

VARIACIÓN FENOTÍPICA DE ALGUNOS AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL VIRUS DE LA MARCHITEZ MANCHADA DEL TOMATE (TSWV)

PHENOTYPIC VARIATION OF SOME MEXICAN ISOLATES OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV)

Rodolfo De La Torre-Almaráz¹, Lourdes Cervantes-Díaz¹; Hobbs A. Houston² y Rodrigo Valverde²

¹Unidad de Biotecnología y Prototipos. ENEP-Iztacala. UNAM. 54090. Avenida de los Barrios s/n Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. (drodolfo@servidor.unam.mx). ²Department of Plant Pathology and Crop Physiology. Louisiana State University. 70803. Baton Rouge.

RESUMEN

Se detectó al virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV. Tospovirus) en plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), con síntomas de manchas necróticas en hojas, marchitez y necrosis generalizada, cultivadas en los Estados de México, Puebla y Morelos. La expresión de síntomas en hospedantes susceptibles al TSWV indicó la posible presencia de variantes de este virus. Los aislamientos de TSWV fueron ubicados como pertenecientes al patogruppo de lesiones locales (TSWV-PL), el menos patogénico del patogruppo, ya que estos aislamientos indujeron lesiones locales necróticas y desprendimiento de las hojas inoculadas, sin movimiento sistémico, únicamente en las líneas de *C. chinense* Jacquin PI-152225 y PI-159236, ambas resistentes a TSWV. Probablemente el patogruppo PL de TSWV es el más común en México, debido al comportamiento fenotípico (lesiones locales) de los aislamientos de TSWV en *C. chinense*.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, Bunyaviridae, resistencia.

INTRODUCCIÓN

El virus de la marchitez manchada del tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV) es considerado uno de los diez virus más importantes, por su distribución mundial y por los daños que causa a más de 650 especies de plantas. Dentro de sus hospedantes susceptibles se encuentran plantas de importancia agrícola como chícharo (*Pisum sativum*), cacahuete (*Arachys hypogaea*), chile (*Capsicum annuum*), papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), apio (*Apium graveolens*), y numerosas especies de plantas ornamentales como crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*), dalia (*Dahlia* sp.), gerbera (*Gerbera jamesonii*) e iris (*Iris* spp.) (Best, 1968).

El TSWV se ha encontrado en plantas silvestres perennes y anuales, las que funcionan como reservorios naturales y como fuentes de inóculo primario (Yudin *et al.*, 1988; Bond *et al.*, 1993). Desde 1980 ha ocurrido

ABSTRACT

Tomato spotted wilt virus (TSWV, Tospovirus) was detected in tomatillo (*Physalis ixocarpa*) plants, with symptoms of leaf spots, wilting, and generalized necrosis, grown in the states of México, Puebla and Morelos. Symptoms' expression in susceptible hosts indicated the possible presence of strains of this virus. The isolates of TSWV were identified as belonging to the group of localized lesion pathogens (TSWV-PL), the less pathogenic of the pathogroup, for they induced necrotic ring spots on and abscission of inoculated leaves, with no systemic movement, only in the *C. chinense* Jacquin PI-152225 and PI-159236 lines, both resistant to TSWV. The PL pathogroup of TSWV is probably the most common in México, due to the phenotypic behavior (localized lesions) of the isolates of TSWV on *C. chinense*.

Key words: *Capsicum annuum*, Bunyaviridae, resistance.

INTRODUCTION

Tomato spotted wilt virus (TSWV) is considered one of the ten most important viruses worldwide, on the basis of its distribution and the damage it causes in more than 650 plant species. Among its susceptible hosts are found important crops, such as peas (*Pisum sativum*), peanuts (*Arachys hypogaea*), pepper (*Capsicum annuum*), potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), celery (*Apium graveolens*), and numerous ornamentals, such as chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), dahlia (*Dahlia* sp.), gerbera (*Gerbera jamesonii*) and iris (*Iris* spp.) (Best, 1968).

TSWV has been found on wild perennial and annual plants, which function as natural reservoirs and sources of primary inoculants (Yudin *et al.*, 1988; Bond *et al.*, 1993). Since 1980, a rapid geographical distribution of TSWV has occurred, preceded by the dispersion of its main insect vector, thrips *Frankliniella occidentalis*, whose abundance and distribution has been associated with TSWV incidence (Reddy and Wightman, 1988; Goldbach and Peters, 1994).

TSWV belongs to the genus Tospovirus, which includes numerous species of virus transmitted by insect

Recibido: Julio, 2000. Aprobado: Marzo, 2002.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 36: 211-221. 2002.

una rápida distribución geográfica del TSWV, que fue precedida por la expansión de su principal insecto vector, el trips *Frankliniella occidentalis*, cuya abundancia y distribución se ha relacionado con la incidencia de TSWV (Reddy y Wightman, 1988; Goldbach y Peters, 1994).

El TSWV pertenece al género Tospovirus, que incluye numerosas especies de virus transmitidos por insectos vectores que infectan a humanos y animales (Francki *et al.*, 1991; Martelli, 1992). Se han obtenido numerosos aislamientos de probables tospovirus, no totalmente caracterizados, que podrían ser nuevas especies. TSWV no es la única especie dentro del género Tospovirus y continuamente se ha propuesto incluir otros aislamientos como nuevas especies, basándose en las diferencias en las características moleculares de la proteína de la cápside viral (De Avila *et al.*, 1993a).

Los aislamientos de tospovirus tienen un amplio número de hospedantes susceptibles, pero también inducen una amplia diversidad de síntomas en los mismos hospedantes (German *et al.*, 1992). Detecciones serológicas utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales, confirman que TSWV es, en la mayoría de los casos, el responsable de las infecciones en un gran número de hospedantes a nivel mundial (De Avila *et al.*, 1993b).

El virus de la marchitez manchada del tomate ha sido identificado en tomate (*L. esculentum*) en Sinaloa, México y desde entonces los daños por virus parecidos a tospovirus se han presentado e incrementado en tomate, chile y tabaco (De La Torre *et al.*, 1995).

Dada la dispersión mundial del TSWV y el amplio número de hospedantes susceptibles, es común suponer que diferentes aislamientos geográficos, o aislamientos obtenidos de diferentes hospedantes, podrían ser considerados como especies de este virus.

La clasificación de aislamientos de TSWV, considerando la variación de los síntomas expresados en los hospedantes inoculados, tiene importancia como un parámetro inicial para seleccionar posibles especies del virus dentro del género tospovirus (Hobbs *et al.*, 1993). Sin embargo, el criterio final para la definición de nuevas especies de virus se fundamenta en las características biológicas de los aislamientos, en sus posibles relaciones serológicas y en la secuencia primaria de los componentes del genoma viral. (De Avila *et al.*, 1993a).

