

Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*

Identificación del *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima*

Omar Jacobo-Villegas, **María Teresa Colinas-León***, **Héctor Lozoya-Saldaña**, Departamento de Fitotecnia¹, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal², Departamento de Parasitología Agrícola³, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México; **Irán Alia-Tejacal**, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos, México; **Moisés Camacho-Tapia**², **Santos Gerardo Leyva-Mir**³; **Juan Manuel Tovar-Pedraza**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. **Mónica Pérez-Nicolás**¹. *Autor para correspondencia: lozcol@gmail.com.

Recibido: 08 de Junio, 2020.

Aceptado: 02 de Agosto, 2020.

Jacobo-Villegas O, Colinas-León MT, Lozoya-Saldaña H, Alia-Tejacal I, Camacho-Tapia M, Leyva-Mir SG, Tovar-Pedraza JM and Pérez-Nicolás M. 2020. Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 420-433.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2006-3

Primera publicación DOI: 20 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 20, 2020.

Resumen. En México, el *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) infecta dos variedades comerciales de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*); sin embargo, se desconoce la presencia del virus en otras variedades comercializadas en el país. Los objetivos de esta investigación fueron la identificación del PnMV en 20 variedades comerciales de nochebuena

Abstract. In Mexico, the *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) infects two commercial varieties of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), however, the presence of the virus in other varieties commercialized in the country is unknown. The objectives of this research were the identification of PnMV in 20 commercial varieties of poinsettia and evaluation of two buffer solutions in the mechanical transmission of PnMV to differential species. Virus identification was performed with serological and molecular tests. Four differential species (*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *Chenopodium amaranticolor*) were inoculated with PnMV. PnMV was identified by DAS-ELISA in the 20 commercial varieties, in 13 of them the presence was confirmed by RT-PCR. Warts and systemic chlorosis (phosphate solution + DIECA, pH 8.6) occurred in *N. benthamiana*. PnMV was detected in 100% of the commercial

y evaluación de dos soluciones amortiguadoras en la transmisión mecánica del PnMV a especies diferenciales. La identificación del virus se realizó con pruebas serológicas y moleculares. Se inocularon cuatro especies diferenciales (*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Chenopodium amaranticolor*) con PnMV. Se identificó a PnMV mediante DAS-ELISA en las 20 variedades comerciales, en 13 de ellas se corroboró la presencia por RT-PCR. En *N. benthamiana* se observaron ve­rrugas y clorosis sistémica (solución de fosfatos + DIECA, pH 8.6). Se detectó el PnMV en 100% de las variedades comerciales de nochebuena evalua­das con la técnica serológica DAS-ELISA, aunque solo el 35% mostró síntomas característicos de la infección viral. *N. benthamiana* presentó síntomas putativos a la infección por el virus, pero no se corroboró molecularmente.

Palabras clave: PnMV, virus-nochebuena, RT-PCR.

Las variedades comerciales de nochebuena son las plantas de maceta más vendidas en el mundo (Canul *et al.*, 2012). En el 2018 en Estados Unidos de América el valor de la producción del cultivo de nochebuena fue superior a los 148 millones de dólares (USDA, 2019). En este mismo año en México se produjeron 19 millones de plantas, con un valor de producción de 718 millones de pesos (SADER, 2019). El cultivo de nochebuena se encuentra ame­nazada por plagas y enfermedades, donde los virus tienen mayor importancia (Bertaccini *et al.*, 1996). Las variedades de nochebuena son hospedantes del *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) (Ma *et al.*, 2004) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), este último como el principal patógeno viral del cultivo y con distribución mundial (Clarke *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2010).

varieties of poinsettia evaluated with the DAS-ELISA serological technique, although only 35% of them showed the characteristic symptoms of viral infection. *N. benthamiana* presented putative symptoms to virus infection but was not molecularly corroborated.

Key words: PnMV, poinsettia-virus, RT-PCR.

The commercial varieties of poinsettia are the bestselling pot plants worldwide (Canul *et al.*, 2012). In 2018, the value of poinsettia production in the United States of America reached more than 148 million dollars (USDA, 2019). In the same year, 19 million plants were produced in Mexico, valued at 718 million Mexican pesos (SADER, 2019). Poinsettia cropping is threatened by pests and diseases, and those caused by viruses are the most important (Bertaccini *et al.*, 1996). Poinsettia varieties are hosts of *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) (Ma *et al.*, 2004) and *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), of which *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) is the most important and widely distributed poinsettia viral pathogen in the world (Clarke *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2010).

Commercial poinsettia varieties infected with PnMV usually show leaf mosaic symptoms and mottling, as well as foliar deformation that includes the bracts, but some plants can be asymptomatic (Fulton and Fulton, 1980; Lebas *et al.*, 2007). When infections are severe, the PnMV interferes with the process of bract pigmentation, poinsettias' main attractive feature, and puts the production of the crop at risk (Brunt *et al.*, 1996). In Mexico, PnMV infects wild poinsettia plants, backyard plants, and the 'Freedom' and 'Red Prestige' commercial varieties (Jacobo *et al.*, 2015; Ocampo *et al.*, 2013). However, the presence of PnMV has not been detected on other varieties cultivated in

Las variedades comerciales de nochebuena infectadas con el PnMV presentan comúnmente síntomas de mosaico y moteado en las hojas, así como deformación foliar incluyendo brácteas, algunas plantas pueden ser asintomáticas (Fulton y Fulton, 1980; Lebas *et al.*, 2007). En infecciones severas el PnMV interfiere en el proceso de pigmentación de las brácteas, atractivo principal de la nochebuena, poniendo en riesgo la producción del cultivo (Brunt *et al.*, 1996). En México, el PnMV infecta plantas de nochebuena silvestre, de traspatio y las variedades comerciales 'Freedom' y 'Red Prestige' (Jacobo *et al.*, 2015; Ocampo *et al.*, 2013); no obstante, se desconoce la presencia de este virus en otras variedades que se comercializan en el país. Una de las limitantes en el estudio biológico del PnMV es el bajo porcentaje de éxito en la transmisión mecánica del virus en especies diferenciales (0-10%) (Guy *et al.*, 1985). Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron la identificación del PnMV en 20 variedades comerciales de nochebuena y evaluación de dos soluciones amortiguadoras en la transmisión mecánica del PnMV en especies diferenciales. Las hipótesis fueron que las variedades de nochebuena que se comercializan en México se encuentran infectadas con el PnMV, y que al menos una solución amortiguadora es adecuada para transmitir mecánicamente el PnMV a especies diferenciales.

