



Agrociencia

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

De la Torre Almaráz, Rodolfo; Salazar Segura, Mario; Valverde, Rodrigo A.
Etiología del moteado amarillo del tomate de cáscara (*physalis ixocarpa* b.) en México.
Agrociencia, vol. 37, núm. 3, mayo-junio, 2003, pp. 277-289
Colegio de Postgraduados
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30237307>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ETIOLOGÍA DEL MOTEADO AMARILLO DEL TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* B.) EN MÉXICO

ETIOLOGY OF HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* B.) YELLOW MOTTLE IN MÉXICO

Rodolfo De la Torre-Almaráz¹, Mario Salazar-Segura² y Rodrigo A. Valverde³

¹Unidad de Biotecnología y Prototipos. ENEP-Iztacala. UNAM. Avenida de los Barrios s/n. 54090. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla. Estado de México. (drodolfo@servidor.unam.mx). ²Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56235. Chapingo, Estado de México. ³Louisiana State University. Baton Rouge, USA.

RESUMEN

La enfermedad conocida como moteado amarillo del tomate de cáscara afecta plantas de este tomate en parcelas comerciales en los Estados de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, en el centro de México. En este trabajo se aisló y caracterizó un virus de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) con síntomas de moteado y mosaico amarillo, deformación foliar, clorosis y marchitez. El agente causal fue identificado como un virus del tipo ARN, transmitido a una amplia gama de hospedantes en forma mecánica y por su insecto vector *Myzus persicae*. El análisis con el microscopio electrónico de extractos de tejidos de plantas infectadas mostró tres partículas virales de tipo baciliforme de diferente tamaño y una del tipo icosaédrico. Pruebas serológicas indicaron que el agente causal de la enfermedad es una variante del virus mosaico de la alfalfa (Alfamovirus. AMV).

Palabras clave: ARN doble cadena, virus del mosaico de la alfalfa.

INTRODUCCIÓN

De la Torre *et al.* (1998) aislaron y caracterizaron parcialmente varios virus en plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en los Estados de México, Puebla y Morelos. Las pruebas de transmisión mecánica, injerto, por insectos vectores, serología y microscopía electrónica, permitieron detectar la presencia de varios virus cuyo genoma está constituido por ARN de cadena sencilla, como el virus jaspeado del tabaco (TEV), mosaico del pepino (CMV), marchitez manchada del tomate (TSWV), mancha necrótica del impaciente (INSV), mancha anular del tabaco (TRSV) y mosaico del tabaco (TMV). Los análisis serológicos (ELISA) indicaron que infecciones en mezcla con varios de estos virus están ampliamente distribuidos en las zonas productoras de los Estados de México, Puebla y Morelos.

ABSTRACT

The disease known as husk tomato yellow mottle affects husk tomato in commercial fields in the States of México, Morelos, Puebla, Tlaxcala, and Hidalgo, in central México. In this work a virus was isolated and characterized from husk tomato (*Physalis ixocarpa*) plants, with yellow mottle, mosaic, leaf deformation, chlorosis and wilt symptoms. The causal agent of husk tomato yellow mottle was identified as an RNA virus, transmitted to wild host range by mechanical means and by the insect vector *Myzus persicae*. Electron microscopy analysis of extract from tissue infected plants showed three baciliform and one icosahedral viral particle. Additional serological tests showed that the causal agent of husk tomato yellow mottle disease is a strain of alfalfa mosaic virus (Alfamovirus. AMV).

Key words: Double stranded RNA, alfalfa mosaic virus.

INTRODUCTION

De la Torre *et al.* (1998) isolated and partially characterized several viruses in husk tomato (*Physalis ixocarpa* B.) plants in the States of México, Puebla, and Morelos. The mechanical transmission tests, grafted, by insect vectors, serology, and electron microscopy, detected the presence of several viruses whose genome is constituted by single-stranded RNA, such as tobacco etch virus (TEV), cucumber mosaic virus (CMV), tomato spotted wilt virus (TSWV), impatiens necrotic spot virus (INSV), tobacco ringspot virus (TRSV), and tobacco mosaic virus (TMV). The serological analyses (ELISA) indicated that mixed infections, with several of these viruses, are widely distributed in the producing areas of the States of México, Puebla, and Morelos.

In these producing areas, infections by the geminiviruses pepper Huasteco virus (PHV) and pepper golden mosaic virus (PGMV), single or mixed, were determined with PCR and Southern type hybridization analysis. The genome of these viruses is made of single-stranded DNA; however, the molecular (Southern-type hybridization) and serological analyses (ELISA) showed

En las mismas regiones productoras de tomate de cáscara se determinó, mediante PCR y análisis de hibridación tipo Southern, infecciones en forma individual o en mezcla, por los geminivirus huasteco del chile (PHV) y mosaico dorado del chile (PGMV), cuyo genoma está constituido por ADN de cadena sencilla. Sin embargo, los análisis serológicos (ELISA) y molecular (hibridación tipo Southern), mostraron que en tomate de cáscara fueron más frecuentes las infecciones por virus del tipo ARN (Méndez, *et al.*, 2001; De La Torre, *et al.*, 2002).

Sin embargo, no se ha determinado el agente causal de algunas enfermedades de probable origen viral, cuyos síntomas se reprodujeron en plantas sanas de tomate de cáscara por transmisión mecánica o por injerto, en invernadero. Una enfermedad con estas características, común en numerosas plantas de tomate de cáscara de las zonas productoras de los Estados de México, Hidalgo, Morelos, Puebla y Tlaxcala, es el moteado amarillo del tomate de cáscara, cuyos síntomas primarios incluyen un moteado y mosaico foliar de color amarillo intenso, que posteriormente derivan en deformación de hojas, clorosis, enanismo y marchitez de la planta (Figura 1).

Algunos resultados preliminares, que incluyen los síntomas causados en algunas especies de plantas susceptibles y el análisis de ARN viral de doble cadena en plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo, sugieren que esta enfermedad puede ser causada por el virus mosaico de la alfalfa (AMV) (De La Torre, *et al.*, 1998); sin embargo, las evidencias fueron insuficientes para determinar al agente causal. Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar y precisar al agente causal del moteado amarillo del tomate de cáscara en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por la posibilidad de que el agente causal del moteado amarillo fuera el virus mosaico de la alfalfa, se realizaron ensayos de transmisión mecánica con macerados de hojas de plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo a hospedantes indicadoras y algunas diferenciales para el AMV. La caracterización de este virus incluyó pruebas de transmisión biológica, utilizando al áfido *Myzus persicae* como vector, las serológicas de ELISA y doble difusión en agar, la observación del tipo de partícula viral en el microscopio electrónico y, finalmente, el análisis electroforético de ARN viral de doble cadena. La mayoría de los ensayos de caracterización del virus del moteado amarillo se realizó en plantas de tomate de cáscara recolectadas en campo o producidas en invernadero. Sin embargo, en algunas pruebas se utilizaron plantas de algunas de las especies diferenciales, por su susceptibilidad al virus, la expresión de síntomas y mayor cantidad de tejido afectado, útil para algunos ensayos como la purificación de partículas virales o extracción de ARN-dc.

that in husk tomatoes infections by RNA-type viruses are more frequent (Méndez *et al.*, 2001).

However, the causal agents of some diseases of probable viral origin, whose symptoms were reproduced on healthy husk tomato plants in a greenhouse by mechanical transmission or grafting, have not been determined. A disease with characteristics common to numerous husk tomato plants in the producing areas of the States of México, Hidalgo, Morelos, Puebla, and Tlaxcala, is husk tomato yellow mottle, whose primary symptoms include leaf mottle and mosaic that are an intense yellow and later cause leaf deformation, chlorosis, and plant dwarfing and wilting (Figure 1).

Some preliminary results, which included symptoms found in susceptible plant species, and the analysis of double-stranded viral RNA in husk tomatoes with yellow mottle symptoms, suggest that this disease could be caused by alfalfa mosaic virus (AMV) (De la Torre *et al.*, 1998). However, the evidence was insufficient to determine the causal agent of this disease. Therefore, the objectives of the present study were to characterize and identify the causal agent of the husk tomato yellow mottle in México.