Otro sistema de clasificación primaria es la ubicación en patogrupos de los aislamientos de TSWV según la expresión fenotípica de síntomas, obtenida por transmisión mecánica en líneas resistentes de chile (*Capsicum chinense*), que ha demostrado ser estable y repetible en todos los casos en que se ha utilizado (Black *et al.*, 1991; Boiteux y Nagata, 1992; Nagata *et al.*, 1993).

En México se carece de suficiente información sobre la susceptibilidad de cultivos importantes a TSWV, la

vectors that infect humans and animals (Francki *et al.*, 1991; Martelli, 1992). Numerous isolates of probable tospovirus that have been obtained, but not totally characterized, might be new species. TSWV is not the only species within Tospovirus, and it has been repeatedly proposed to include other isolates as new species, based on the differences in molecular characteristics of the viral capsid protein (De Avila *et al.*, 1993a).

Isolates of tospovirus have a wide number of susceptible hosts, but also induce a broad diversity of symptoms in the same hosts (German *et al.*, 1992). Serological detection using monoclonal and polyclonal antibodies, confirmed the suspicion that TSWV is, in most cases, responsible for the infections on a large number of hosts worldwide (De Avila *et al.*, 1993b).

Tomato spotted wilt virus has been identified on tomato (*L. esculentum*) in Sinaloa, México, and ever since the damage by virus similar to tospovirus has occurred and increased in tomato, pepper, and tobacco (De la Torre *et al.*, 1995).

Because of worldwide dispersion of TSWV and the large number of susceptible hosts, it is common to assume that different geographical isolates, or isolates obtained from different hosts, might be considered as species of this virus.

The classification of TSWV isolates, considering the variation of symptoms expressed on inoculated hosts, is important as an initial parameter for the selection of possible species of the virus within the genus tospovirus (Hobbs *et al.*, 1993). However, the final criterion for the definition of new virus species is based on the biological characteristics of the isolates, on their possible serological relationships, and on the primary sequence of the components of the virus genome (De Avila *et al.*, 1993a).

Another system of primary classification is placing TSWV isolates in pathogroups, according to the phenotypic expression of symptoms, obtained by mechanical transmission in resistant lines of pepper (*Capsicum chinense*), which have shown to be stable and repeatable in all the cases in which it has been used (Black *et al.*, 1991; Boiteux and Nagata, 1992; Nagata *et al.*, 1993).

In México there is a lack of sufficient information on TSWV susceptibility of the major crops, variability and characteristics of TSWV isolates, as well as the presence of other possible tospovirus species. For these reasons, this study was conducted to identify TSWV in several crops and determine the phenotypic variation of their isolates in México.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the Virus

Leaves of tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.), tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), pepper (*Capsicum annum* L.), and chrysanthemum

variabilidad y las características de aislamientos de TSWV, así como de la presencia de otras posibles especies de tospovirus, por lo que este estudio se realizó con los objetivos de identificar la presencia de TSWV en varios cultivos y determinar la variación fenotípica de sus aislamientos en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de Virus

Se colectaron hojas de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y crisantemo (*Dendrathera grandiflora* L.) en los Estados de México, Puebla y Morelos, todas con síntomas de manchas anulares cloróticas y necróticas en hojas, así como necrosis en tallos, similares a los inducidos por tospovirus. Un gramo de hojas de cada muestra fue macerado en un mortero con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (0.02 M)-DIECA 1%, pH 7.0; y el extracto se frotó con un hisopo de algodón en hojas de cinco plántulas sanas previamente espolvoreadas con carborundum. Las especies de plántulas utilizadas para la separación y caracterización de tospovirus fueron: tabaco (*Nicotiana rustica* L., *N. tabacum* L. var. Havana 425, *N. tabacum* N.C. var. xanthi, *N. glutinosa* L., *N. clevelandii* L. y *N. debneyii* L.), toloache (*Datura stramonium*, *D. metel*), chile (*Capsicum annuum* L.), tomate (*L. esculentum* var. Celebrity M.), tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), chícharo de vaca (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *sisquepedalis*), quelite (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Nicandra physaloides* y calabaza (*Cucurbita pepo*). Los aislamientos de posibles tospovirus fueron conservados en plantas de *D. stramonium*. Todas las plantas inoculadas se mantuvieron en un invernadero con temperaturas de 25 a 30 °C en promedio, y en los fotoperiodos correspondientes a las estaciones de la primavera y verano.

Se utilizaron como hospedantes susceptibles a TSWV las variedades de chile común *C. annuum* (Yolo Wonder, Yolo Y, Early California Wonder y Florida VR-2), *C. frutescens* (Green Leaf Tabasco) y un híbrido de *C. chinense* x *C. frutescens* Green Leaf Tabasco; y para la caracterización de los aislamientos de TSWV en los patogrupos PL (patogrupos de lesiones locales) y el PS (patogrupos sistémicos), se utilizaron a las líneas de *C. chinense* (PI-152225 y PI-159236), resistentes a TSWV.

Detección serológica por ELISA

Se utilizó la prueba serológica de doble anticuerpo ligado a enzimas (DAS-ELISA), para la detección de TSWV y de otros virus en muestras de campo e invernadero (Clark y Adams, 1977).

Se utilizaron antisueros específicos comerciales (Adglia, Co) para la detección de TSWV, impatiens necrotic spotted virus (INSV), cucumber mosaic virus (CMV), tobacco mosaic virus (TMV), tobacco ring spot virus (TRSV) y tobacco etch virus (TEV) a una dilución de 1/1000 y se siguieron las instrucciones del fabricante. La reacción antígeno-anticuerpo, asociada a la reacción del cromógeno, fue evaluada después del último paso, a los 20 y 60 minutos, midiendo la

(*Cendrathera grandiflora* L.) were collected in the states of México, Puebla, and Morelos. All of the leaves had symptoms similar to those induced by tospovirus: chlorotic and necrotic ring-shaped spots, as well as stem necrosis. A gram of leaves of each sample was macerated in a mortar with 2 mL of a buffer solution of phosphates (0.02M)-DIECA 1%, Ph 7.9. The extract was applied with a cotton swab on the leaves of five healthy seedlings, which had been previously dusted with carborundum. The species of seedlings used for separating and characterizing tospovirus were the following: tobacco (*Nicotiana rustica* L., *N. tabacum* L. var. Havana 425, *N. tabacum* N.C. var. xanthi, *N. glutinosa* L., *N. clevelandii* L., and *N. debneyii* L.), toloache (*Datura stramonium*, *D. metel*), pepper (*Capsicum annuum* L.), tomato (*L. esculentum* var. Celebrity M.), tomatillo (*Physalis ixocarpa*), cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *sisquepedlis*), quelite (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*), bean (*Phaseolus vulgaris*, *Nicandra physaloides*) and squash (*Cucurbita pepo*). The isolates of possible tospovirus were conserved on *D. stramonium* plants. All of the inoculated plants were kept in a greenhouse with temperatures between 25 and 30 °C, on average, and the photoperiods corresponding to spring and summer.