En diciembre de 2016-2018, se adquirieron plantas asintomáticas (A) y con síntomas (S) putativos a virus de 20 variedades comerciales de nochebuena (100% pigmentadas), en un vivero ubicado en Texcoco, Estado de México. Las ventajas de adquirir los materiales en esta temporada invernal son la diferenciación total de brácteas y presencia de hojas desarrolladas en las plantas, lo que facilita la observación de los síntomas virales. El material vegetal (esquejes enraizados) provenía de las empresas florícolas Floraplant® y Vivero

the country. One of the limitations in the biological study of PnMV is the low success rate of the mechanical transmission of the virus to differential species (0-10%) (Guy *et al.*, 1985). Based on the above, the objectives of this research were to identify the PnMV in 20 commercial poinsettia varieties and evaluate two buffer solutions in the mechanical transmission of PnMV to differential species. The hypotheses formulated were that the poinsettia varieties commercialized in Mexico are infected with PnMV and that at least one buffer solution is adequate for transmitting PnMV by mechanical means to differential species.

In December 2016-2018, asymptomatic plants (A) and plants with putative virus symptoms (S) of 20 commercial poinsettia varieties (100% pigmented) were obtained from a greenhouse located in Texcoco, State of Mexico. The advantages of obtaining materials in the winter season are the total differentiation of bracts and the presence of developed leaves on the plants, which makes it easier to observe the viral symptoms. The plant material (rooted cuttings) came from the flower companies Floraplant® and Vivero Internacional de México® that import plant material mainly from the United States.

The total number of pot plants that were obtained of each variety depended on the availability of the plant material. The varieties and the number of plants each year were: 2016: 'Silverstar Marble' (three plants, A), 'Silverstar Red' (two plants, A), 'Sparkling Punch' (one plant, S), 'Ice Punch' (three plants, A), 'Marblestar' (two plants, A), 'Cortez Electric Fire' (one plant, A), 'Carousel Dark Red' (one plant, A) and 'Primero White' (six plants, A); 2017: 'Cortez Red' (two plants, S), 'Enduring Marble' (two plants, S), 'Freedom Pink' (two plants, A), 'Monet Early' (two plants, A), 'Polar Bear' (two plants, S), 'Premier Pink' (two plants, A), 'Viking Cinnamon' (two plants, A), 'Winter

internacional de México[®], empresas que importan el material vegetal de Estados Unidos de América principalmente.

El número total de plantas en maceta adquiridas de cada variedad estuvo condicionado por la disponibilidad del material vegetal. Las variedades y número de plantas adquiridas en cada año fueron: 2016: ‘Silverstar Marble’ (tres plantas, A), ‘Silverstar Red’ (dos plantas, A), ‘Sparkling Punch’ (una planta, S), ‘Ice Punch’ (tres plantas, A), ‘Marblestar’ (dos plantas, A), ‘Cortez Electric Fire’ (una planta, A), ‘Carousel Dark Red’ (una planta, A) y ‘Primero White’ (seis plantas, A); 2017: ‘Cortez Red’ (dos plantas, S), ‘Enduring Marble’ (dos plantas, S), ‘Freedom Pink’ (dos plantas, A), ‘Monet Early’ (dos plantas, A), ‘Polar Bear’ (dos plantas, S), ‘Premier Pink’ (dos plantas, A), ‘Viking Cinnamon’ (dos plantas, A), ‘Winter Rose Early Red’ (dos plantas, S) y ‘Winter Rose White’ (dos plantas, A); 2018: ‘Amaris Hot Pink’ (11 plantas, S), ‘Primero Red Glitter’ (seis plantas, S) y ‘Orange Spice’ (seis plantas, A). Las plantas se establecieron en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la UACH. Se mantuvieron a temperaturas de 22 °C en el día y 15 °C en la noche, con un fotoperiodo de 11-12 h, y se manejaron agrónomicamente como lo indica Cabrera *et al.* (2006). Se tomaron muestras de hojas jóvenes, brácteas y tallos de todas las variedades y se mantuvieron refrigeradas a -20 °C para su posterior análisis.

Las pruebas serológicas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, en diciembre de 2019. Se realizó el diagnóstico con el método DAS-ELISA utilizando anticuerpos policlonales para la detección del PnMV, adquiridos con la empresa Agdia[®] (número de catálogo SRA 90700/0500). En cada variedad de nochebuena se realizó el análisis por duplicado (dos muestras por planta de cada variedad), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Las muestras consistieron en 0.5 g

Rose Early Red’ (two plants, S) and ‘Winter Rose White’ (two plants, A); 2018: ‘Amaris Hot Pink’ (11 plants, S), ‘Primero Red Glitter’ (six plants, S) and ‘Orange Spice’ (six plants, A). The plants were established in the Floriculture greenhouse of the Plant Breeding Department of Chapingo Autonomous University (UACH, its acronym in Spanish), kept at 22 °C temperature during the day and 15 °C at night, with a photoperiod of 11-12 h, and agronomically managed as indicated by Cabrera *et al.* (2006). Samples of young leaves, bracts, and stems of all the varieties were taken and kept in refrigeration at -20 °C until they were analyzed.

