		0.108	0.107	0.108	-
7		0.120	0.110	0.115	-
8		0.124	0.112	0.118	-
9		0.192	0.190	0.191	-
1	Jiutepec	0.107	0.109	0.108	-
2		0.102	0.117	0.110	-
3		0.100	0.107	0.104	-
4		0.101	0.111	0.106	-
5		0.107	0.108	0.108	-
6		0.105	0.117	0.111	-
7		0.104	0.115	0.110	-
8		0.114	0.107	0.111	-
9		0.114	0.111	0.113	-
10		0.115	0.114	0.115	-
1	Xilitla	0.114	0.118	0.116	-
2		0.111	0.210	0.161	-
1	UACH	0.107	0.103	0.107	-
2		0.102	0.104	0.102	-
3		0.103	0.107	0.103	-
4		0.101	0.103	0.101	-
5		0.106	0.106	0.106	-
6		0.106	0.280	0.106	-
7		0.107	0.118	0.107	-
8		0.104	0.107	0.104	-
9		0.108	0.110	0.108	-
10		0.116	0.116	0.116	-
11		0.105	0.106	0.105	-
Promedio				0.113	
Control -	<i>N. benthamiana</i>	0.113	0.108	0.110	-
Control +	Agdia®	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

y manchas blancas fueron positivas al PnMV. Estos síntomas, que se expresaron después de que las plantas se habían establecido en instalaciones del INIFAP (Campo Experimental Zacatepec) a partir de varetas recolectadas en las entidades señadas, no

Prestige” poinsettia used in this research showed mosaic and were positive for PnMV according to ELISA (Table 3) and RT-PCR results. In order to determine if the wild poinsettia plants were or not hosts for the virus, the foliar sap from “Freedom”

Cuadro 2. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido radical de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).**Table 2.** Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for root tissue of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*).

Número de planta	Sitio de muestreo	Repeticiones		Promedio	Resultado
		I	II		
1	Tehuilotepic	0.110	0.194	0.152	-
2		0.102	0.106	0.104	-
3		0.103	0.102	0.103	-
4		0.193	0.187	0.190	-
5		0.195	0.194	0.195	-
6		0.128	0.190	0.159	-
7		0.199	0.116	0.158	-
8		0.194	0.150	0.172	-
9		0.189	0.198	0.194	-
1	Jiutepec	0.107	0.105	0.106	-
2		0.111	0.106	0.109	-
3		0.106	0.114	0.110	-
4		0.113	0.116	0.115	-
5		0.103	0.117	0.110	-
6		0.115	0.120	0.118	-
7		0.109	0.118	0.114	-
8		0.106	0.119	0.113	-
9		0.111	0.112	0.112	-
10	UACH	0.116	0.116	0.116	-
11		0.180	0.102	0.141	-
Promedio				0.1345	-
Control -	<i>N. benthamiana</i>	0.113	0.108	0.1105	-
Control +	Agdia®	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

coinciden con los inducidos por el PnMV en plantas comerciales de nochebuena y pudieron haber sido causados por insectos. Sin embargo, el hecho de que en la savia se haya detectado al PnMV sugiere que pudo haber ocurrido contaminación con los controles positivos o que las infecciones causadas por este virus son latentes. En caso de que las infecciones sean latentes, es posible que las plantas silvestres de nochebuena asintomáticas que se recolectaron en Tehuilotepic, Jiutepec y aquellas que se desarrollaron a partir de varetas recolectadas en Xilitla puedan constituir una fuente de resistencia

plants that were PnMV positives by DAS-ELISA was mechanically inoculated on wild poinsettia leaves, but no symptoms were evident and the virus was not detected with the used techniques, nor it was defined if the grafts from the “Freedom” and “Red Prestige” varieties transmitted PnMV to the wild poinsettia plants because of graft abortion.