As susceptible TSWV hosts, the following varieties were used: common pepper *C. annuum* (Yolo Wonder, Yolo Y, early California Wonder, and Florida VR-2), *C. frutescens* (Green Leaf Tabasco) and a hybrid of *C. chinense* x *C. frutescens* Green Leaf Tabasco. To classify the TSWV isolates into PL pathogroups (pathogroup of localized lesions) and PS pathogroups (systemic pathogroup), TSWV-resistant *C. chinense* lines (PI-152225 and PI-159236) were used.

Serological detection by ELISA

The serological test of enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was used to detect TSWV and other viruses on samples taken in the field and greenhouse (Clark and Adams, 1977).

Specific commercial antisera (Adglia, Co) were used to detect TSWV, impatiens necrotic spotted virus (INSV), cucumber mosaic virus (CMV), tobacco mosaic virus (TMV), tobacco ring spot virus (TRSV), and tobacco etch virus (TEV). A 1/1000 dilution was used, following the instructions of the manufacturer. The antigen-antibody reaction associated to the reaction of the chromogen was evaluated 20 and 60 minutes after the last step, measuring absorbance (A/492 nm) in a Microlector, model 450. Positive and negative controls were included in each plate for each of the viruses to be detected. Reactions were considered positive only if the value of absorbance was equal to or higher than the value of the positive control.

Electronic microscopy

The extracts of plants infected with the isolates were dyed with 2% acetate of uranyl (pH 6.8) and observed through an electronic transmission microscope Jeol 100 CS.

Transmission tests with vector insects

Healthy colonies of thrips *Frankliniella occidentalis* were used for tests of controlled transmission. *D. stramonium* plants to be used

absorbancia (A/492 nm) en un Microlector Modelo 450. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada placa para cada uno de los virus por detectar. Las reacciones fueron consideradas positivas sólo si el valor de la absorbancia fue igual o superior al valor del testigo positivo.

Microscopía electrónica

Se tiñeron extractos de plantas infectadas con los aislamientos de virus con 2% de acetato de uranilo (pH 6.8) y visualizados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 100 CX.

Pruebas de transmisión con insectos vectores.

Se utilizaron colonias sanas del trips *Frankliniella occidentalis* para pruebas de transmisión controlada. Se inocularon plantas de *D. stramonium* mecánicamente con cada uno de los aislamientos de TSWV colectados en cada Estado, para utilizarse en las pruebas alimentación-adquisición. Se desprendieron hojas de *D. stramonium* con síntomas sistémicos y se colocaron en jaulas de Tashiro. Se transfirieron larvas de primer y segundo estadio de *F. occidentalis* a las jaulas de Tashiro con la hoja de *D. stramonium* infectada con TSWV, sin ningún periodo de ayuno. Los trips se mantuvieron por un periodo de alimentación-adquisición de 4 días. Las jaulas de Tashiro permanecieron bajo luz continua y a la temperatura del laboratorio (24 °C). Los trips fueron transferidos a nuevas jaulas con hojas sanas de *D. stramonium* hasta que alcanzaron el estado adulto. Cinco adultos de trips fueron transferidos a plántulas de chile, *D. stramonium* y tomate de cáscara y mantenidos por un periodo de alimentación transmisión de 4 días, dentro de contenedores de plástico blanco de 5.7 ó 7.5 L. Las plantas fueron transferidas posteriormente al invernadero para permitir la expresión de síntomas por tres semanas. Todas las plantas utilizadas en las pruebas de transmisión por insectos fueron conservadas para la detección serológica de TSWV.

Agrupamiento de aislamientos de TSWV

Cada uno de los aislamientos de TSWV procedentes de las plantas enfermas colectadas en los sitios de muestreo, se mantuvo en plantas de *D. stramonium*, y mediante transmisión mecánica se inocularon a plántulas con cuatro hojas verdaderas de las líneas de chile PI-152225 y PI-159236 de *C. chinense*. Los aislamientos de TSWV se ubicaron en los patogrupos PL (patogrupos de lesiones locales) o PS (patogrupos de daños sistémicos) considerando las reacciones sintomáticas observadas en las líneas de *C. chinense* anteriormente mencionadas, resistentes a TSWV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de virus

Un total de seis aislamientos de TSWV se separó por transmisión mecánica de plantas de tomate, tomate de cáscara, chile y crisantemo colectadas en los Estados

in the tests of feeding-contagion were inoculated mechanically with each of the TSWV isolates collected in each state. *D. stramonium* leaves with systemic symptoms were picked off and placed in Tashiro cages. First and second stage *F. occidentalis* larvae were transferred to the Tashiro cages with the TSWV-infected *D. stramonium* leaves, without a period of fasting. The thrips were kept during a feeding-contagion period of four days. The Tashiro cages were kept under continuous light and laboratory temperature (24 °C). The thrips were then transferred to new cages with healthy *D. stramonium* leaves and kept there until they reached the adult stage. Five adult thrips were transferred to pepper, *D. stramonium*, and tomatillo seedlings in 5.7 or 7.5 L white plastic containers and kept for 4 days. The plants were later transferred to the greenhouse where they were kept for three weeks to allow the expression of symptoms. All of the plants used in the tests of insect transmission were conserved for serological detection of TSWV.

Grouping TSWV isolates

Each of the TSWV isolates from plants collected from sampling sites were kept on *D. stramonium* plants, and seedlings with four true leaves of the *C. chinense* pepper lines PI 152225 and PI-159236 were inoculated mechanically. The TSWV isolates were placed in pathogroups, PL (localized lesions) or PS (systemic damage), considering the symptomatic reactions observed in the aforementioned *C. chinense* lines resistant to TSWV.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of the virus

A total of six TSWV isolates were separated by mechanical transmission from tomato, tomatillo, pepper, and chrysanthemum plants collected in the States of México, Puebla, and Morelos. Also, the viruses INSV (impatiens necrotic spotted virus), CMV (cucumber mosaic virus), TMV (tobacco mosaic virus), TRSV (tobacco ring spot virus), and TEV (tobacco etch virus) were separated from tomato, pepper, and tomatillo in complex infections, being the last two the most frequent in infection and serological detection. Also, only INSV and TSWV were isolated and detected in simple infections in chrysanthemum plants.