The serological tests were conducted at the National Research Laboratory and Agri-Food and Forestry Service, in December 2019. The diagnosis was made using the DAS-ELISA method with polyclonal antibodies to detect PnMV; the polyclonal antibodies were purchased from Agdia[®] (catalog number SRA 90700/0500). The analysis of each poinsettia variety was conducted in duplicate (two samples per plant of each variety), according to the manufacturer’s protocol. The samples consisted of 0.5 g of young leaves which were individually macerated in sterile mortars using liquid nitrogen. The samples placed on sensitized plates with the enzymatic conjugate were incubated at 4 °C for 12 h. The ‘Red Prestige’ commercial variety, provided by the UACH’s Agricultural Virology Laboratory, was used as the positive control, and a wild poinsettia plant collected in Tehuilotepic, Guerrero, as the negative control.

The absorbance values were measured at 405 nm using a Varioskan Flash Thermo Scientific[®] microplate reader 60 min after incubation. According to Ruiz *et al.* (2009), samples with values higher than three times the means of the negative control were considered positive.

The molecular tests were conducted at the Agricultural Virology Laboratory of UACH’s

de hojas jóvenes, maceradas individualmente en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido. Las muestras depositadas en las placas sensibilizadas con el conjugado enzimático se incubaron a 4 °C durante 12 h. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' (proporcionada por el Laboratorio de Virología Agrícola de la UACH.) y como control negativo una planta de nochebuena silvestre (recolectada en Tehuilotepic, Guerrero).

Los valores de absorbancia se midieron a 405 nm en un lector de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific® a los 60 min de incubación. De acuerdo con Ruiz *et al.* (2009) se consideraron positivas las muestras con valores mayores a tres veces la media del testigo negativo.

Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Virología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH. La extracción del ARN total se realizó con el reactivo PureLink™ Plant ARN Reagent (número de catálogo 12322012) de la empresa Thermo Fisher Scientific®, de acuerdo con el protocolo señalado por el fabricante. De cada variedad de nochebuena se tomaron muestras de 0.1 g de tejido vegetal en hojas jóvenes, tallos y/o brácteas, se maceraron individualmente con nitrógeno líquido en morteros estériles, cada macerado se depositó en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) adicionando 500 µL de la solución de lisis. Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante 2 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se mezclaron con 100 µL de cloruro de sodio 5 M y 300 µL de cloroformo, se centrifugaron durante 10 min y se recuperó la parte superficial, y se adicionaron 1.5 volúmenes de isopropanol (en relación al recuperado) y se incubaron a -4 °C durante 12 h. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente durante 10 min, la limpieza del ARN se realizó con etanol al 70%, finalmente la pastilla del ARN se diluyó en agua libre de nucleasas (Promega®) y se almacenó a -20 °C.

Department of Agricultural Parasitology. The extraction of total RNA was carried out using the PureLink™ Plant RNA Reagent (catalog number 12322012) from the Thermo Fisher Scientific® company, according to the manufacturer's protocol. From each poinsettia variety, samples of 0.1 g of plant tissue from young leaves, stems and/or bracts were taken and individually macerated with liquid nitrogen in sterile mortars, and then each macerate was placed in a microcentrifuge tube (1.5 mL) to which 500 µL of lysis solution were added. The samples were centrifuged at 12,000 x g for 2 min at 4 °C, the supernatant was recovered and mixed with 100 µL of 5 M sodium chloride and 300 µL of chloroform, and centrifuged for 10 min; the superficial part was recovered, and 1.5 volumes of isopropanol were added (relative to what was recovered) and incubated at -4 °C for 12 h. Then, the samples were centrifuged again for 10 min; RNA cleanup was performed with 70% ethanol; and, finally, the RNA tablet was diluted in water free of nucleases (Promega®) and stored at -20 °C.

The concentration of the total RNA was determined in a NanoDrop ThermoFisher Scientific® spectrophotometer, while RNA integrity was verified in 1% p/v agarose gel electrophoresis (120V/60 min) and visualized in a Quantum Studio® photodocumenter. To determine RNA viability, one fragment of the 18S ribosomal gene was amplified using the primers 18S-F (5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3') and 18S-R (5'-ACCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'), which amplify a 300 pb fragment, according to the RT-PCR conditions indicated by Zamboni *et al.* (2008).

To detect PnMV on the poinsettia varieties, a fragment of the virus capsid protein was amplified with the specific primers PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGTTCTTCT-3') and PnMV-R (5'-GAGCCGGCGACTCCAT CCA-3'),

Se determinó la concentración del ARN total en un espectrofotómetro NanoDrop ThermoFisher Scientific®, y se corroboró su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v (120V/60 min), visualizado en un fotodocumentador Quantum Studio®. Para determinar la viabilidad del ARN se amplificó un fragmento del gen ribosomal 18S, con los iniciadores 18S-F (5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3') y 18S-R (5'-ACCA-GACTTGCCCTCCAATGG-3'), que amplifican un fragmento de 300 pb, de acuerdo con las condiciones de RT-PCR señaladas por Zamboni *et al.* (2008).

Para la detección del PnMV en las variedades de nochebuena, se amplificó un fragmento de la proteína de la cápside del virus, con los iniciadores específicos PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCCG-TTCTTCT-3') y PnMV-R (5'-GAGCCGGCGA-CTCCATCCA-3') que amplifican un fragmento de 700 pb y se llevó bajo las condiciones de RT-PCR señaladas por Ocampo *et al.* (2013). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v (120V/60 min). Los iniciadores utilizados en las pruebas moleculares (18S-F, 18S-R, PnMV-F y PnMV-R) se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' y como control negativo una planta de *Nicotiana clevelandii*, en ambos casos se utilizó tejido foliar para el análisis.

Los productos de RT-PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen en Corea y se compararon con las registradas en el GenBank para el PnMV, usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Por otro lado, se realizó inoculación mecánica del PnMV en plantas diferenciales de *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Chenopodium amaranticolor*; a los 60 días después de la emergencia de las plantas. El inóculo se obtuvo

which amplify a 700 pb fragment. This procedure was carried out under the RT-PCR conditions indicated by Ocampo *et al.* (2013). The RT-PCR amplified fragments were analyzed using 2% p/v agarose gel electrophoresis (120V/60 min). The primers used in the molecular tests (18S-F, 18S-R, PnMV-F and PnMV-R) were synthesized at the UNAM's Institute of Biology in Cuernavaca, Morelos. The 'Red Prestige' commercial variety was used as the positive control., and one plant of *Nicotiana clevelandii* as the negative control; foliar tissue was used for the analysis in both cases.