MATERIALS AND METHODS

Because it is possible that the causal agent of yellow mottle disease was alfalfa mosaic virus, tests of mechanical transmission were performed with macerated husk tomato leaves with symptoms of the disease, which were transferred to AMV indicator and differential hosts. To characterize this virus, we included a biological transmission test using the aphid *Myzus persicae* as vector, serological ELISA tests, double diffusion in agar, observation with electron microscope of the



Figura 1. Síntomas de moteado amarillo en plantas de tomate de cáscara en condiciones de campo.

Figure 1. Symptoms of yellow mottle disease in husk tomato under field conditions.

Separación y caracterización de virus por transmisión mecánica a hospedantes indicadores y diferenciales

Se recolectaron plantas de tomate de cáscara var. Rendidora, cultivado en los Estados de México, Puebla y Morelos, que presentaron síntomas de mosaico y moteado amarillo. Porciones de hojas con síntomas se maceraron en solución amortiguadora (0.02 M de fosfato de sodio, pH 7.2), y los extractos se frotaron en hojas de plántulas, previamente espolvoreadas con carborundum, de las siguientes especies indicadoras: *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 'TVu 612', *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., *Pisum sativum*, *Capsicum annuum* L., *Datura stramonium* L., *Lycopersicon esculentum* y *Physalis ixocarpa*. Como especies diferenciales para distinguir al AMV de otras especies de virus, se seleccionó a *V. unguiculata* (L.), *P. vulgaris* L., *V. fabae* y *G. globosa*. Todas las pruebas de transmisión mecánica se repitieron cinco veces, utilizando tres plántulas de cada especie. Las especies indicadoras y diferenciales seleccionadas para la caracterización de AMV fueron las sugeridas por Kurstak (1981) y May (1985).

Pruebas de patogenicidad

Para demostrar que el virus mosaico de la alfalfa pudiera ser el agente causal del moteado amarillo, se seleccionó un aislamiento de este virus separado de plantas de tomate de cáscara procedentes del Estado de México y conservado en plantas de *G. globosa*. Luego se realizaron pruebas de transmisión mecánica a cinco plántulas sanas de tomate de cáscara de dos a tres hojas verdaderas, producidas en el invernadero. Una vez que se presentaron los síntomas de moteado amarillo en tomate de cáscara, y confirmado por pruebas serológicas que no existía otro virus, se realizaron tres transmisiones seriadas a cinco nuevas plántulas en cada ocasión. El virus finalmente se separó y se conservó regularmente en *G. globosa* que es una planta semiperenne, susceptible al virus, que muestra síntomas sistémicos y resiste condiciones adversas en el invernadero, lo que la convierte en una fuente útil y permanente de inóculo.

Pruebas de transmisión con insectos vectores

Se transfirieron 50 adultos del pulgón *Myzus persicae*, procedentes de una colonia no virulífera mantenida en el invernadero, a plantas de *G. globosa*, previamente inoculadas con el virus separado de plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo. Los insectos fueron mantenidos en las plantas enfermas de *G. globosa* por un periodo de alimentación-adquisición de 5 min. Posteriormente, se transfirieron los pulgones a 10 plántulas de *N. rustica* y *P. ixocarpa* (cinco por planta) y se mantuvieron por un periodo de alimentación-transmisión de 5 min; luego los pulgones fueron eliminados manualmente de las plantas, las que se mantuvieron en el invernadero hasta la aparición de síntomas (May, 1985).

type of viral particle, and finally, electrophoretic analysis of viral double-stranded RNA. Most of the characterization tests of the yellow mottle virus were performed on husk tomatoes collected from the field or produced in a greenhouse. However, in some of the tests plants of some differential species were used because of their susceptibility to the virus, expression of the symptoms on a larger amount of affected tissue, and their usefulness for some assays such as the purification of viral particles or extraction of ds-RNA.

Separation and characterization of virus by mechanical transmission to indicator and differential hosts

Husk tomato plants of the variety Rendidora, cultivated in the States of México, Puebla, and Morelos, with symptoms of yellow mosaic and mottle, were collected. Portions of leaves with symptoms were macerated in a buffer solution (0.02 M sodium phosphate, pH 7.2), and the extracts were rubbed onto seedling leaves, which were previously dusted with carborundum, of the following indicator species: *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 'TVu 612', *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., *Pisum sativum*, *Capsicum annuum* L., *Datura stramonium* L., *Lycopersicon esculentum*, and *Physalis ixocarpa*. *V. unguiculata* (L.), *P. vulgaris* L., *V. fabae* and *G. globosa* were selected as differential species to distinguish AMV from other virus species. All of the mechanical transmission tests were replicated five times, using three seedlings of each species. The indicator and differential species selected for AMV characterization were those suggested by Kurstak (1981) and May (1985).

Pathogenicity tests

To test whether alfalfa mosaic virus was the causal agent of yellow mottle, an isolate of this virus separated from husk tomato from the State of México was selected and conserved on *G. globosa* plants. Then, mechanical transmission tests were done on five healthy husk tomato seedlings with two to three true leaves, produced in a greenhouse. Once husk tomato yellow mottle symptoms appeared and it was confirmed by serological tests that no other virus was present, three serial transmissions were performed on five new seedlings each. Finally, the virus was separated and conserved regularly on *G. globosa*, which is a semi-perennial plant, susceptible to the virus, exhibits systemic symptoms, and resists adverse conditions in a greenhouse, making it a useful, permanent source of inoculum.

Transmission tests with insect vectors

Fifty adult *Myzus persicae* aphids from a non-virulent colony kept in the greenhouse were transferred to *G. globosa* plants, previously inoculated with the virus separated from husk tomato plants with yellow mottle symptoms. The insects were kept on the diseased *G. globosa* plants for a feeding-acquisition period of 5 min. They were later transferred to ten *N. rustica* and *P. ixocarpa* plants (five per plant)

Microscopia electrónica

Se obtuvieron extractos de plantas de *G. globosa*, *N. benthamiana* y *P. ixocarpa* infectadas con el virus causante del moteado amarillo, los que se tiñeron con acetato de uranilo a 2% (pH 6.8) o con ácido fosfotúngstico (pH 7.2), en rejillas de cobre previamente preparadas con forban y recubiertas con carbono. Las preparaciones se observaron en un microscopio de transmisión Mod. Jeol 100 CX, y las partículas virales se midieron en la microfotografía y compararon con datos publicados (Dijkstra y De Jager, 1998).

Extracción y análisis de ARN de doble cadena

Se obtuvo ARN de doble cadena (ARN-dc), a partir de 3.5 g de hojas de plantas de *P. ixocarpa* con síntomas de moteado amarillo y de *N. rustica*, con síntomas de mosaico, inoculadas previamente con el virus previamente separado del tomate de cáscara o de las recolectadas en campo con síntomas, macerándolas en solución amortiguadora de extracción (8 mL de STE 1x; 0.5 mL de solución de bentonita 2%; 1.0 mL de SDS 10%; 9 mL de fenol-STE 1x). La solución fue centrifugada a 10 000 g x 15 min; la fase acuosa fue separada y colocada en columnas de celulosa CF-11, en donde se lavó con solución STE 1x-etanol 16%. El ARN de doble cadena se obtuvo lavando la columna de celulosa con 10 mL de STE 1x, precipitándolo con 20 mL de etanol absoluto y 0.5 mL de acetato de sodio 3M. La solución se centrifugó a 15 000 g x 25 min y la pastilla de ARN-dc se resuspendió en agua desionizada estéril. El ARN-dc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida a 6%, a 100 V por 3.5 h. Se incluyeron como marcadores de peso molecular, los ARN-dc del virus de mosaico del tabaco (TMV=4.3 y 0.4×10^6 D), del virus del mosaico del pepino (CMV=2.1, 1.9, 1.3 y 0.6×10^6 D) y del de la alfalfa (AMV=2.2, 1.4, 1.2 y 0.5), obtenidos del banco de virus del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Además, se incluyeron los tratamientos enzimáticos con ARNasa y ADNasa de los extractos de ARN-dc obtenidos de plantas enfermas (Valverde *et al.*, 1990).