The indicator and differential plants used allowed the separation and characterization of different isolates of TSWV that caused typical symptoms of tospovirus (Table 1). However, the severity of the symptoms induced by the TSWV isolates varied depending on the conditions in greenhouse or bioclimate chamber. Also, the symptoms observed on hosts inoculated in the greenhouse were frequently different from those observed on samples collected in the field.

Response consistency (type of symptom and susceptibility) in indicator hosts was sufficient to

de México, Puebla y Morelos. También se detectaron y separaron los virus INSV (impatiens necrotic spotted virus), CMV (cucumber mosaic virus), TRSV (tobacco ring spot virus), TMV (tobacco mosaic virus) y TEV (tobacco etch virus) o bien en tomate, chile y tomate de cáscara en infecciones complejas, presentando los dos últimos virus la mayor frecuencia de infección y detección serológica. Por otro lado, sólo INSV o TSWV fueron aislados y detectados en infecciones simples en plantas de crisantemo.

Las plantas indicadoras y diferenciales utilizadas permitieron la separación y caracterización de diferentes aislamientos de TSWV, que causaron los síntomas típicos de tospovirus (Cuadro 1). Sin embargo, la severidad de los síntomas inducidos por los aislamientos de TSWV varió entre ellos bajo condiciones de invernadero o cámara bioclimática. Por otro lado, los síntomas en los hospedantes inoculados en el invernadero fueron frecuentemente diferentes a los observados en las muestras colectadas en campo.

La consistencia de la respuesta (tipo de síntomas y susceptibilidad) en las hospedantes indicadoras fue adecuada para diferenciar a TSWV de otros virus presentes en las muestras colectadas en el campo. Los aislamientos de TSWV causaron manchas anulares necróticas, mosaico y deformación de hojas apicales en *D. Stramonium* (Figura 1 A); manchas anulares cloróticas que se tornaron necróticas, mosaico y deformación de hojas en *Nicotiana rustica* (Figura 1 B); manchas anulares cloróticas, anillos y patrones lineales locales sin expresión de síntomas sistémicos en *Vigna unguiculata* subs. *sisquepedalis* (Figura 1 C); manchas anulares necróticas, mosaico y necrosis de venas en *C. annuum* cv Ancho (Figura 1 D); lesiones locales cloróticas, mosaico y después necrosis en *C. annuum* y *C. frutescens*. El híbrido de *C. chinense* x *C. frutescens*, Green Leaf Tabasco, reaccionó con lesiones locales necróticas, mosaico y manchas anulares necróticas para todos los aislamientos de TSWV.

Detección serológica por ELISA

Los aislamientos de TSWV mantenidos en *D. stramonium* reaccionaron con el antisuero específico a TSWV pero no reaccionaron para los antisueros TMV, CMV, TRSV, TEV y INSV. Por el contrario, los extractos de hojas de muestras originales de tomate, tomate de cáscara y chile reaccionaron a TSWV, TMV o TEV y algunas veces a INSV, CMV y TRSV, pero los extractos de plantas de crisantemo sólo reaccionaron a los antisueros de TSWV o INSV.

Microscopía electrónica

Preparaciones de extractos de plantas con síntomas de TSWV, vistas bajo el microscopio electrónico, revelaron

differentiate TSWV from other viruses present in the samples collected in the field. The TSWV isolates caused necrotic ring spots, mosaic, and deformation of apical leaves in *D. Stramonium* (Figure 1 A), chlorotic ring spots that turned necrotic, mosaic, and deformation of leaves in *Nicotiana rustica* (Figure 1 B), chlorotic ring spots, rings and localized line patterns, with no expression of systemic symptoms, in *Vigna unguiculata* subsp. *sisquepedalis* (Figure 1 C), necrotic ring spots, mosaic, and vein necrosis in *C. annuum* cv Ancho (Figure 1 D), and localized chlorotic lesions, mosaic and, later, necrosis in *C. annuum* and *C. frutescens*. The hybrid *C. chinense* x *C. frutescens*, Green Leaf Tabasco, reacted with localized necrotic lesions, mosaic, and necrotic ring spots to all of the TSWV isolates.

Serological detection by ELISA

TSWV isolates kept on *D. Stramonium* reacted to the specific TSWV antiserum, but did not react to the antisera for TMV, CMV, TRSV, TEV, or INSV. In contrast, the leaf extracts from the original samples of

Cuadro 1. Síntomas en plantas indicadoras de tomate, tomate de cáscara, chile y crisantemo inoculadas con aislamientos del virus de la marhitez manchada del tomate (TSWV).

Table 1. Symptoms in indicator plants of tomato, tomatillo, pepper and chrysanthemum inoculated with isolates of the tomato spotted wilt virus (TSWV).

Especies hospedantes	Síntomas
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Man
<i>C. quinoa</i>	Mac
<i>Gomphrena globosa</i>	Llc, Da
<i>Physalis ixocarpa</i>	Man, Mac, Lln, Nh
<i>Nicandra physalodes</i>	Man, M, Llc, Nh, Mar
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Man, M, Oh
cvs. Ace y Río grande	
<i>Nicotiana rustica</i>	Llc, Man, Dh, Mar
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	Man, Llc, Nh
<i>N. benthamiana</i>	Mar, M
<i>N. glutinosa</i>	Man, Mar
<i>N. clelandii</i>	Man, Mar
<i>N. debneyi</i>	Man, Mar
<i>Datura stramonium</i>	Man, M, Da
<i>Capsicum annuum</i> cv. Ancho	Mac, Man, Nh
<i>C. frutescens</i> cv. Tabasco	Mac, Man, M
<i>C. chinense</i> x <i>C. frutescens</i>	Man
cv. Green Leaf Tabasco	
<i>C. chinense</i> (PI-152225 and PI-152236)	Man
<i>V. unguiculata</i>	Mac
subsp. <i>sisquepedalis</i>	
<i>Cucurbita pepo</i>	M

Mac = Mancha anular clorótica; Man = Mancha anular necrótica; M = Mosaico; Dh = Deformación de hojas; Da = Distorsión apical; Lln = Lesiones locales necróticas; Llc = Lesiones locales cloróticas; Mar = Marchitez; Oh = Obscurecimiento de hojas; Nh = Necrosis de hojas.