The RT-PCR fragments were sent to Macrogen, in Korea, for sequencing, and then compared to those recorded for PnMV in the GenBank using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

On the other hand, PnMV was mechanically inoculated in differential plants of *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *Chenopodium amaranticolor* 60 days after plant emergence. The inoculum was obtained from the PnMV positive commercial varieties that were analyzed using RT-PCR, except 'Amaris Hot Pink', and for this reason, there were 12 inoculum sources. Two buffer solutions were used: Phosphates buffer + DIECA (diethyldithiocarbamic acid) with pH 8.6, and Na phosphates (mono and dibasic) with pH 7.8, in order to increase the success rate of the virus transmission due to its low transmission rate in differential species (Chung *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 1985). To prepare the viral solutions and inoculate differential plants, the methodology described by Jacobo *et al.* (2015) was used. Young leaves of each inoculum source were individually macerated in a sterile mortar to which the corresponding buffer in a 1/10 p/v ratio was added. Twenty-four plants per differential species were inoculated: two plants per inoculum source (one for each buffer solution). Two plants were established as negative controls in each species and inoculated only with each of

de las variedades comerciales positivas al PnMV analizadas por RT-PCR, exceptuando ‘Amaris Hot Pink’, por lo que se tuvieron 12 fuentes de inóculo. Se utilizaron dos soluciones amortiguadoras: amortiguador de Fosfatos + DIECA (ácido dietilditiocarbámico) con pH 8.6 y amortiguador de Fosfatos de Na (mono y dibásico) con pH 7.8, con la finalidad de incrementar el porcentaje de éxito en la transmisión del virus, debido a su baja tasa de transmisión en especies diferenciales (Chung *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 1985). Para preparar las soluciones virales e inoculación de las plantas diferenciales se siguió la metodología descrita por Jacobo *et al.* (2015), se maceraron individualmente hojas jóvenes de cada fuente de inóculo en un mortero estéril y se adicionó el amortiguador respectivo en relación 1/10 p/v. Se inocularon 24 plantas por especie diferencial: dos plantas por fuente de inóculo (una para cada solución amortiguadora). Se establecieron dos plantas como testigos negativos en cada especie, inoculadas únicamente con cada una de las soluciones amortiguadoras. Utilizando un hisopo estéril embebido con la solución viral o solución amortiguadora (testigos negativos) se frotaron de 4 a 5 hojas jóvenes por planta diferencial, asperjadas previamente con carborundum de 600 mallas.

Los materiales inoculados se mantuvieron en observación en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la UACH. Estos materiales no se fertilizaron. A los 60 días después de la inoculación (ddi) todos los materiales se analizaron molecularmente para determinar la transmisión del PnMV (de acuerdo con la metodología antes descrita para la extracción de ARN y RT-PCR en las variedades comerciales de nochebuena).

Las variedades comerciales de nochebuena que se observaron asintomáticas en el momento de su adquisición permanecieron sin cambios aparentes en el invernadero y representaron el 65% de la población evaluada. De acuerdo con Lebas *et al.*

the buffer solutions. Then 4-5 young leaves per differential plant that had been previously sprayed with 600 mesh carborundum, were rubbed with the viral solution or buffer solution (negative controls) using a sterile cotton swab.

The inoculated materials were kept under observation in the Floriculture greenhouse of UACH's Plant Breeding Department. These materials were not fertilized. Sixty days after inoculation (dai), all the materials were molecularly analyzed to determine the transmission of PnMV (according to the previously described methodology used to extract RNA and RT-PCR from the commercial poinsettia varieties).

The commercial poinsettia varieties with no symptoms when they were bought had no apparent changes during the time they were kept in the greenhouse and accounted for 65% of the evaluated population. According to Lebas *et al.* (2007), PnMV sometimes does not induce symptoms in infected plants, which would explain the “healthy appearance” of these varieties. 35% of the poinsettia population showed putative virus symptoms from the time when they were bought and while kept in the greenhouse (approximately 1 year). The symptoms were mosaic, mottling, chlorosis, and foliar deformation. Carballo *et al.* (2001) and Chung *et al.* (2004) mentioned that these symptoms are characteristic of poinsettia varieties infected with PnMV. The ‘Enduring Marble’ variety showed rib yellowing, a secondary symptom that Bertaccini *et al.* (1996) associated with PnMV infection. The bracts of variety ‘Primero Red Glitter’ were severely deformed and not totally pigmented, and according to Brunt *et al.* (1996), these symptoms are associated with PnMV infection (Figure 1).

The absorbance values (DAS-ELISA) of all the commercial varieties were higher than those of the detection limit (DL). The average absorbance values were between 0.908 and 1.837. ‘Monet

(2007) el PnMV en ocasiones no induce síntomas en las plantas infectadas, lo que explicaría la “aparición sana” en estas variedades. El 35% de la población de nochebuenas presentó síntomas putativos a virus desde el momento de su adquisición y durante su permanencia en el invernadero (1 año aproximadamente). En estas plantas se observaron síntomas de mosaico, moteado, clorosis y deformación foliar. Carballo *et al.* (2001) y Chung *et al.* (2004) mencionan que estos síntomas son característicos en variedades de nochebuena infectadas con PnMV. En la variedad ‘Enduring Marble’ se presentó amarillamiento de nervaduras, Bertaccini *et al.* (1996) asocia este síntoma secundario a la infección por el virus. En ‘Primero Red Glitter’ las brácteas presentaron deformaciones severas y no se pigmentaron en su totalidad, de acuerdo con Brunt *et al.* (1996) estos síntomas se asocian a la infección del PnMV (Figura 1).

‘Early’ had the highest absorbance values, while ‘Sparkling Punch’ had lower values. The results of the serological analysis indicated that 100% of the plants were infected with the PnMV virus.