It is possible that the luminosity and temperature conditions during the transmission assays, that the biological features of the donor and recipient plants (phenological stage of development, nutrition) and/or that the characteristics of the buffer used

al PnMV, no obstante, como se indicó anteriormente, en todas estas plantas no se detectó al virus por DAS-ELISA y los iniciadores específicos solo amplificaron la banda esperada en los controles positivos (“Freedom”). Los iniciadores para el segmento del gen 18S ribosomal retrotranscribieron el fragmento esperado en el ARN que se aisló de las 32 plantas silvestres de nochebuena mostrando un 99 % de similaridad con la secuencia registrada en el Gen Bank (EU326598.1) (datos no mostrados), lo que indica que la calidad del ácido nucleico es buena y que no hubo inhibidores para la retrotranscripción.

En plantas mejoradas de nochebuena, el PnMV puede no inducir síntomas o bien causar moteado foliar y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). Las plantas comerciales de nochebuena “Freedom” y “Red Prestige” que se utilizaron en la presente investigación presentaron mosaicos y fueron positivas al PnMV según los resultados de ELISA (Cuadro 3) y RT-PCR. Para

to prepare the inoculum (associated with the virus stability and pathogenicity) have inhibited or prevented the mechanical and graft transmission of PnMV to wild poinsettias plants. However, it is also likely that the wild poinsettia are non-host plants for the virus, so they could be considered as a source of resistance to further development of Mexican varieties that can be integrated into an improvement genetic system to enhance their commercial features.

There was no transmission of PnMV to the indicator plants evaluated. *N. benthamiana*, which is one of the plants that has been infected with this virus (Lebas *et al.*, 2007), showed small necrotic spots (Figure 2 E) that rather than viral symptoms look like mechanical damages caused during inoculation; however, control treatment leaves did not develop these symptoms. *N. rustica*, *N. occidentalis* and *N. virginia* leaves developed chlorotic spots (Figure 2 A, C, G, I), but further serological and molecular tests did not detect the virus.

Cuadro 3. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido foliar de dos variedades comerciales de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).

Table 3. Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for leaf tissue of two poinsettia commercial varieties (*Euphorbia pulcherrima*).

Número de planta	Variedad	Repeticiones		Promedio	Resultado
		I	II		
1	“Freedom”	1.160	1.160	1.160	+
2		0.344	0.368	0.356	+
3		0.534	0.628	0.581	+
4		0.451	0.558	0.505	+
5		0.446	0.450	0.448	+
	Promedio			0.610	
1	“Red Prestige”	0.246	0.234	0.240	+
2		0.408	0.416	0.412	+
3		0.235	0.221	0.228	+
4		0.275	0.253	0.264	+
	Promedio			0.286	
Control -	<i>N. benthamiana</i>	0.113	0.108	0.110	-
Control +	Agdia®	1.280	1.232	1.256	+

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

determinar si las plantas silvestres de nochebuena son o no hospedantes del virus, la savia de las hojas de la var. “Freedom”, en donde previamente se detectó al virus mediante DAS-ELISA, se inoculó mecánicamente en las hojas de plantas silvestres, pero no hubo expresión de síntomas y el virus no se detectó con las técnicas utilizadas. Tampoco se determinó si los injertos de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” transmitieron al PnMV a las plantas de nochebuena silvestre debido a que los injertos abortaron.

Es posible que las condiciones de luminosidad y temperatura que se presentaron durante los ensayos de transmisión, que las características biológicas de la planta donante y receptora (etapa fenológica de desarrollo, nutrición) y/o que las características de los amortiguadores que se utilizaron para preparar el inóculo (relacionadas con la estabilidad e infectividad del virus) hayan inhibido o evitado la transmisión mecánica y por injerto del PnMV a plantas silvestres de nochebuena; sin embargo, también es probable que la nochebuena silvestre no sea hospedante de este virus, de tal manera que podría considerarse como fuente de resistencia para la generación de variedades mexicanas que puedan entrar a un sistema de mejoramiento genético que favorezca sus características comerciales.