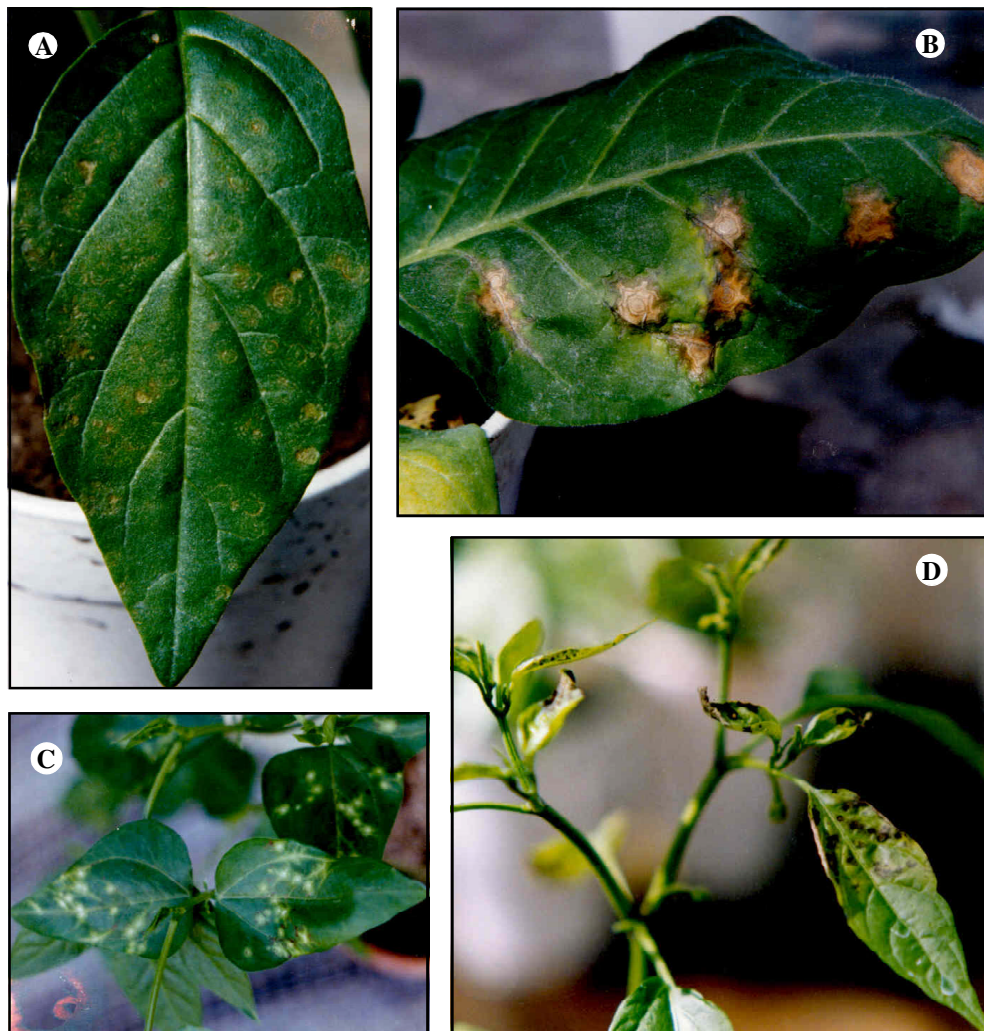


Figura 1. Síntomas inducidos por aislamientos de TSWV en: A) *Datura stramonium*; B) *Nicotiana rustica*; C) *Vigna sisquipedalis*; D) *Capsicum annuum* var. Ancho Poblano.

Figure 1. Symptoms induced by isolates of TSWV in: A) *Datura stramonium*; B) *Nicotiana rustica*; C) *Vigna sisquipedalis*; D) *Capsicum annuum* var. Ancho Poblano.

partículas pleiotrópicas de aspecto membranoso y con un diámetro de alrededor de 80 a 90 nm (Figura 2).

Pruebas de transmisión con insectos vectores

Todos los aislamientos de TSWV fueron eficientemente transmitidos por *F. occidentalis* a plantas de *D. stramonium*, y los extractos de esas plantas fueron infecciosos por transmisión mecánica a otras plantas, y reaccionaron positivamente al antisuero de TSWV pero no al antisuero de INSV.

Agrupamiento de aislamientos de TSWV

Se seleccionaron seis aislamientos de TSWV, procedentes de las especies afectadas o bien de los sitios en

tomato, tomatillo, and pepper, reacted to TSWV, TMV or TEV and, at times, to INSV, CMV and TRSV, but the extracts from chrysanthemum plants reacted only to the antisera of TSWV or INSV.

Electronic microscopy

The preparations of extracts from plants with TSWV symptoms, seen under an electronic microscope, revealed pleiotropic particles with a membranous aspect and a diameter of around 80 to 90 nm (Figure 2).

Transmission tests with insect vectors

All of the TSWV isolates were transmitted efficiently by *F. occidentalis* to *D. stramonium* plants, and the



Figura 2. Microfotografía de las partículas virales de TSWV (80 a 90 nm) en tinción negativa con acetato de uranilo a 2%.

Figure 2. Microphotograph of TSWV virus particles (80 to 90 nm) in negative tincture with 2% acetate of uranyl.

donde se colectaron plantas de la misma especie infectadas con este virus. Los aislamientos fueron designados como: TSWV-tom (tomate), TSWV-phy1 (physalis 1. México); TSWV-phy2 (physalis 2. México); TSWV-phy3 (physalis 3. Morelos); TSWV-pep (chile), TSWV-chry (crisantemo).

Todos los aislamientos de TSWV se ubicaron dentro del patogrupa PL, ya que causaron sólo lesiones locales necróticas en las hojas de las líneas de *C. chinense* PI-152225 y PI-159236 inoculadas mecánicamente (Figura 3 A), las cuales se necrosaron y desprendieron días después de la aparición de las lesiones locales (Figura 3 B). En estas plantas se confirmó que no hubo movimiento sistémico de TSWV, por análisis serológico con el antisuero de TSWV en DAS-ELISA. Por el contrario, todos los aislamientos de TSWV causaron lesiones cloróticas y necróticas en forma de anillo lesiones y después infección sistémica en la variedad de chile *C. annum* var. Yolo Wonder, susceptible a TSWV (Figura 3 C y D).

Considerando la sintomatología observada en las líneas de *C. chinense* resistentes a TSWV, todos los aislamientos fueron clasificados como pertenecientes al patogrupa PL y ninguno causó síntomas sistémicos en *C. chinensi*.

Los resultados indicaron la presencia de TSWV en plantas de tomate, tomate de cáscara, chile y crisantemo procedentes de regiones subtropicales y templadas de la región central de México, lo que indica que este virus no sólo se distribuye en regiones cálidas y tropicales, que son su medio ambiente natural (Goldbach y Peters, 1994).

Los aislamientos de tospovirus indujeron una amplia diversidad de síntomas en los hospedantes en que se inocularon. Sin embargo, los síntomas inducidos en *D. stramonium*, *N. rustica*, *V. unguiculata* subs. *sisquepedalis*

extracts of these plants were infectious when transmitted mechanically to other plants and reacted positively to the TSWV antiserum, but not to the INSV antiserum.