The amplification of the fragment of the 18S ribosomal gene with the RNA obtained from the commercial varieties ensured RNA viability in the molecular tests. PnMV was identified using the RT-PCR technique with specific primers. The presence of the virus was confirmed in 13 varieties: symptomatic: ‘Sparkling Punch’, ‘Amaris Hot Pink’, ‘Polar Bear’, ‘Primero Red Glitter’ and ‘Winter Rose Early Red’; and asymptomatic: ‘Silverstar Marble’, ‘Silverstar Red’, ‘Ice Punch’, ‘Marblestar’, ‘Cortez Electric Fire’, ‘Carousel Dark Red’, ‘Primero White’ and ‘Monet Early’ (Table 1), by amplifying the expected fragment. PnMV was molecularly identified in 65% of the evaluated varieties; the virus was identified in different plant

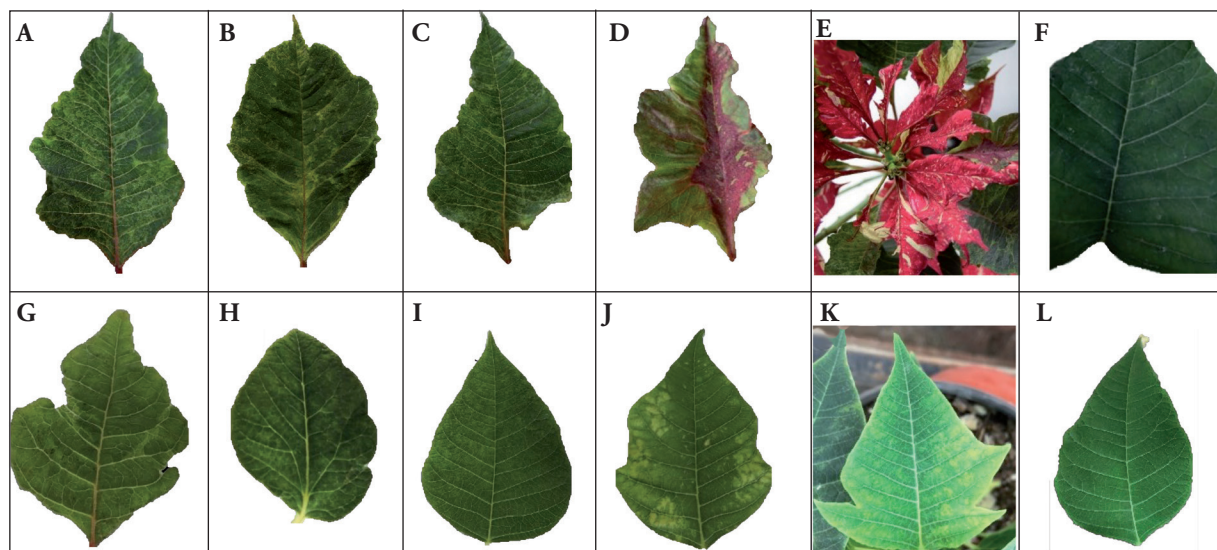


Figura 1. Síntomas putativos a virus en variedades comerciales de nochebuena. A-E) ‘Primero Red Glitter’; A-C): deformación de la lámina foliar y mosaico clorótico; D): bráctea deforme (en proceso de diferenciación); E): conjunto de brácteas con deformación severa; F) ‘Winter Rose Early Red’, mosaico; G): ‘Cortez Red’, deformación y mosaico; H): ‘Enduring Marble’, clorosis y amarillamiento de nervaduras; I y J) ‘Polar Bear’; I): clorosis; J): moteado; K) ‘Sparkling Punch’, manchas cloróticas; L): ‘Primero White’ hoja asintomática.

Figure 1. Putative virus symptoms in commercial poinsettia varieties. A-E) ‘Primero Red Glitter’; A-C): foliar blade deformation and chlorotic mosaic; D): deformed bract (in differentiation process); E): cluster of severely deformed bracts; F) ‘Winter Rose Early Red’, mosaic; G): ‘Cortez Red’, deformation and mosaic; H): ‘Enduring Marble’, chlorosis and rib yellowing; I and J) ‘Polar Bear’; I): chlorosis; J): mottling; K) ‘Sparkling Punch’, chlorotic spots; L): ‘Primero White’ asymptomatic leaf.

Los valores de absorbancia (DAS-ELISA) presentados en todas las variedades comerciales fueron superiores al límite de detección (LD). Los valores promedios de absorbancia en las variedades estuvieron entre 0.908 y 1.837. ‘Monet Early’ presentó los valores mayores de absorbancia, mientras que ‘Sparkling Punch’ presentó valores menores. Los resultados serológicos indicaron que el 100% de las plantas estuvieron infectadas con el virus PnMV.

La amplificación del fragmento del gen ribosomal 18S con el ARN obtenido en las variedades comerciales garantizó la viabilidad del ARN en las pruebas moleculares. Se realizó RT-PCR con los iniciadores específicos para la identificación del PnMV. Se corroboró la presencia del virus en 13 variedades: sintomáticas: ‘Sparkling Punch’, ‘Amaris Hot Pink’, ‘Polar Bear’, ‘Primero Red Glitter’ y ‘Winter Rose Early Red’; y asintomáticas: ‘Silverstar Marble’, ‘Silverstar Red’, ‘Ice Punch’, ‘Marblestar’, ‘Cortez Electric Fire’, ‘Carousel Dark Red’, ‘Primero White’ y ‘Monet Early (Cuadro 1), mediante la amplificación del fragmento esperado. Se identificó molecularmente al PnMV en 65% de las variedades evaluadas, la identificación del virus en diferentes tejidos de la planta se realizó para disminuir el riesgo de obtener falsos positivos, por falta de carga viral en determinados tejidos. Mediante las pruebas serológicas y moleculares se identificó al PnMV tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas, estos resultados evidencian que el virus puede estar presente en las plantas de nochebuena sin inducir síntomas, como lo mencionan Lebas *et al.* (2007) lo que representa una fuente de inóculo latente del patógeno, poniendo en riesgo la sanidad de las plantas en la producción del cultivo.