Purificación de virus y obtención de antisuero específico

El virus asociado con los síntomas de moteado amarillo del tomate de cáscara se incrementó por transmisión mecánica en 20 plántulas de *N. rustica*, especie que mostró infección sistémica y suficiente número de hojas con síntomas para la purificación del virus. De estas plantas, 25 d después de la inoculación, se pesaron y maceraron 200 g de hojas con 200 mL de solución amortiguadora K_2HPO_4 , 0.1 M, ácido ascórbico 0.1 M y 0.2 M de EDTA, pH 7.1 (ajustado con KOH). El macerado se filtró a través de una gasa estéril. El filtrado se homogeneizó con 200 mL de butanol-cloroformo (1:1 volúmenes). La emulsión se centrifugó a 8000 g durante 15 min. A la fase acuosa recuperada se le agregó 5% (P/V) de polietilenglicol (PM 8000) y se centrifugó durante 15 min a 8000 g. La pastilla obtenida fue resuspendida en 20 mL de fosfatos (0.01 M NaH_2PO_4 , pH 7.0 ajustado con NaOH). La pastilla, después de dos ciclos de centrifugación alta-baja (8000 g y 76 000 g), fue resuspendida en 2 mL de solución de fosfatos, midiéndose la concentración de nucleoproteína viral en mg por mL a

and kept for a feeding-transmission period of 5 min. Aphids were then removed manually from the plants, which were kept in the greenhouse until symptoms appeared (May, 1985).

Electron microscopy

Extracts were obtained from *G. globosa*, *N. benthamiana* and *P. ixocarpa* plants infected with the virus causing yellow mottle. The extracts were dyed with 2% uranile acetate (pH 6.8) or with phosphotungstic acid (pH 7.2), on copper screens previously prepared with phorban and covered with carbon. The preparations were observed in a transmission microscope Mod. Jeol 100 CX, and the virus particles were measured in microphotography and compared with published data (Dijkstra and De Jager, 1998).

Extraction and analysis of double-chain RNA

Double-stranded RNA (ds-RNA) was obtained from 3.5 g of *P. ixocarpa* leaves with symptoms of yellow mottle and from *N. rustica* leaves with mosaic symptoms, both of which were inoculated with virus previously separated from husk tomatoes or from plants with symptoms collected in the field, by macerating them in a extracting buffer solution of (8 mL of STE 1x; 0.5 mL of 2% bentonite solution; 1.0 mL of 10% SDS; 9 mL of STE-phenol 1x). The solution was centrifuged at 10 000 g for 15 min. The aqueous phase was separated and placed in CF-11 cellulose columns, where it was washed with a solution of 16% STE 1x-ethanol. The ds-RNA was obtained by washing the column of cellulose with 10 mL of STE 1x and precipitating it with 20 mL of absolute ethanol and 0.5 mL of sodium acetate 3M. The solution was centrifuged at 15 000 g for 25 min, and the tablet of ds-RNA was re-suspended in sterile de-ionized water. The ds-RNA was analyzed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels at 100 V for 3.5 h. As markers of molecular weight, the ds-RNA of tobacco mosaic virus (TMV=4.3 and 0.4×10^6 D), cucumber mosaic virus (CMV=2.1, 1.9, 1.3 and 0.6×10^6 D), and alfalfa mosaic virus (AMV=2.2, 1.4 1.2 and 0.5×10^6 D), obtained from the virus bank at the Department of Parasitology of Chapingo University, was used. Also included were enzymatic treatments with RNAase and DNAase from extracts of ds-RNA obtained from diseased plants (Valverde *et al.*, 1990).

Purification of virus and obtaining the specific anti-serum

The virus associated with the symptoms of husk tomato yellow mottle was increased by mechanical transmission in 20 *N. rustica* seedlings. This species showed systemic infection and had a sufficient number of leaves with symptoms for purifying the virus. Two hundred g of leaves from these plants, 25 d after inoculation, were weighed and macerated with 200 mL of K_2HPO_4 buffer solution, 0.1 M ascorbic acid and 0.2 M EDTA, pH 7.1 (adjusted with KOH). The macerate was filtered through sterile gauze, and the filtrate was homogenized with 200 mL of butanol-chloroform (1:1 volume). The emulsion was centrifuged at 8000 g for 15 min. Five percent (P/V) polyethylenglycol (PM 8000) was added to the

las diluciones de 1/10 y 1/20, por absorbencia/transmitancia a 260/280 UV. El virus purificado se almacenó a -4°C en alícuotas de 0.5 mL, las cuales fueron usadas para obtener el antisuero y para observación al microscopio electrónico (Vloten-Doting y Jaspar, 1972; Dijkstra y De Jager, 1998).

Para obtener antisuero para este virus, se inyectó un conejo de la raza Nueva Zelanda, (peso aproximado 2 kg) en ocho ocasiones con 0.5 mg del virus purificado mezclado con 1 mL de adyuvante completo de Freud, a intervalos de 8 d. Ocho días después de la última inyección los conejos fueron sangrados y el antisuero obtenido se designó como AMV-Physalis. México y se mantuvo a -20°C para su titulación y comparación con antisueros heterólogos en pruebas de doble difusión en agar. Después de cinco inyecciones con el antígeno se tituló el antisuero, enfrentando diluciones seriadas de 1/1 hasta 1/1024 a extractos de planta enferma (Brakke, 1990).

Difusión doble en agar

La prueba de doble difusión en agar se utilizó para evaluar la sensibilidad de algunos antisueros para la detección de virus, en extractos de plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo. Los antisueros evaluados fueron el homólogo al AMV aislado de *Physalis* (AMV-Physalis. México), y otros proporcionados por la Plant Virus Collection Plant Pathology Department, Louisiana State University: Un heterólogo de AMV específico para una variante del virus mosaico de la alfalfa (AMV-strain *Vigna sinensis* Arkansas. 1/500), uno del mosaico del pepino (CMV-strain *Capsicum annuum*. 1/500), uno del mosaico del tabaco (TMV-strain common. 1/500), y uno del jaspeado del tabaco (TEV-strain pepper. 1/540).

Extracto diluidos (1:2) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.0) de plantas sanas y las infectadas con el virus causante del moteado amarillo, se colocaron en el pozo central de placas con 0.5% de ionagar, 5% de NaCl, en solución amortiguadora de fosfatos (0.01 M). En los pozos periféricos de cada placa se colocó 100 μL de cada antisuero sin diluir. Las placas se incubaron por 24 h en cámaras húmedas y a temperatura de laboratorio (Ball, 1990; Hampton *et al.*, 1990).

Ensayos serológicos de ELISA

La detección de diferentes tipos de virus se realizó con el ensayo serológico ligado a enzimas en doble sandwich (DAS-ELISA) en dos días, sólo en las muestras de plantas de *Physalis* con síntomas de moteado amarillo recolectadas en parcelas comerciales y en las plantas utilizadas para la caracterización del virus asociado. Se utilizaron antisueros policlonales específicos comerciales para la detección de los virus TSWV, CMV, TMV, TRSV y TEV. Los antisueros y procedimientos se adquirieron en Agdia Co. La absorbancia de las posibles reacciones antígeno anticuerpo se registraron en un Microlector con filtro de 492 nm, alrededor de 20-30 min después de la adición del sustrato. La reacción se consideró positiva si la absorbancia fue igual o superior a la lectura de los testigos positivos para cada uno de los antisueros incluidos en el equipo de detección serológica (Clark y Adams, 1977).

aqueous phase recovered and centrifuged for 15 min at 8000 g. The tablet obtained was re-suspended in 20 mL phosphate solution (0.01 M NaH_2PO_4 , pH 7.0 adjusted with NaOH). The tablet, after two cycles of high-low centrifugation (8000 g and 76 000 g) was re-suspended in 2 mL phosphate solution. The concentration of viral nucleoprotein was measured in mg per mL to dilutions of 1/10 and 1/20 by absorbance/transmittance at 260/280 UV. The purified virus was stored at -4°C in aliquots of 0.5 mL, which were used to obtain the anti-serum and for observation with an electron microscope (Vloten-Doting and Jaspar, 1972; Dijkstra and De Jager, 1998).

To obtain the anti-serum for this virus, a New Zealand rabbit (2 kg approximate weight) was injected eight times with 0.5 mg of the purified virus mixed with 2 mL of complete Freud adjuvant at intervals of 8 d. Eight days after the last injection, the rabbit was bled and the obtained antiserum was designated AMV-Physalis. México. This was kept at -20°C for titration and comparison with heterological antiserum in double diffusion tests in agar. After five injections with the antigen, the antiserum was titrated, confronting serial dilutions of 1/1 up to 1/1024 with extracts of diseased plants (Brakke, 1990).