TSWV isolate grouping

Six TSWV isolates were selected from the affected species, or from the sites where plants of the same infected species were collected. The isolates were denominated as follows: TSWV-tom (tomato), TSWV-phy1 (physalis 1. México); TSWV-phy2 (physalis 2. Mexico, TSWV-phy3 (physalis 3. Morelos), TSWV-pep (pepper), TSWV-chry (chrysanthemum).

All of the TSWV isolates were placed in the PL pathogroup, since they caused only localized necrotic lesions in leaves of the *C. chinense* lines PI-152225 and PI-159236 inoculated mechanically (Figure 3 A), which became necrotic and dropped off days after the appearance of the localized lesions (Figure 3 B). In these plants, it was confirmed, by serological analysis with the TSWV antiserum in DAS-ELISA, that there was no systemic movement of TSWV. In contrast, all of the TSWV isolates caused chlorotic and necrotic lesions in the form of ring lesions and, later, systemic infection in the *C. annum* var. Yolo Wonder pepper variety, which is susceptible to TSWV (Figure 3 C and D).

Considering the symptomatology observed in the TSWV-resistant *C. chinense* lines, all of the isolates were classified as belonging to the PL pathogroup; no isolate caused systemic symptoms in *C. chinense*.

The results indicated the presence of TSWV in tomato, tomatillo, pepper, and chrysanthemum plants from subtropical and temperate regions of Central México, indicating that this virus is not distributed only in hot tropical regions, its natural environment (Goldbach and Peters, 1994).

The isolates of tospovirus induced a wide diversity of symptoms on inoculated hosts. However, the induced symptoms on *D. stramonium*, *N. rustica*, *V. unguiculata* subsp. *sisquepedalis* and *C. annum* were consistent and sufficient to enable the characterization of the isolates as belonging to the TSWV species. Also, the same hosts permitted clear differentiation of TSWV from other viruses, such as TMV and TEV, in mixed infections (Ie, 1970; Francki and Hatta, 1981; Law and Moyer, 1990; Hobbs *et al.*, 1993).

Serological tests showed infections of TSWV mixed with other viruses in tomato, tomatillo, and pepper, but not in chrysanthemum. INSV was detected in plant extracts of chrysanthemum collected in the field, but this virus was not detected in plants inoculated by mechanical transmission nor by insects.

TSWV is not the only member of the tospovirus genus, and it has been recently proposed that new species, which

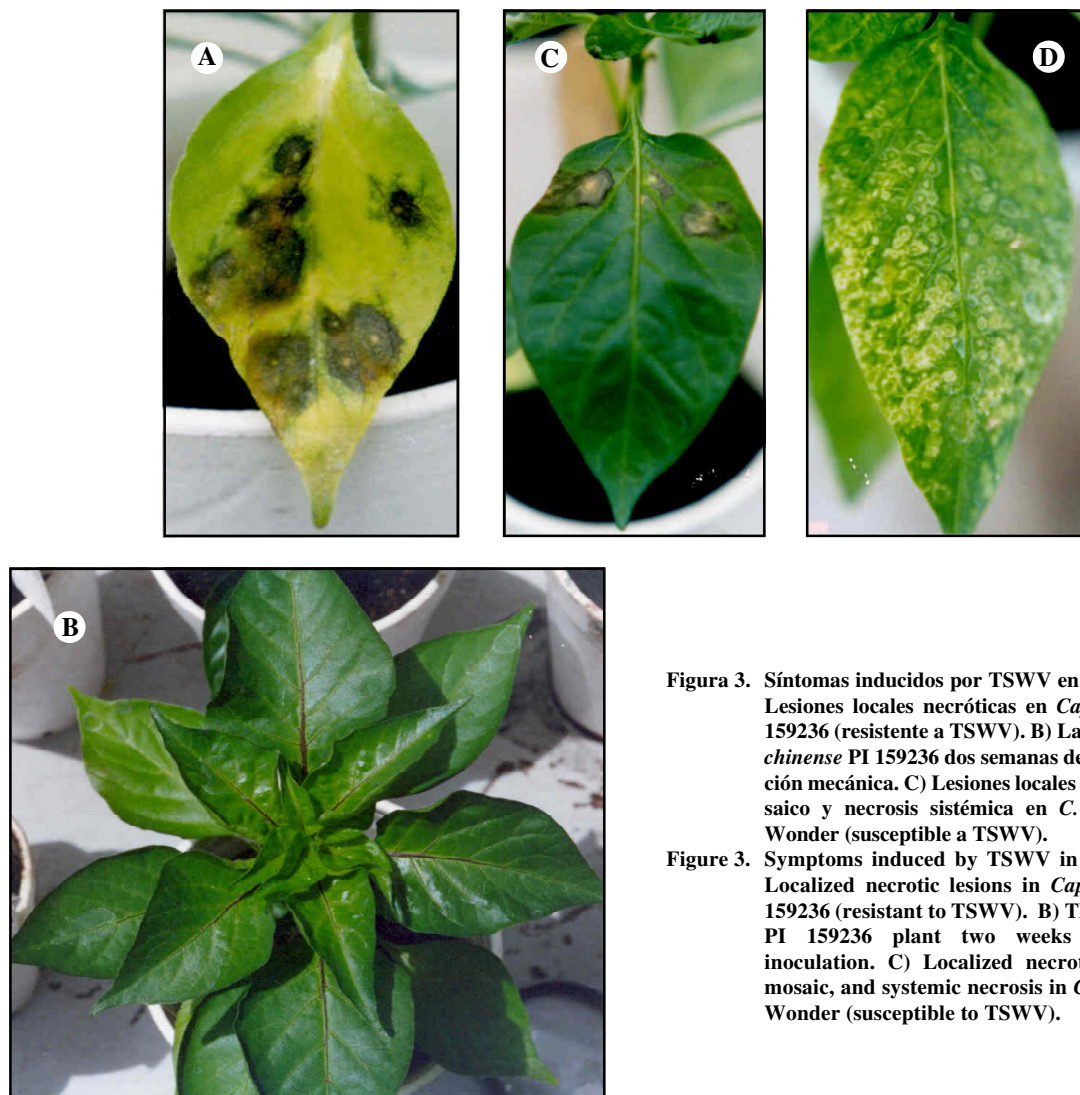


Figura 3. Síntomas inducidos por TSWV en plantas de chile. A) Lesiones locales necróticas en *Capsicum chinense* PI 159236 (resistente a TSWV). B) La misma planta de *C. chinense* PI 159236 dos semanas después de la inoculación mecánica. C) Lesiones locales necróticas, y D) mosaico y necrosis sistémica en *C. annuum* var. Yolo Wonder (susceptible a TSWV).