Las secuencias de ADN del PnMV obtenidas en 11 de las variedades comerciales tuvieron porcentajes de similitud del 95-98% con la secuencia de un aislamiento del virus reportado en Japón con número de accesoión AB550788.1. De acuerdo con

tissues in order to reduce the risk of obtaining false positives due to the lack of viral load in certain tissues. PnMV was identified through serological and molecular tests in both symptomatic and asymptomatic plants, and the results showed that the virus may be present in poinsettia plants without inducing symptoms, as mentioned by Lebas *et al.* (2007), which is a latent source of pathogenic inoculum that puts the plant’s health at risk during crop production.

The DNA sequences of PnMV obtained from 11 of the commercial varieties had 95-98% similarity with the sequence of a virus isolate reported in Japan with accession number AB550788.1. According to Jacobo *et al.* (2015), the DNA sequences obtained from the virus in the ‘Freedom’ and ‘Red Prestige’ varieties were aligned with this sequence with 92% similarity. ‘Marblestar’ had 97% similarity with the DNA sequence of the virus reported in Germany with accession number AJ271595.1. The amplicon obtained from ‘Amaris Hot Pink’ was not sent for sequencing.

The *N. benthamiana* plants that were inoculated with PnMV (phosphates + DIECA solution) had warts, systemic chlorosis, foliar deformation and chlorotic spots on the leaves (Figure 2); these symptoms are in agreement with those described by Lebas *et al.* (2007), who inoculated plants of this species with the virus and observed warts and systemic chlorosis on the leaves. The plants that were inoculated with PnMV using a Na phosphates buffer (mono and dibasic) had no symptoms, possibly due to the incompatibility of the buffer and the virus. According to Guy (1985), PnMV has a 0-10% success rate in the mechanical transmission of the virus.

In the particular case of *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *C. amaranticolor*, no differences were observed in the expressed symptoms compared to the use of the buffer solutions. *N. glutinosa*

Cuadro 1. Resultados de las pruebas serológicas y moleculares en la identificación del PnMV en variedades comerciales de nochebuena.**Table 1. Results of the serological and molecular tests used to identify PnMV in commercial poinsettia varieties.**

	Variedad comercial	Tejido analizado	No. plantas analizadas	RT-PCR	DAS-ELISA ^z
1	'Silverstar Marble'	HJ	3	(+)	(+)
2	'Silverstar Red'	HJ	2	(+)	(+)
3	'Sparkling Punch'	HJ	1	(+)	(+)
4	'Ice Punch'	HJ, T	3	(+)	(+)
5	'Marblestar'	HJ, T	2	(+)	(+)
6	'Cortez Electric Fire'	HJ	1	(+)	(+)
7	'Carousel Dark Red'	HJ	1	(+)	(+)
8	'Primero White'	HJ	6	3 ^y (+)	(+)
9	'Amaris Hot Pink'	HJ	11	7 ^y (+)	(+)
10	'Cortez Red'	HJ	2	(-)	(+)
11	'Enduring Marble'	HJ	2	(-)	(+)
12	'Freedom Pink'	HJ, T	2	(-)	(+)
13	'Monet Early'	HJ	2	(+)	(+)
14	'Polar Bear'	HJ, BR	2	(+)	(+)
15	'Premier Pink'	HJ, BR	2	(-)	(+)
16	'Primero Red Glitter'	HJ	6	3 ^y (+)	(+)
17	'Viking Cinammon'	HJ	2	(-)	(+)
18	'Winter Rose Early Red'	HJ	2	(+)	(+)
19	'Whinter Rose White'	HJ	2	(-)	(+)
20	'Orange Spice'	HJ, BR, T	6	(-)	(+)

Abreviaturas en la tabla. Tejido analizado. HJ: Hojas Jóvenes; T: Tallo; BR: Brácteas. Resultados. (+): positivo; (-): negativo; ^y: indica el número de plantas positivas en relación con el número total de plantas analizadas. ^z: Se analizaron únicamente hojas jóvenes. Variedad comercial. (1, 2, 4-7, 10, 12): Material vegetal de la empresa Vivero Internacional de México[®]; (3, 8, 9, 11, 13-20): Material vegetal de la empresa Floraplant[®] / Abbreviations in the table. Analyzed tissue. HJ: Young leaves; T: Stem; BR: Bracts. Results. (+): positive; (-): negative; ^y: indicates the number of positive plants compared to the total number of analyzed plants. ^z: Only young leaves were analyzed. Commercial variety. (1, 2, 4-7, 10, 12): Plant material from the company Vivero Internacional de México[®]; (3, 8, 9, 11, 13-20): Plant material from the Floraplant[®] company.

Jacobo *et al.* (2015) las secuencias de ADN obtenidas del virus en las variedades 'Freedom' y 'Red Prestige' se alinearon a esta misma secuencia con porcentajes de similitud del 92%. En 'Marblestar' se obtuvo un porcentaje de similitud del 97% con la secuencia de ADN del virus reportado en Alemania con número de accesión AJ271595.1. El amplicón obtenido en 'Amaris Hot Pink' no se mandó a secuenciar.

Las plantas de *N. benthamiana* que se inocularon con el PnMV (solución de fosfatos + DIECA)

showed light mosaic symptoms that were attributed to virus transmission. The *N. clevelandii* plants had chlorosis symptoms on the leaves, possibly in response to viral infection. The inoculated plants of *C. amaranticolor* had no symptoms (Figure 2).