Double diffusion in agar

The double diffusion test in agar was used to evaluate the sensitivity of some antisera for detection of virus in extracts of husk tomato plants with yellow mottle symptoms. The evaluated antisera were the antiserum homologous to AMV isolated from *Physalis* (AMV-Physalis. México) and others provided by the Plant Virus Collection, Plant Pathology Department, Louisiana State University: an heterologous to the AMV specific for a strain of alfalfa mosaic virus (AMV-strain *Vigna sinensis* Arkansas. 1/500), a strain of cucumber mosaic virus (CMV-strain *Capsicum annuum*. 1/500), and of tobacco mosaic virus (TMV-strain common. 1/500), and one of tobacco etch virus tobacco (TEV-strain pepper. 1/540).

Diluted extracts (1:2), with a buffer solution of phosphates (1.0 M, pH 7.0) of healthy plants and plants infected with the virus causing yellow mottle, were placed in the central well of plates with 5% ionagar, 5% NaCl, in a buffer solution of phosphates (0.01 M). In the peripheral wells of each plate, 100 μL of each undiluted antiserum was placed. The plates were incubated for 24 h in humid chambers at laboratory temperature (Ball 1990; Hampton *et al.*, 1990).

ELISA serological tests

The detection of different types of viruses was carried out with the double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) serological test in two days, only in the samples of *Physalis* plants with yellow mottle symptoms collected in commercial fields and in the plants used for characterization of the associated virus. Specific polyclonal commercial antisera were used to detect TSWV, CMV, TMV, TRSV, and TEV. The antisera and procedures were acquired from Agdia Co. Absorbance of the possible antigen reactions of the antibodies were recorded in a Microlector with a 492 nm filter, 20-30 min after the addition of the substrate. The reaction was considered positive if absorbance was equal to or above the readings

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación y caracterización de virus por transmisión mecánica a hospedantes diferenciales

A partir de extractos de plantas de *Physalis* con síntomas de moteado amarillo recolectadas en campo, se separó un virus que fue transmitido mecánicamente a varias especies de plantas indicadoras. Los ensayos de transmisión de este virus a plantas de especies diferenciales, mostraron que el virus relacionado con los síntomas de moteado amarillo es una variante del virus mosaico de la alfalfa (Cuadro 1).

El aislamiento de AMV obtenido de tomate de cáscara, sin ningún otro virus, causó moteado amarillo en *P. ixocarpa* (Figura 2A); moteado en *N. tabacum* var. *xanthi*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana* y *N. rustica* (Figura 2B); lesiones locales cloróticas y después mosaico con deformación severa de hojas en *C. quinoa* (Figura 2C); lesiones locales necróticas y márgenes rojizos, acompañado posteriormente de moteado y mosaico de color amarillo, con deformación en hojas de *G. globosa* (Figura 2D). Este virus causó lesiones locales cloróticas y después necróticas en *Vigna unguiculata*, sin causar infección sistémica (Figura 2E). En *P. vulgaris* se observaron numerosas lesiones locales necróticas, clorosis y necrosis de nervaduras y finalmente marchitez de la hoja, sin movimiento sistémico al resto de la planta (Figura 2F). En *V. faba* lesiones localizadas en la forma de manchas oscuras, mosaico amarillo, y marchitez de la planta (Figura 2G) fueron observadas.

Cuadro 1. Síntomas en plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con el virus causante del “moteado amarillo de *Physalis*”.

Table 1. Symptoms in indicator and differential plants inoculated with the virus causing “*Physalis* yellow mottle.”

Hospedantes	Moteado amarillo del <i>Physalis</i> (AMV)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	MA
<i>N. rustica</i>	MA
<i>N. benthamiana</i>	M, DH
<i>N. tabacum</i> var. <i>xanthi</i>	MA
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	LLC, M, DH
<i>C. amaranticolor</i>	LLC
<i>Gomphrena globosa</i> [†]	LLN, MA, DH
<i>Cucumis sativus</i> L.	M
<i>Cucurbita pepo</i> L.	M
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. TVu 612 [†]	LLN
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. Bayo Madero [†]	LLN
<i>Vicia fabae</i> L. [†]	LLN, M
<i>Pisum sativum</i> L. [†]	LLN
<i>Capsicum annuum</i> L. Ancho	M
<i>Datura stramonium</i> L.	SS
<i>Lycopersicon esculentum</i>	M, DH
<i>Physalis ixocarpa</i>	MA

MA = Moteado amarillo; LLC = Lesiones locales cloróticas; DH = Deformación de hojas; M = Mosaico; LLN = Lesiones locales necróticas; SS = Sin síntomas.

[†] Especies utilizadas como diferenciales para AMV.

for the positive controls for each of the antisera included in the serological detection equipment (Clark and Adams, 1977).

RESULTS AND DISCUSSION

Separation and characterization of virus by mechanical transmission to differential hosts

From *Physalis* plants with yellow mottle symptoms collected in the field, a virus was separated and transmitted mechanically to several species of indicator plants. The transmission tests for this virus to differential plant species showed that the virus associated with the symptoms of yellow mottle is a strain of the alfalfa mosaic virus (Table 1).

The AMV isolate obtained from husk tomato, with no other virus, caused yellow mottle in *P. ixocarpa* (Figure 2A); in *N. tabacum* var. *xanthi*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, and *N. rustica* (Figure 2B); local chlorotic lesions and later mosaic with severe deformation of leaves in *C. quinoa* (Figure 2C); localized necrotic lesions and reddish edges, later accompanied by yellow mottle and mosaic, with leaf deformation, in *G. globosa* (Figure 2D). This virus caused localized chlorotic, and later necrotic, lesions in *Vigna unguiculata*, without causing systemic infection (Figure 2E). In *P. vulgaris*, a number of localized necrotic lesions, chlorosis, and vein necrosis, and finally, leaf wilting with no systemic movement to the rest of the plant, were observed (Figure 2F). In *V. faba* localized lesions in the form of dark spots, yellow mosaic, and plant wilting (Figure 2G) were seen.

Pathogenicity tests

Serial mechanical transmission with extracts from samples of husk tomato with yellow mosaic to seedlings of the same species in a greenhouse permitted the reproduction of the same symptoms in the different tests. The symptoms observed on the greenhouse husk tomato plants were more extensive yellow mottle on the leaf surface, which later caused mosaic, leaf deformation, and generalized yellowing in the rest of the plant (Figure 3). Under field conditions, yellow mottle decreases during flowering and later generalized yellowing and wilting are observed, among other symptoms.

During the first tests to separate the virus, frequent infections by TEV, TMV, and CMV were obtained. However, these viruses did not cause the typical “*Physalis* yellow mottle” in healthy husk tomato plants, which were inoculated with each virus independently by mechanical transmission. These results coincide with those reported for diseases of viral origin in *Physalis* in México, where TEV, TMV, CMV, TSWV, INSV, TRSV and geminivirus did not cause yellow mottle symptoms in mechanical