No hubo transmisión del PnMV a las plantas indicadoras que se evaluaron. En *N. benthamiana*, que es una de las plantas en donde se ha logrado la transmisión del virus (Lebas *et al.*, 2007), se presentaron pequeños puntos necróticos (Figura 2 E), que más que un síntoma de origen viral pudiera tratarse de un daño mecánico generado durante la inoculación, aunque en las hojas del tratamiento testigo no se desarrollaron. En las hojas de *N. rustica*, *N. occidentalis* y en *N. virginia* hubo moteado clorótico (Figura 2 A,C,G, I), pero los análisis serológico y molecular no detectaron al virus.

In contrast with the results from wild poinsettia plants, the commercial plants were positive for PnMV, according to RT-PCR and DAS-ELISA results. The partial sequence of the virus was 92 % similar to the AB550791.1 sequence reported by GenBank (data not shown); and the plants had an average absorbance of 0.610 (“Freedom”) and 0.286 (“Red Prestige”), which were higher than the detection limit value (0.221) (Table 3). As previously stated, commercial poinsettia plants infected with this virus can be symptomless or develop chlorosis, and leaf and bract distortion (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). PnMV is a worldwide-spread pathogen. It has been reported in Australia (Spetz *et al.*, 2008), Korea (Chung *et al.* 2004), Denmark (Bech, 1996), New Zealand (Lebas *et al.*, 2007), Venezuela (Carballo *et al.*, 2001), among other countries. In Mexico, this is the first time that the virus is reported in the poinsettia commercial plants that were evaluated.

CONCLUSIONS

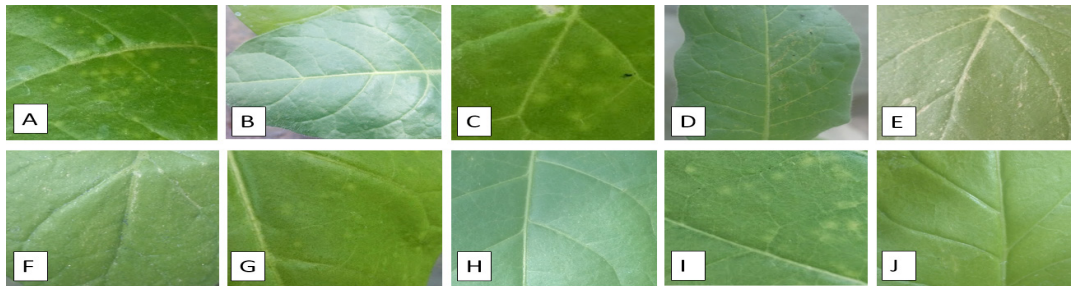
Wild poinsettia plants can be a source of resistance to PnMV. This is the first report in Mexico of PnMV in “Freedom” and “Red Prestige” commercial poinsettia varieties.

Acknowledgements

Thanks CONACyT and the Colegio de Postgraduados 167304 (2013)Trust for their financial support.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

En contraste con los resultados observados en las plantas de nochebuena silvestre, las plantas comerciales fueron positivas al PnMV según



**Figura 2.** Hojas de *N. rustica* (A y B), *N. occidentales* (C y D), *N. benthamiana* (E y F), *N. tabacum* cv. *Xanthi* (G y H) y *N. virginia* (I y J) a los 34 días después de haberse inoculado con el virus PnMV. En todas las plantas se desarrollaron moteados cloróticos, a excepción de *N. benthamiana* en donde se presentaron pequeños puntos necróticos. B, D, F, H y J corresponden a hojas de controles negativos.

**Figure 2.** Leaves of *N. rustica* (A y B), *N. occidentales* (C and D), *N. benthamiana* (E and F), *N. tabacum* cv. *Xanthi* (G y H) and *N. virginia* (I and J) 34 days after inoculation with PnMV. All plants developed chlorotic mottling, except for *N. benthamiana*, which showed small necrotic spots. B, D, F, H and J correspond to the negative control leaves.

los resultados de RT-PCR y DAS-ELISA. La secuencia parcial del virus fue 92 % similar con la secuencia AB550791.1 reportada en el GenBank (datos no mostrados); y las plantas tuvieron una absorbancia promedio de 0.610 (“Freedom”) y 0.286 (“Red Prestige”), superiores al límite de detección (0.221) (Cuadro 3). Como se indicó anteriormente, la nochebuena comercial infectada con este virus puede ser asintomática o desarrollar moteado y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). El PnMV es un patógeno cosmopolita; está reportado en Australia (Spetz *et al.*, 2008), en Corea (Chung *et al.* 2004), Dinamarca (Bech, 1996), Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), Venezuela (Carballo *et al.*, 2001), entre otros países. En México, éste es el primer reporte del virus en las plantas comerciales de nochebuena que se evaluaron.