All the differential plants that were inoculated with PnMV were analyzed using RT-PCR, and the results obtained were negative. The differential plants of *N. benthamiana*, *N. glutinosa* and *N. clevelandii* are reported as PnMV hosts, while *C. amaranticolor* is not susceptible to infection by this

presentaron verrugas, clorosis sistémica, deformación y puntos cloróticos en las hojas (Figura 2), estos síntomas coinciden con los descritos por Lebas *et al.* (2007) quienes al inocular plantas de esta especie con el virus observaron verrugas y clorosis sistémica en hojas. Las plantas inoculadas con PnMV utilizando el amortiguador de fosfatos de Na (mono y dibásico) se mostraron asintomáticas, posiblemente a la incompatibilidad del amortiguador con el virus. De acuerdo con Guy (1985) el PnMV presenta un porcentaje de éxito en la transmisión mecánica del 0-10%.

pathogen (Brunt *et al.*, 1996). Despite the negative results of the molecular tests, the symptoms observed on *N. benthamiana* can be attributed to PnMV infection, since according to Brunt *et al.* (1996), Floeistad and Blystad (1999) and Lebas *et al.* (2007), this species has been mechanically inoculated and the virus re-isolated; the authors also point out that this species is adequate for diagnosing the pathogen, because the plants that are inoculated with the virus are systemically infected.

The negative results of the RT-PCR tests for PnMV in the differentiated plants can be attributed

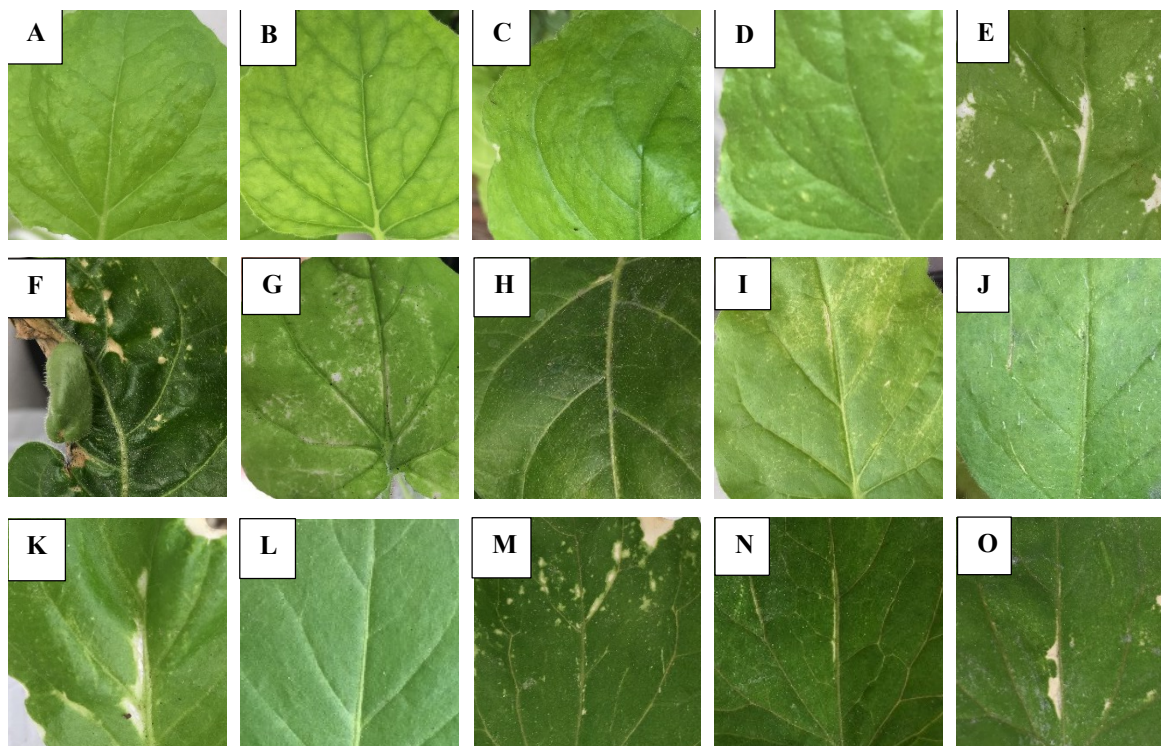


Figura 2. Síntomas observados en las plantas diferenciales inoculadas con el PnMV. A-E): *N. benthamiana*; A): verrugas; B): clorosis sistémica; C): deformación; D): puntos cloróticos; E): Testigo (-), daño mecánico; F-I): *N. glutinosa*; F): deformación; G): manchas blancas; H): mosaico ligero; I): Testigo (-), daño mecánico; J-L): *N. clevelandii*; J): clorosis; K): daño mecánico; L): Testigo (-), hoja sana; M-O): *C. amaranticolor*; M y N): daño mecánico; O): Testigo (-), daño mecánico.

Figure 2. Symptoms observed on differentiated plants inoculated with PnMV. A-E): *N. benthamiana*; A): warts; B): systemic chlorosis; C): deformation; D): chlorotic spots; E): Control (-), mechanical damage; F-I): *N. glutinosa*; F): deformation; G): white spots; H): slight mosaic; I): Control (-), mechanical damage; J-L): *N. clevelandii*; J): chlorosis; K): mechanical damage; L): Control (-), healthy leaf; M-O): *C. amaranticolor*; M and N): mechanical damage; O): Control (-), mechanical damage.

En el caso particular de *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *C. amaranticolor*, no se observaron diferencias en los síntomas expresados con respecto a la utilización de las soluciones amortiguadoras. En *N. glutinosa* se observaron síntomas de mosaico ligero atribuibles a la transmisión del virus. Las plantas de *N. clevelandii* presentaron síntomas de clorosis en las hojas, posiblemente como respuesta a infección viral. En *C. amaranticolor* las plantas inoculadas se mostraron asintomáticas (Figura 2).

Todas las plantas diferenciales inoculadas con el PnMV se analizaron por RT-PCR, los resultados obtenidos fueron negativos. Las plantas diferenciales de *N. benthamiana*, *N. glutinosa* y *N. clevelandii* están reportadas como hospedantes del PnMV, mientras que *C. amaranticolor* no es susceptible a la infección por este patógeno (Brunt *et al.*, 1996). A pesar de los resultados negativos en las pruebas moleculares, los síntomas observados en *N. benthamiana*, se puede atribuir a la infección del PnMV, ya que de acuerdo con Brunt *et al.* (1996), Floeistad y Blystad (1999) y Lebas *et al.* (2007) en esta especie se ha podido inocular mecánicamente y aislar el virus, y señalan esta especie como adecuada para el diagnóstico del patógeno, ya que las plantas inoculadas con el virus se infectan sistémicamente.