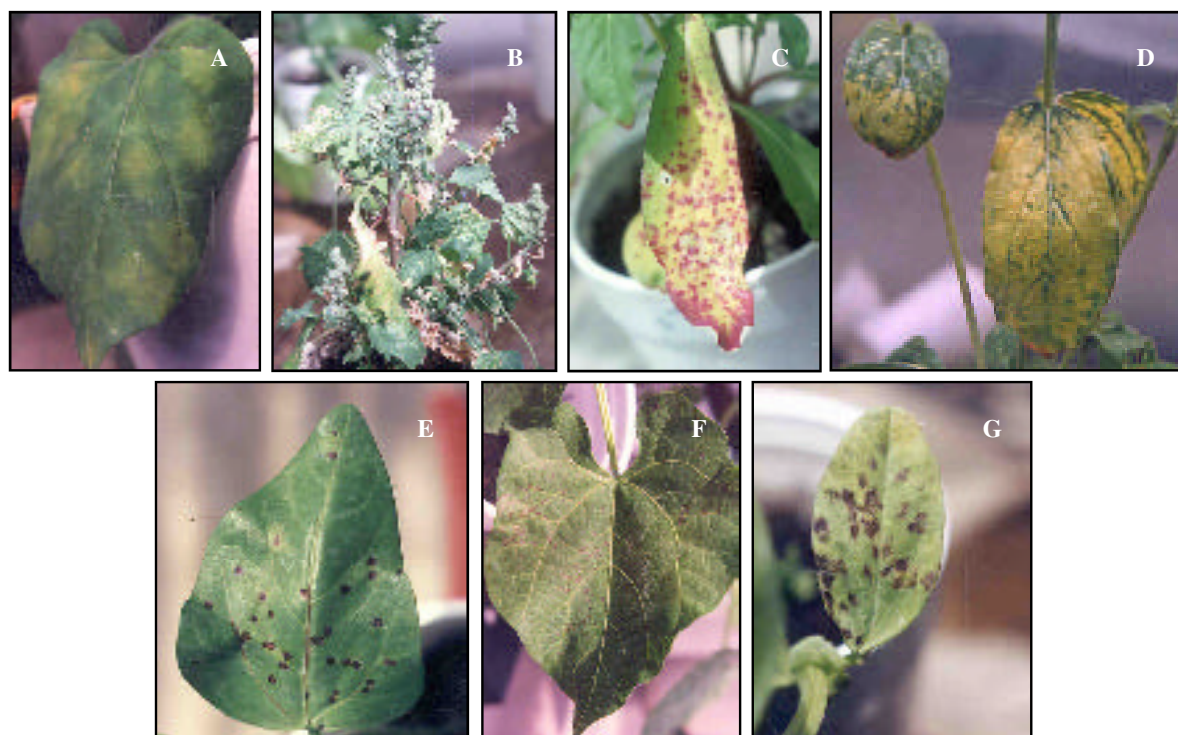


Figura 2. A) Síntomas causados por el virus relacionado con el moteado amarillo del tomate de cáscara en plantas diferenciales en condiciones de invernadero en: A) Moteado amarillo en *Nicotiana rustica*; B) Lesiones locales cloróticas, mosaico y deformación severa de ramas y hojas en *Chenopodium quinoa*; C) Lesiones locales necróticas y D) mosaico amarillo en *Gomphrena globosa*; E) Lesiones locales necróticas en *Vigna unguiculata*; F) Lesiones locales necróticas en *Phaseolus vulgaris* y G) Lesiones locales necróticas en *Vicia faba*, inoculadas por transmisión mecánica.

Figure 2. A) Symptoms caused by the virus related to husk tomato yellow mottle in differential plants under a greenhouse: A) yellow mottle on *Nicotiana rustica*; B) Localized chlorotic lesions, mosaic, and severe deformation of branches and leaves in *Chenopodium quinoa*; C) Localized necrotic lesions, and D) yellow mottle in *Gomphrena globosa*; E) Localized necrotic lesions in *Vigna unguiculata*; F) localized necrotic lesions in *Phaseolus vulgaris*; and G) localized necrotic lesions in *Vicia faba*, inoculated by mechanical transmission.

En *V. faba* se observaron lesiones locales en forma de mancha de color obscuro, mosaico amarillo y marchitez de la planta (Figura 2G).

Pruebas de patogenicidad

La transmisión mecánica seriada con extractos de muestras de tomate de cáscara con moteado amarillo a plántulas de la misma especie, en invernadero, permitió la reproducción de los mismos síntomas en los diferentes ensayos. Los síntomas observados en las plantas de tomate de cáscara en invernadero fueron un moteado amarillo más extendido en la superficie foliar, después causó mosaico, deformación de hojas y un amarillamiento generalizado en el resto de la planta (Figura 3). En condiciones de campo, el moteado amarillo disminuye durante la floración y después se observan síntomas de amarillamiento generalizado y marchitez, entre otros.

transmission tests with greenhouse husk tomato (De La Torre *et al.*, 1998).

Considering the symptoms observed in the different indicator and differential plant species, as well as those obtained in the pathogenicity tests on husk tomato, it was determined that yellow mottle is caused by a variant of alfalfa mosaic virus (Bos, 1978; Brunt *et al.*, 1996; Francki, 1991; Jaspar, 1980).

AMV is the only species of the genus Alfamovirus that belongs to the family Bromoviridae, which also includes the genera Bromovirus, Cucumovirus and Ilarvirus, with which it shares several molecular characteristics. The range of hosts of AMV is broad and the symptoms it causes are similar to those induced by the cucumber mosaic virus (CMV.Cucumovirus), with which it is often confused. However, the local lesions, the systemic movement that was manifested as mosaic, and the leaf deformation in *G. globosa*, *C. quinoa* and *C. amaranticolor* indicated that the virus isolated from

Durante las primeras pruebas de separación de virus, se obtuvo frecuentes infecciones por TEV, TMV y CMV. Sin embargo, estos virus no causaron el típico "moteado amarillo del *Physalis*" en plantas sanas de tomate de cáscara, que se inocularon con cada virus en forma independiente y por transmisión mecánica. Estos resultados coinciden con lo reportado en enfermedades de origen viral de *Physalis* en México, donde TEV, TMV, CMV, TSWV, INSV, TRSV y geminivirus no causaron síntomas de moteado amarillo en pruebas de transmisión mecánica en tomate de cáscara en invernadero (De La Torre *et al.*, 1998).

Considerando los síntomas observados en las diferentes especies de plantas indicadoras, diferenciales, así como los obtenidos en las pruebas de patogenicidad en tomate de cáscara, se determinó que el moteado amarillo es causado por una variante del virus mosaico de la alfalfa (Bos, 1978; Brunt *et al.*, 1996; Francki, 1991; Jaspas, 1980).

AMV es la única especie del género Alfamovirus que pertenece a la familia Bromoviridae, que también agrupa a los géneros Bromovirus, Cucumovirus e Ilarvirus, con los que comparte varias características moleculares. La gama de hospedantes de AMV es amplia y los síntomas que causa son similares a los inducidos por el virus del mosaico del pepino (CMV. Cucumovirus), con el que se confunde frecuentemente. Sin embargo, las lesiones locales, el movimiento sistémico que se manifestó como mosaico y la deformación de hojas en *G. globosa*, *C. quinoa* y *C. amaranticolor*, indicó que el virus aislado de *Physalis* con moteado amarillo, es una variante de AMV y no de CMV, que sólo causa lesiones locales en estos tres hospedantes (Bos, 1978; Smith, 1957; Smith, 1980; Van Regenmortel y Pinck, 1981).

El AMV es un virus con amplia distribución mundial, con numerosas variantes que infectan a muchas especies de plantas cultivadas y ornamentales. Su transmisión experimental, mecánica y por injerto es fácil, a más de 430 especies de 51 familias botánicas. Por tanto, el AMV es considerado uno de los 10 virus más importantes de plantas, por los daños que causa en papa (*Solanum tuberosum*), diferentes clases de síntomas en tabaco, mosaico amarillo en *Malva parviflora*, lechuga (*Lactuca sp.*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), frijol de cuerno (*Vigna unguiculata*), frijol mungo (*V. radiata*) y chile (*Capsicum annuum*), y necrosis en chicharo (*Pisum sativum*), necrosis severa en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y garbanzo (*Cicer arietinum*). En muchas especies, la infección por este virus causa predisposición a la sequía, y los daños por frío se incrementan severamente (Brunt *et al.*, 1996; Van Regenmortel y Pinck, 1981).

Transmisión con insectos vectores

El virus causante del moteado amarillo del tomate de cáscara fue transmitido en invernadero, por individuos

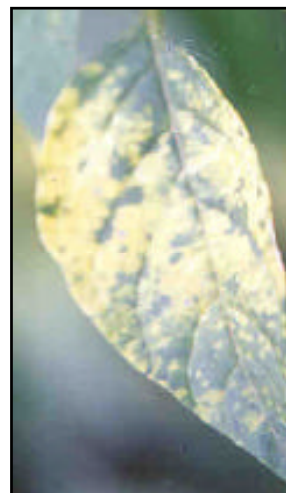


Figura 3. Síntomas causados por un virus, relacionado con el moteado amarillo del tomate de cáscara, en plantas de tomate de cáscara inoculadas mecánicamente, en invernadero.

Figure 3. Symptoms caused by a virus, associated with husk tomato yellow mottle in mechanically inoculated husk tomato plants in a greenhouse.

Physalis with yellow mottle is a variant of AMV and not of CMV, which only caused localized lesions in the three hosts (Bos, 1978; Smith, 1957; Smith, 1980; Van Regenmortel and Pinck, 1981).