Figure 3. Symptoms induced by TSWV in pepper plants. A) Localized necrotic lesions in *Capsicum chinense* PI 159236 (resistant to TSWV). B) The same *C. chinense* PI 159236 plant two weeks after mechanical inoculation. C) Localized necrotic lesions, and D) mosaic, and systemic necrosis in *C. annuum* var. Yolo Wonder (susceptible to TSWV).

y *C. annuum* fueron consistentes y adecuados para caracterizar a los aislamientos de tospovirus como pertenecientes a la especie de TSWV. Por otro lado, los mismos hospedantes permitieron diferenciar claramente a TSWV de otros virus como TMV y TEV en infecciones en mezcla (Ie, 1970; Francki y Hatta, 1981; Law y Moyer, 1990; Hobbs *et al.*, 1993).

Las pruebas serológicas mostraron infecciones con otros virus en mezcla con TSWV en tomate, tomate de cáscara y chile, pero no en crisantemo. Se detectó INSV en extractos de plantas de crisantemo colectadas en campo, pero este virus no se detectó en plantas inoculadas por transmisión mecánica ni por insectos.

El TSWV no es el único miembro del género tospovirus, y recientemente se ha propuesto incorporar nuevas especies que previamente se consideraron como aislamientos y después como variantes de TSWV. Esos aislamientos tienen casi el mismo espectro de

were previously considered isolates and later variants of TSWV, should be incorporated. These isolates have almost the same spectrum of hosts, except for INSV, which has been found in ornamental plants. The only exception is the INSV infection on *V. unguiculata*, where it causes chlorotic ring spots, with no systemic movement. This reaction may differentiate TSWV and INSV from other species of tospovirus (De Avila *et al.*, 1991).

Occasionally, INSV was detected in tomato, tomatillo and pepper in field conditions; this is incomprehensible considering that INSV has only been found on ornamentals. Probably, the presence of INSV on these species of solanaceas can be explained by the transmission by different species of thrips in natural conditions and by the environmental conditions of central México, which permit INSV infection of the species of solanaceas on which it was found. A third possibility is that the isolate of this tospovirus is different from INSV. However, no

hospedantes, excepto INSV, el cual se ha encontrado en plantas ornamentales. La única excepción es la infección de INSV en *V. unguiculata*, en donde causa manchas anulares cloróticas pero sin movimiento sistémico. Esta reacción puede diferenciar TSWV y INSV de otras especies de tospovirus (De Avila *et al.*, 1991).

Ocasionalmente se detectó a INSV en tomate, tomate de cáscara y chile en condiciones de campo, lo que es incomprensible si se considera que INSV sólo se ha encontrado en plantas ornamentales. Probablemente la presencia de INSV en estas especies de solanáceas se explique por la transmisión por diferentes especies de trips en condiciones naturales, y porque las condiciones ambientales de la región central de México permitan la infección de INSV en las especies de solanáceas en las que se detectó. Una tercera posibilidad es que el aislamiento de este tospovirus es diferente al INSV. Sin embargo, no se logró obtener evidencia en ningún sentido.

Los seis aislamientos obtenidos de TSWV se clasificaron dentro del patogrupa de lesiones locales (TSWV-PL), debido a la reacción observada en las líneas de *C. chinense* PI-152225 y PI-159236 cuando se inocularon mecánicamente con cada uno de los aislamientos de TSWV.

Las líneas de *C. chinense* PI-152225 y PI-159236 han sido reportadas como resistentes a varios aislamientos de TSWV y se han podido identificar aislamientos fenotípicamente diferentes de este virus por la reacción sintomática que inducen en estas líneas de *C. chinense*, ya que muchos aislamientos causan sólo lesiones locales necróticas sin movimiento sistémico del virus, y pocos inducen primero lesiones cloróticas y después síntomas sistémicos (Black *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1994).

En Brasil, los aislamientos de tospovirus han sido divididos dentro de los dos patogrupos. Esos patogrupos parecen tener diferente distribución geográfica. Aislamientos de TSWV-PL fueron detectados predominantemente en la región templada de Brasil, mientras que aislamientos del patogrupa TSWV-PS fueron localizados en la región cálida al sudeste en el estado de San Pablo, lo que sugiere que diferentes especies de trips o condiciones climáticas específicas están involucradas en la transmisión de esos aislamientos (Boiteux y Nagata, 1992; Nagata *et al.*, 1993).

Los resultados indican que en la región central de México se encuentran sólo aislamientos del patogrupa TSWV-PL. Probablemente los aislamientos del patogrupa de lesiones locales de TSWV tienen la más amplia distribución geográfica en regiones subtropicales y templadas de México; sin embargo, es necesario realizar un muestreo más amplio en otras regiones para confirmar estos resultados.

Es posible que los aislamientos de los patogrupos PL o PS representen diferentes especies de tospovirus. Sin

evidence was found to demonstrate any of these possibilities.

The six TSWV isolates obtained were classified within the pathogroup of localized lesions (TSWV-PL), due to the reaction observed on the lines of *C. chinense* PI-152225 and PI-159236 when they were inoculated mechanically with each of the TSWV isolates.

C. chinense lines PI-152225 and PI-159235 have been reported as resistant to several isolates of TSWV, and isolates that are phenotypically different from this virus have been identified by the symptomatic reaction they induce in *C. chinense* lines. Many of them cause only localized necrotic lesions with no systemic movement of the virus, and a few induce, first, chlorotic lesions and, later, systemic symptoms (Black *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1994).

In Brazil, isolates of tospovirus have been divided into two pathogroups. These pathogroups seem to differ in geographic distribution. TSWV-PL isolates were detected predominantly in the temperate region of Brazil, while isolates of the TSWV-PS pathogroup were located in the hot region southeast of the state of Sao Paulo. This suggests that different species of thrips or specific climatic conditions are involved in the transmission of these isolates (Boiteux and Nagata, 1992; Nagata *et al.*, 1993).

Results indicate that in the central region of Mexico only isolates of the TSWV-PL pathogroup are found. Probably, the isolates of the TSWV-PL pathogroup have a wider geographic distribution in subtropical and temperate regions of Mexico. However, it is necessary to conduct extended collections of samples in other regions to confirm these results.

It is possible that the isolates of the PL or PS pathogroups represent different species of tospovirus. However, these viruses cannot be separated by common hosts, and apparently, it is possible that the PI lines of *C. chinense* are a differential host that may be adequate for the identification of possible species of tospovirus (Nagata *et al.*, 1993).

The classification of isolates of TSWV based on pathogroups using resistant lines of *C. chinense* is stable and reliable, since no exceptions have been observed when different isolates of TSWV are under suspicion and results of serological tests have confirmed the existence of these pathogroups (Black *et al.*, 1991; Boiteux and Nagata, 1992).