Los resultados negativos en las pruebas de RT-PCR del PnMV en las plantas diferenciales pueden atribuirse a la presencia de inhibidores, como se observó en las variedades comerciales de nochebuena, donde mediante las pruebas serológicas se obtuvieron resultados positivos (validados por los controles negativos y positivos) que no se pudieron corroborar molecularmente, Lebas *et al.* (2007) mencionan que las causas probables pueden ser la presencia de inhibidores y látex que dificultan la extracción de ARN, por lo que sugieren la identificación del virus mediante RT-PCR para caracterizar aislamientos y las pruebas DAS-ELISA para detección del patógeno.

to the presence of inhibitors, as was observed on the commercial poinsettia varieties, where using serological tests, positive results were obtained (validated by negative and positive controls) that could not be molecularly confirmed. Lebas *et al.* (2007) mentioned that the probable causes could be the presence of inhibitors and latex, which make it difficult to extract RNA, and suggest using RT-PCR to identify the virus and characterize isolates, and the DAS-ELISA tests to detect the pathogen.

Poinsettia mosaic virus was detected on 100% of the commercial poinsettia varieties using the DAS-ELISA serological technique, and on 65% using RT-PCR molecular tests. 35% of the varieties showed characteristic symptoms of viral infection, while 65% showed no symptoms. PnMV was identified in both symptomatic and asymptomatic plants. The origin of the plant material did not influence the results. The use of the buffer solution prepared with phosphates + DIECA, pH 8.6, to mechanically inoculate PnMV in *Nicotiana benthamiana* plants contributed to the development of putative virus infection symptoms but this was not molecularly confirmed.

Acknowledgments

The authors wish to thank CONACyT for the financial support provided for conducting this research.

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

Se detectó el *Poinsettia mosaic virus* en 100 % de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas con la técnica serológica DAS-ELISA y en 65% mediante pruebas moleculares RT-PCR. El 35% de las variedades mostró síntomas característicos de la infección viral, mientras que el 65%

fueron asintomáticas. La identificación del PnMV se obtuvo tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas. El origen del material vegetal no influyó en los resultados. El empleo de la solución amortiguadora de fosfatos + DIECA, pH 8.6 en la inoculación mecánica de PnMV en plantas de *Nicotiana benthamiana*, propició la aparición de síntomas putativos a la infección por el virus, pero no se corroboró molecularmente.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACyT por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- aus dem Siepen M, Pohl J, O, Koo BJ, Wege C and Jeske H. 2005. *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but anatural poleovirus-sobemovirus hybrid. *Virology* 336(2): 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.03.020>
- Bertaccini A, Vibio M and Bellardi MG. 1996. Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 35(2): 129-132. <https://www.jstor.org/stable/pdf/42685257.pdf?seq=1>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L and Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database. *Poinsettia mosaic tymovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/dесr633.htm> (consulta, mayo 2020).
- Cabrera RJ, Morán MF, Torres QR, Pellón BA y Granada CL. 2006. Producción de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch en Morelos. Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Folleto Técnico No. 23. Zacatepec, Mor., México. 20p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2912/PRODUCNO-CHBUENA.pdf?sequence=1>
- Canul KJ, García PF, Osuna CFJ y Ramírez RS. 2012. Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena. Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Folleto Técnico No. 64. Zacatepec, Mor., México. 39p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3553>
- Carballo O, Izaguirre ML and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* infecting poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease* 85(11): 1208. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1208D>
- Chung BN, Lee EK, Jeong MI and Kim HR. 2004. First report of *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20(3): 220-223. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2004.20.3.220>
- Clarke JL, Klemsdal SS, Floistad E, Hvoslef-Eide AK, Haugslie S, Moe R and Blystad DR. 2006. Genetic engineering of poinsettia with the aim of enhancing its resistance to *Poinsettia mosaic virus*. *Proc. XIth is on Virus Diseases in Ornamentals*. Ed. C.A. Chang. *Acta Horticulturae* 722: 321-325. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.40>
- Floistad E and Blystad DR. 1999. Two new hosts for *Poinsettia mosaic virus*. *Plant Disease* 83(4): 399. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30845606>
- Fulton RW and Fulton JL. 1980. Characterization of a tymo-like virus common in poinsettia. *Phytopathology* 70: 321-324. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n04\\_321.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n04_321.PDF)
- Guy P. 1985. New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *Australasian Plant Pathology* 14: 12-13. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO200411922981818.page>
- Jacobo VO, Valdovinos PG, Ramírez RS y Hernández JC. 2015. Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 219-231. <http://www.rmfm.smf.org.mx/ojs/index.php/RMF/article/view/15/16>
- 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(1): 110. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0110A>
- Ma XY, Cai JH, Li GX, Qin BX and Zhou XP. 2004. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal Phytopathology* 152(4): 215-218. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00832>
- 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. [http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/OCAMPO\\_OCAMPO.pdf](http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/OCAMPO_OCAMPO.pdf)
- Okano Y, Maejima K, Shiraishi T, Hashimoto M, Senshu H, Ozeki J, Takahashi S, Komatsu K, Yamaji Y and Namba S. 2010. Genetic heterogeneity found in the replicase gene of *Poinsettia mosaic virus* isolates. *Archives of Virology* 155: 1367- 1370. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0708-y>
- Ruiz GN, Mora AG, Rivas VP, Gongora CC, Loeza KE, Martínez OD, Ramírez VG, Gutiérrez EA y Álvarez RR. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 41-47. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2009000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100007)
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119](http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119) (consulta, mayo 2020).

United States Department of Agriculture (USDA). 2019. Floriculture Crops 2018. National Agricultural Statistics Service. 88 p. [https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays\\_Reports/reports/floran19.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/floran19.pdf)

Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. iForest 1(4): 122-125. <https://doi.org/10.3832/ifor0465-0010122>