AMV is widely distributed over the world, with numerous strains that infect many species of crops and ornamentals. Experimentally, it is easily transmitted, mechanically or by grafting, to more than 430 species of 51 botanical families. Thus, AMV is considered one of the ten major plant viruses, causing damage to potato (*Solanum tuberosum*), different types of symptoms in tobacco, yellow mosaic in *Malva parviflora*, lettuce (*Lactuca sp.*), bean (*Phaseolus vulgaris*), cow peas (*Vigna unguiculata*), mung beans (*V. radiata*), and chili pepper (*Capsicum annuum*), and necrosis in pea (*Pisum sativum*), and severe necrosis in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chickpea (*Cicer arietinum*). In many species, infection by this virus causes a predisposition to drought damage, and cold damage increases severely (Brunt *et al.*, 1996; Van Regenmortel and Pinck, 1981).

Transmission with insect vectors

The causal virus of husk tomato yellow mottle was transmitted in a greenhouse by adult *M. persicae*, with 100 % efficiency, from *G. globosa* with symptoms of yellow mosaic to *N. rustica*. These plants developed yellow mottle and tenuous yellow mosaic; ELISA tests confirmed that they were infected only by AMV. In natural conditions AMV is transmitted non-persistently by at least 14 species of aphids, and thus, dissemination

adultos de *M. persicae*, con 100% de eficiencia, de plantas de *G. globosa* con síntomas de mosaico amarillo a *N. rustica*. Estas plantas desarrollaron moteados y mosaicos amarillos tenues y las pruebas de ELISA confirmaron que estaban infectadas sólo con el AMV. En condiciones naturales el AMV es transmitido en forma no persistente por al menos 14 especies de áfidos, por lo que la diseminación de este virus es potencialmente alto en muchos cultivos de importancia económica en nuestro país (Brunt *et al.*, 1996).

La recolección e identificación de las especies de áfidos asociados con las plantas de tomate de cáscara y malezas adyacentes, indicaron el predominio de poblaciones de *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. Así, estas especies de pulgones pudieran ser vectores naturales del virus mosaico de la alfalfa en tomate de cáscara. Sin embargo, en este trabajo no se realizaron pruebas de transmisión de AMV con *A. gossypii* y *R. padi*.

Microscopia electrónica

Preparaciones de extractos de hojas de plantas enfermas y de virus purificado, analizadas en el microscopio electrónico, mostraron partículas virales. Tres del tipo baciliformes de diferente tamaño y una icosaédrica (Figura 4).

Los tipos de partículas observadas al microscopio electrónico, obtenidas de extractos de plantas enfermas y de virus purificado, correspondieron en forma y tamaño a las partículas descritas como típicas del virus mosaico de la alfalfa. El AMV está formado por tres cápsides baciliformes y una icosaédrica, con diferente longitud: Las baciliformes 56, 43, 35 de anchura×18 nm, y la icosaédrica 30 nm de longitud (Dimmock y Primrose, 1994). Brunt *et al.* (1996) señalan que las partículas virales del tipo baciliformes, en sus tres formas, en combinación con una icosaédrica, son típicas y específicas de AMV. Por tanto, no es posible confundir este virus con ningún otro que afecta a plantas, sobre todo si se toma en cuenta los síntomas que causa en las especies de hospedantes naturales, indicadoras y diferenciales susceptibles, en pruebas de transmisión mecánica y pruebas serológicas específicas.

Extracción y análisis electroforético de ARN doble cadena

El análisis electroforético del ARN-dc mostró cuatro bandas de ARN-dc, con los siguientes pesos aproximados: ARN 1=2.6×10⁶ D; ARN 2=2.1×10⁶ D; ARN 3=1.7×10⁶ D; ARN 4=0.6×10⁶ D (Figura 5. Carril A). Los tratamientos con las enzimas ARNasa (Figura 5. Carril B) y ADNasa (dato no mostrado), demostraron que las bandas obtenidas en las corridas electroforéticas

of this virus is potentially high in many economically important crops in our country (Brunt *et al.*, 1996).

Collection and identification of the aphid species associated with husk tomato plants and adjacent weeds indicated a predominance of populations of *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*. Thus, these aphid species could be natural vectors of alfalfa mosaic virus in husk tomato. However, in this study no AMV transmission tests were performed with *A. gossypii* and *R. padi*.

Electron microscopy

Preparations of diseased plant leaf extracts and of the purified virus, analyzed under an electron microscope, showed viral particles: Three of the baciliform-type of different sizes and one icosahedral-type (Figure 4).

The particle types observed with the electron microscope, obtained from extracts of diseased plants and purified virus, match the particles described, in form and size, as typical of the alfalfa mosaic virus. AMV is formed by three baciliform and icosahedral capsids, all different lengths: The bacilliforms were 56, 43, 35 nm wide×18 nm long, and the icosahedral was 30 nm long (Dimmock and Primrose, 1994). Brunt *et al.* (1996) point out that the baciliform viral particles, in their three forms and combined with one icosahedral, are typical and specific of AMV. Therefore, it is not possible to confuse this virus with any other that affects plants, especially taking into account the symptoms it causes in natural host, indicator, and differential susceptible species in tests of mechanical transmission and specific serological tests.

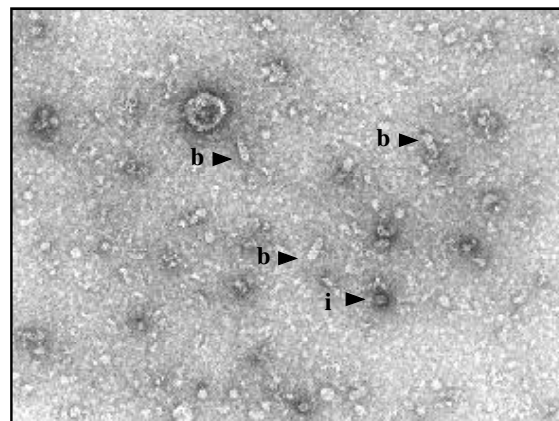


Figura 4. Partículas baciliformes (b) e icosaédricas (i) del virus mosaico de alfalfa (AMV).

Figure 4. Baciliform (b) and icosahedral (i) particles of the Alfalfa Mosaic Virus (AMV).

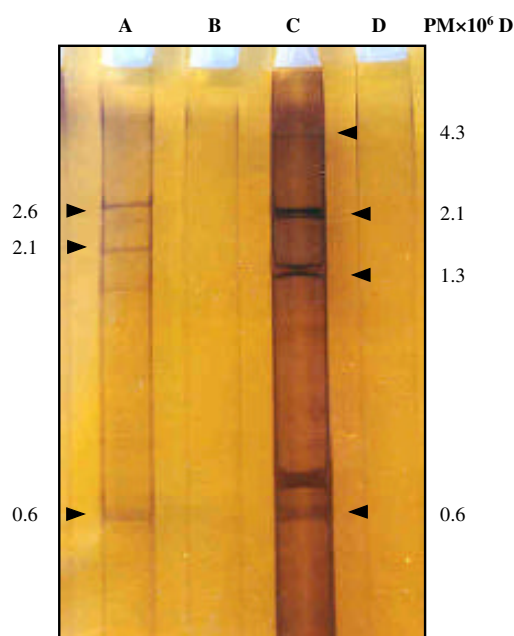


Figura 5. Electroforesis de ARN de doble cadena en gel de poliacrilamida (6%), 100V/3 h carril A) virus mosaico de la alfalfa (AMV); carril B) ARN-dc de AMV tratado con RNasa; carril C) ARN-dc del virus mosaico del tabaco (TMV) y virus mosaico del pepino (CMV); carril D) ARN de planta sana de *N. rustica*.

Figure 5. Double-stranded RNA electrophoresis in polyacrylamide gel ((6%), 100V/3h. Band A) Alfalfa mosaic virus (AMV); Band B) ds-RNA of AMV treated with RNAase; Band C) ds-RNA of tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV); Band D) RNA of healthy *N. rustica* plant.

en geles de acrilamida, corresponden únicamente a ARN de doble cadena y no a ARN de cadena sencilla o a ADN, en ninguna de sus formas moleculares, mismas que son degradadas por este tipo de nucleasas, a diferencia del ARN-dc resistente a la degradación enzimática en las condiciones de pH y concentración de sales de tratamiento previo a la electroforesis (Valverde *et al.*, 1990).