## CONCLUSIONES

Las plantas silvestres de nochebuena pueden ser una fuente de resistencia para el PnMV. Este es el primer reporte en México del PnMV en plantas

comerciales de nochebuena variedades “Freedom” y “Red Prestige”.

## Agradecimientos

Agradecemos al CONACyT y al Fideicomiso No. 167304 (2013) del Colegio de Postgraduados por el soporte financiero.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- aus dem Siepen M, Pohl JO, Koo BJ, Wege C and Jeske H. 2005. Poinsettia latent virus is not a cryptic virus, but a natural poleovirus-sobemovirus hybrid. *Virology* 336: 240-250.
- Bech K. 1996. Methods to eliminate Poinsettia mosaic virus in *Euphorbia pulcherrima* and reinfection by different methods to reveal the nature of the branching factor. *International Society for Horticultural Science (ISHS). Phytoparasitica* 24: 346.
- Canul KJ, García PF, Ramírez RS, Osuna CFJ. 2010. Programa de mejoramiento genético de nochebuena en Morelos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México. Publicación especial No. 49. 36 p.
- Canul KJ, García PF, Barrios GEJ, Osuna CFJ, Ramírez RS, Alia TI y Montoya CRE. 2014. Caracterización morfológica de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*

- 2:16-23.
- Carballo O, Izaguirre ML, and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting Poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease* 85: 1208.
- Colinas LMT, Mejía MJM, Espinoza FA, Alía TI, Martínez MF, Rodríguez EF y Flores EC. 2009. La Nochebuena de sol o de jardín. Folleto técnico. SNICS, SINAREFI, UACH. 15 p.
- Chung BN, Lee EK, Jeong MI and Kim HR. 2004. First Report of *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20: 220-223.
- Galindo GDB, Alía TI, Andrade RM, Colinas LMT, Canul KJ, Sainz AMJ. 2012. Producción de nochebuena de sol en Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 751-763.
- García ROG, Pérez ML, Navarro LMJ, Salas AMD, Martínez JOA, León GMF y Núñez PHG. 2014. Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. Nota científica. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 20: 147-156.
- Jayasinghe U y Chuquillanqui C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus en papa. *Guía de Investigación CIP21*. Lima, Perú. 30 p.
- Lebas BSM, Ochoa CFM, Elliott DR, Tang JZ and Alexander BJR. 2007. Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *Plant Disease* 91:110.
- Martins DR, Rodrigues SE, Pedroso J Arakava R, Rodrigues A, Lazarini B and Batista V. 2008. Detection and Identification of TMV infecting tomato under protected cultivation in Paraná state. *Brazilian archives of Biology and technology* 51:903-909.
- Ocampo OT. 2012. Identificación de virus asociados a la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 47 p.
- Ocampo OT, Ochoa MDL, Ramírez RS, Valdovinos PG y Nava DC. 2013. Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 235-241.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo) (consulta, mayo 2015).
- SINAREFI. 2010. Red Nochebuena. Diagnóstico. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). SAGARPA. 124 p.
- Spetz C, Moe R and Blystad DR. 2008. Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of *Poinsettia mosaic virus*. *Archives of virology* 153: 1347-1351.
- Trejo L, Feria ATP, Olsen KM, Eguiarte LE, Arroyo B, Gruhn JA and Olson ME. 2012. Poinsettia's wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany* 99: 1146-1157.
- USDA. 2104. Floriculture Crops 2013 Summary (June 2014). USDA, National Agricultural Statistics Service. 59 p.
- Zamboni A, Pierantoni L, De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *iForest* 1: 122.125.