El perfil electroforético de ARN-dc fue similar con otros aislamientos de AMV con los que se comparó, pero diferente a los patrones electroforéticos de TMV (ARN 1=4.3×10⁶ D) y CMV (ARN 1=2.1×10⁶ D; ARN 2=1.9×10⁶ D; ARN 3=1.3×10⁶ D; ARN 4=0.6×10⁶ D) (Figura 5. Carril C), que fueron utilizados como marcadores de peso molecular en los mismos geles (Valverde *et al.*, 1990).

El análisis electroforético de ARN-dc, obtenido de plantas recolectadas en campo con síntomas de moteado amarillo y de las plantas inoculadas en el invernadero, siempre mostró el perfil de cuatro bandas correspondiente al virus mosaico de la alfalfa. Sin embargo, fue frecuente detectar en el material recolectado en campo

Extraction and electrophoretic analysis of double-stranded RNA

The electrophoretic analysis of ds-RNA showed four bands of ds-RNA, with the following approximate weights: RNA 1=2.6×10⁶ D; RNA 2=2.1×10⁶ D; RNA 3=1.7×10⁶ D; RNA 4=0.6×10⁶ D (Figure 5. Band A). The treatments with the enzymes RNAase (Figure 5. Band B) and DNAase (data not shown) showed that the bands obtained in the electrophoretic analyses in acrylamide gels correspond only to double-stranded RNA and not to single-stranded RNA or DNA, in any of their molecular forms, which are degraded by this type of nuclease, in contrast with ds-RNA that is resistant to enzymatic degradation under the pH and salt concentration of the treatment previous to electrophoresis (Valverde *et al.*, 1990).

The electrophoretic profile of ds-RNA was similar to those of other isolates of AMV with which it was compared, but it was different from the electrophoretic patterns of TMV (RNA 1=4.3×10⁶ D) and CMV (RNA 1=2.1×10⁶ D; RNA 2=1.9×10⁶ D; RNA 3=1.3×10⁶ D; RNA 4=0.6×10⁶ D) (Figure 5. Band C), which were used as markers of molecular weight in the same gels (Valverde *et al.*, 1990).

The electrophoretic analysis of ds-RNA obtained from plants collected in the field with yellow mottle symptoms and from plants inoculated in the greenhouse, consistently exhibited the profile of four bands that corresponds to alfalfa mosaic virus. However, other electrophoretic patterns were often detected in the material collected from the field, indicating mixed infections with other viruses.

Alfalfa mosaic virus has a tripartite genome, comprising four single-stranded, positive polarity RNA molecules designated as components B (ARN1=1.32×10⁶ D), M (ARN 2=1.07×10⁶ D), Tb (ARN 3=0.87×10⁶ D) and a subgenomic component denominated Ta (ARN 4=283×10³ D). Each particle encapsidates its respective single-stranded RNA. The three longest RNA molecules comprise the viral genome, while the fourth smallest particle encapsidates the subgenomic Ta segment of the capsid protein. All the components of AMV are necessary for infection (Bos and Jaspas, 1971; Brunt *et al.*, 1996; Francki, 1991).

Purification of virus and obtaining the specific anti-serum

AMV causing husk tomato yellow mottle was purified from the *N. rustica* plants rather easily, but the yield was low, making it necessary to mix the products of several purifications to obtain a viral concentration of 1.0 mg mL⁻¹ for the eight injections of 0.5 mg each

otros patrones electroforéticos de ARN-de junto con los de AMV, que indicaron infecciones en mezcla con otros virus.

El virus mosaico de la alfalfa tiene genoma tripartita, compuesto de cuatro moléculas de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, designados como componentes B (ARN 1=1.32×10⁶), M (ARN 2=1.07×10⁶), Tb (ARN 3=0.87×10⁶) y un componente subgenómico denominado Ta (ARN 4=283×10³). Cada partícula encapsida a su respectivo ARN de cadena sencilla. Las tres moléculas de ARN más largas comprenden el genoma viral, mientras la cuarta partícula más pequeña encapsida al segmento sub-genómico Ta de la proteína de la cápside. Todos los componentes del AMV son necesarios para la infección (Bos y Jaspar, 1971; Brunt *et al.*, 1996; Francki, 1991).

Purificación de virus y obtención de antisuero específico

El AMV causante del moteado amarillo del tomate de cáscara fue purificado de las plantas de *N. rustica* con cierta facilidad, pero con bajo rendimiento, ya que fue necesario mezclar los productos de varias purificaciones hasta obtener una concentración viral de 1.0 mg mL⁻¹, y después las necesarias para inmunizar al conejo con ocho inyecciones de 0.5 mg cada una. El bajo rendimiento del virus obtenido en la purificación indica que éste es probablemente muy inestable en el proceso de extracción, característica que distingue a este virus de otros.

El bajo rendimiento de virus en la purificación del AMV se reflejó en el bajo título del antisuero que se obtuvo, aún después de inmunizar al conejo hasta en ocho ocasiones. El título máximo obtenido fue sólo 1/8 de dilución (en el ensayo de doble difusión en agar), suficiente para detectar el aislamiento de AMV que se utilizó para inmunizar a un conejo. El antisuero obtenido se liofilizó y se almacenó en ampollitas de vidrio y se le designó como anti-AMV-*Physalis*.México.

Doble difusión en agar

Mediante el ensayo de doble difusión en agar se pudo detectar al AMV en extractos de plantas de tomate de cáscara con síntomas de moteado amarillo (Figura 6, pozo S), utilizando el antisuero homólogo anti-AMV-*Physalis* (sin diluir) (Figura 6, pozo A). Sin embargo, el AMV también fue detectado por el antisuero heterólogo (AMV-Arkansas) (Figura 6, pozo B), indicando que probablemente el AMV separado de tomate de cáscara sea una variante común ampliamente distribuida. El AMV no tuvo reacción cruzada con los antisueros de CMV, TMV o TEV (Figura 6, pozos D, E y F, ni con el extracto de la planta sana con los que se ensayó (Figura 6, pozo C).

necessary to immunize the rabbit. The low yield of the virus obtained in purification indicates that it is probably very unstable in the process of extraction, a characteristic that distinguishes this virus from others.

The low yield of virus in the purification of AMV was reflected in the low titer of the antiserum obtained, even after immunizing the rabbit up to eight times. The highest titer obtained was only 1/8 in dilution (in the double diffusion in agar assay), but it was enough to detect the isolate of AMV used to immunize the rabbit. The antiserum obtained was lyophilized and stored in glass vials under the name anti-AMV-*Physalis*.México.

Double diffusion in agar

With the double diffusion in agar assay, it was possible to detect AMV in extracts from husk tomato with yellow mottle symptoms (Figure 6, Well S), using the homologous antiserum anti-AMV-*Physalis*, (without dilution) (Figure 6, Well A). However, AMV was also detected by the heterologous antiserum (AMV-Arkansas) (Figure 6, Well B), indicating that the AMV separated from husk tomato is probably a common, widely distributed strain. AMV did not have a crossed reaction with the antisera for CMV, TMV or TEV (Figure 6, Wells

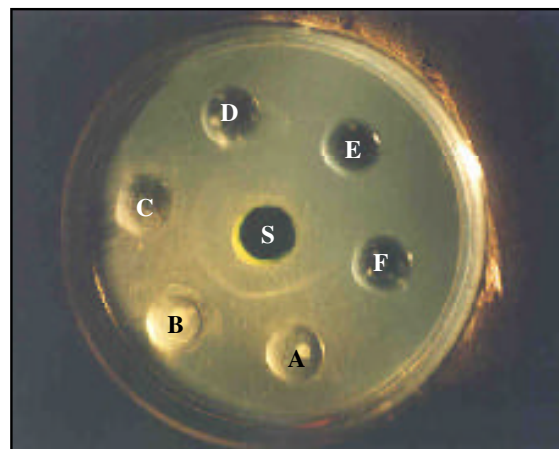


Figura 6. Ensayo de doble difusión en agar con savia de plantas de tomate de cáscara infectadas con AMV con A) antisuero homólogo (anti-AMV *Physalis*) y B) antisuero heterólogo (anti-AMV Arkansas); C) extracto de planta de tomate de cáscara sana; D) antisuero de CMV; E) antisuero de TMV; F) antisuero de TEV; S) extracto de hojas de *Physalis* con síntomas de moteado amarillo.

Figure 6. Double diffusion in agar assay with sap from husk tomato plants infected with AMV with A) homologous antiserum (anti-AMV *Physalis*) and B) heterologous antiserum (anti-AMV Arkansas); C) extract from healthy husk tomato plant; D) CMV antiserum; E) TMV antiserum; F) TEV antiserum; S) extract from *Physalis* leaves with yellow mottle symptoms.

El AMV no se encuentra serológicamente relacionado con ningún otro virus, ni aun con los otros miembros de la familia Bromoviridae; esto es, sólo las variantes de AMV género Alfamovirus podrían ser detectadas con sus correspondientes antisueros homólogos y heterólogos (Brunt *et al.*, 1996), tal como se observó en el presente trabajo.

Ensayos serológicos de ELISA

Los ensayos serológicos de ELISA, utilizando plantas de tomate de cáscara con los síntomas de moteado amarillo y recolectadas en campo, detectaron infecciones con los virus mosaico de la alfalfa (AMV), jaspeado del tabaco (TEV), mosaico de pepino (CMV) o con el mosaico del tabaco (TMV). Sin embargo, el ensayo de ELISA utilizando extractos de plántulas de las especies indicadoras y diferenciales, infectadas con el virus relacionado con los síntomas del moteado amarillo en tomate de cáscara, sólo fue positivo cuando se utilizó el antisuero del virus mosaico de la alfalfa.

Considerando los datos obtenidos en la separación y caracterización del agente causal del moteado amarillo del tomate de cáscara, se encontró que esta enfermedad es causada por una variante común del virus mosaico de la alfalfa. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en parcelas comerciales de tomate de cáscara en los Estados de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, en siembras de temporal y riego. Su incidencia fue mayor en las siembras de riego en marzo y abril, disminuyendo en las siembras de temporal de mayo y junio, cuando son frecuentes las infecciones por virus como TMV, CMV, TEV y TSWV, que son relativamente más fáciles de separar que AMV (De la Torre *et al.*, 1998).

Se determinó por serología y transmisión mecánica, que el virus mosaico de la alfalfa sobrevive en otros cultivos adyacentes al tomate de cáscara como alfalfa, haba, cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y tabaco silvestre (*Nicotiana glauca* L.) (datos no mostrados). Esta situación se tendrá que evaluar debido a la amplitud de hospedantes que puede infectar este virus y los daños potenciales en especies susceptibles cultivadas en México.

CONCLUSIONES

La enfermedad del moteado amarillo del tomate de cáscara es causada por un virus de ARN de cadena sencilla, mecánicamente transmisible a una amplia gama de hospedantes y por el áfido *Myzus persicae*, con 100% de eficiencia en ensayos realizados en invernadero. La caracterización por serología, microscopía electrónica y análisis de ARN de doble cadena, indicó que esta enfermedad es causada por una variante común del virus

D, E, and F), or with the extract from the healthy plant, which were all tested (Figure 6, Well C).

AMV is not found serologically related to any other virus, or to the other members of the Family Bromoviridae; that is, only the AMV strains of the genus Alfamovirus could be detected with their corresponding homologous and heterologous antisera (Brunt *et al.*, 1996), as it was observed in this work.

ELISA serological assays

ELISA serological assays, using husk tomato plants with yellow mottle symptoms and those collected in the field, detected infections by alfalfa mosaic virus (AMV), tobacco etch virus (TEV), cucumber mosaic virus (CMV), or tobacco mosaic virus (TMV). However, the ELISA assay using extracts from seedlings of indicator and differential species infected with the virus associated with yellow mottle symptoms in husk tomato, was positive only when alfalfa mosaic virus antiserum was used.

Considering the data obtained in the separation and characterization of the causal agent of husk tomato yellow mottle, it was found that this disease is caused by a common strain of alfalfa mosaic virus. This disease has been observed widely distributed in commercial husk tomato fields in the States of México, Morelos, Puebla, Tlaxcala, and Hidalgo, rainfed and irrigated. Its incidence was greater in irrigated fields in March and April and decreased in May and June in rainfed fields when, frequently, the infections are caused by viruses such as TMV, CMV, TEV and TSWV, which are relatively easier to separate than AMV (De la Torre *et al.*, 1998).

With serology and mechanical transmission, it was determined that alfalfa mosaic virus survives in other crops adjacent to husk tomato, such as alfalfa, broad bean, cilantro, and wild tobacco (*Nicotiana glauca* L.) (data not shown). This situation should be evaluated because of the wide range of hosts that can become infected by this virus and the potential damage it can cause in susceptible crop species in México.

CONCLUSIONS

The disease husk tomato yellow mottle is caused by a single-stranded RNA virus and is mechanically transmissible to a wide range of hosts and by the aphid *Myzus persicae* with an efficiency of 100% in greenhouse tests. Characterization by serology, electron microscopy, and double-stranded RNA analysis indicated that this disease is caused by a common strain of alfalfa mosaic virus, genus Alfamovirus, belonging to the Bromoviridae family.

Although other viruses in husk tomato plants were frequently isolated, none of them caused yellow mottle

mosaico de la alfalfa, género Alfamovirus, perteneciente a la familia Bromoviridae.

Aunque fue frecuente el aislamiento de otros virus en plantas de tomate de cáscara, ninguno de ellos causó la enfermedad del moteado amarillo en pruebas de transmisión mecánica en plantas sanas de tomate de cáscara producidas en el invernadero.

La enfermedad moteado amarillo del tomate de cáscara, se encontró ampliamente distribuida en parcelas comerciales del cultivo en la región centro de México, y el virus mosaico de la alfalfa se detectó en otros cultivos y malezas comunes en la región.

LITERATURA CITADA

- Ball, E. 1990. Double diffusion. *In*: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. Hampton, R., E. Ball, S. De Boer. (eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 101 p.
- Bos, L. 1978. Symptoms of Virus Diseases in Plants. Research Institute for Plant Protection. Wageningen, The Netherlands. pp: 40-151.
- Bos, L., and J. E. M. Jaspar. 1971. Alfalfa Mosaic Virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. Boletín No 46 pp: 1-4.
- Brakke, M. 1990. Antigens. 1. Viral. *In*: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. Hampton, R., E. Ball, S. De Boer. (eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 15.
- Brunt, A. A., K. Crabtree, J. Dallwitz, M., J. Gibbs, A., L. Watson, and J. Zurcher, E. (eds.). 1996. Plant Viruses Online: description and Lists from the VIDE database. Versión: 16th January 1997. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid>
- Clark, M. F., and M. A. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Dijkstra, J., and P. C. De Jager. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Springer, Berlin. 459 p.
- Dimmock, N.J., and B. S. Primrose. 1994. Introduction to Modern Virology. 4th Edition. Blackwell Science.
- De la Torre, A. R., D. Téliz O., B. Barrón R., E. Cárdenas S., E. García L., M. 1998. Identificación de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16(1): 1-11.
- De La Torre, A. R., Valverde, A. R., Méndez, L. J., Ascencio, I. T. J., Rivera, B. F. R. 2002. Caracterización preliminar de geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Agrociencia* 36 (4): 471-481.
- Francki, R. I. B. 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology Supplementum* 2: 392.
- Hampton, R., E. Ball, S. De Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 389 p.
- Jaspar, E. M. J. 1980. Alfalfa Mosaic Virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. Boletín No 229. (No 46 revised). 4 p.
- Kurstak, E. 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 935 p.
- Mata, R. J. J. 1968. Identificación del virus del mosaico de la alfalfa en la Región de Chapingo. Tesis. Escuela Nacional de Agricultura. 37 p.
- May, B. W. 1985. Virology. A Practical Approach. Oxford University Press. pp: 5-7.
- Méndez, L. J., B. F. R., Rivera, C. M., Fauquet, and A. R. De La Torre. 2001. Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus are geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in México. *Plant Disease* 85: 1291.
- Smith, M. K., 1957. A Textbook of Plant Virus Diseases. J. & A. Churchill. pp: 5-15.
- Smith, M. K., 1980. Introduction to Virology. Chapman and Hall. pp: 5-53.
- Valverde, R. A., T. S. Nameth, and L. R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Diseases* 74: 255-258.
- Van Regenmortel, M. H. V. and Pinck, L. 1981. Alfalfa mosaic virus. *In*: Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis. Kurstak, E. (ed.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp: 415-421.
- Vloten, Doting, L. V., and J. E. M. Jaspar. 1972. The uncoating of alfalfa mosaic virus by its own RNA. *Virology* 48: 699-708.

—End of the English version—