The determination of the phenotypic variation of TSWV isolates based on host response and division in pathogroups can be used as a primary parameter for identifying species of this virus and to evaluate resistance in species susceptible or resistant to TSWV. However, confirmation of an isolate of tospovirus as a new species must be based on the data on serological divergence and primary sequence of the nucleocapsid gene of the

embargo, estos virus no pueden ser separados por hospedantes comunes, y al parecer es posible que las líneas PI de *C. chinense* sean un hospedante diferencial adecuado para la identificación de posibles especies de tospovirus (Nagata *et al.*, 1993).

La clasificación de aislamientos de TSWV basada en patogrupos, usando las líneas resistentes de *C. chinense*, es estable y confiable, dado que no se han observado excepciones cuando se sospecha de aislamientos diferentes de TSWV, y los resultados de las pruebas serológicas han confirmado la existencia de estos patogrupos (Black *et al.*, 1991; Boiteux y Nagata, 1992).

La determinación de la variación fenotípica de aislamientos de TSWV basada en la respuesta del hospedante, y su agrupamiento en patogrupos, puede utilizarse como un parámetro primario para identificar especies de este virus, y para la evaluación de la resistencia en especies susceptibles o resistentes a TSWV. Sin embargo, la confirmación para considerar a un aislamiento de tospovirus como una nueva especie, debe fundamentarse en los datos que se obtengan sobre las divergencias serológicas y la secuencia primaria del gene de la nucleocápside de aislamientos sospechosos (De Avila *et al.*, 1993a; De Avila *et al.*, 1993b).

CONCLUSIONES

Se aisló e identificó a Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) de plantas de tomate de cáscara (*P. ixocarpa*), tomate (*L. esculentum*), chile (*C. annuum*) y crisantemo (*C. grandiflora*) cultivados en los Estados de México, Puebla y Morelos. Se caracterizaron seis posibles aislamientos diferentes de TSWV, los que a su vez se ubicaron como pertenecientes únicamente al patogrupo TSWV-PL (lesiones locales necróticas, sin movimiento sistémico) al inocularse en plantas de las líneas de *Capsicum chinense* Jacquin PI-152225 y PI-159236, ambas con resistencia a TSWV. El comportamiento fenotípico (lesiones locales) de los aislamientos de TSWV en *C. chinense*, indican, al parecer, que el patogrupo PL de TSWV es el más abundante en México.

LITERATURA CITADA

- Best, R. J. 1968. Tomato spotted wilt virus. *Advances in Virus Research* 13: 65-146.
- Black, L. L., A. H. Hobbs, and M. J. Gattii. 1991. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* PI 152225 and 159236. *Plant Disease* 75: 863. (Abstr.).
- Boiteux, S. L., and T. Nagata. 1992. Susceptibility of *Capsicum chinense* PI 159236 Tomato Spotted Wilt Virus isolates in Brazil. *Plant Disease* 77: 210. (Abstr.).
- Bond, W. P., H. K. Whitam, and L. L. Black. 1993. Indigenous weeds as reservoirs of Tomato spotted wilt in Louisiana. *Phytopathology* 73: 499 (Abstr.).
- Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*. 34: 475-483.
- suspected isolates (De Avila *et al.*, 1993a; De Avila *et al.*, 1993b).
- ## CONCLUSIONS
- Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) was isolated and identified on tomatillo (*P. ixocarpa*), tomato (*L. esculentum*), pepper (*C. annuum*) and chrysanthemum (*C. grandiflora*) plants cultivated in the states of México, Puebla, and Morelos. Six different possible isolates of TSWV were characterized and placed as belonging only to the pathogroup TSWV-PL (localized necrotic lesions, without systemic movement) when inoculated on plants of the *Capsicum chinense* Jacquin PI-152225 and PI.159236 lines, which are resistant to TSWV. The phenotypic behavior (localized lesions) of the TSWV isolates on *C. chinense* apparently indicates that the PL pathogroup of TSWV is the most abundant in México.
- End of the English version—
- *—
- De Avila, A. C., P. De Haan, E. W. Kitajima, R. Kormelink, R. O. Resende, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1991. Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from impatiens in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134: 133-151.
- De Avila, A. C., P. De Haan, R. Kormelink, R. O. Resende, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1993a. Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74: 153-159.
- De Avila, A. C., P. De Haan, M. L. L. Smeete, R. De O. Resende, R. Kormelink, E. W. Kitajima, R. W. Goldbach, and D. Peters. 1993b. Distinct levels of relationship between tospovirus isolates. *Archives of virology* 128: 211-227.
- De la Torre, A. R., O. D. Téliz, B. L. Barrón, E. Cárdenas, L. E. García, M. Cárdenas, and R. A. Valverde. 1995. Detection of a viral complex in tomatillo *Physalis ixocarpa* in the Central High Plateau of México. *Phytopathology* 85: 509 (Abstr.).
- Francki, R. I. B., and T. Hatta. 1981. Tomato spotted wilt virus. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. E. Kurstak ed. New York, Elsevier. pp: 491-512.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, Supplement 2: 1-450.
- German, L. T., E. D. Ullman, and W. J. Moyer. 1992. Tospovirus: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annual Review Phytopathology* 30: 315-348.
- Goldbach, R., and D. Peters. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in Virology* 5: 113-120.
- Hobbs, H. A., L. L. Black, R. N. Story, R. A. Valverde, W. P. Bond, J. M. Jr. Gatti, D. O. Schaeffer, and R. R. Johnson. 1993. Transmission of tomato spotted wilt virus from pepper and three weeds hosts by *Frankliniella fusca*. *Plant Disease* 77: 797-799.
- Hobbs, H. A., L. L. Black, R. R. Johnson, and R. A. Valverde R. A. 1994. Differences in reaction among tomato spotted wilt virus isolates to three resistant *Capsicum chinense* Lines. *Plant Disease* 78: 1220. (Abstr.).
- Ie, T. S. 1970. Tomato spotted wilt virus. C.M.L./A.A.B. In: *Description of Plant Viruses* No 39. Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol. pp: 1-5.

- Law, D. M., and W. J. Moyer. 1990. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*. 71: 933-938.
- Martelli, G. P. 1992. Classification and Nomenclature of Plant Viruses: State of the Art. *Plant Disease* 76: 436-442.
- Nagata, T., L. S. Boiteux, N. Iizuka, and A. N. Dusi. 1993. Identification of phenotypic variation of tospovirus isolates in Brazil based of tospovirus analysis and differential host response. *Fitopatologia Brasileira* 18: 425-430.
- Reddy, D. V. R., and J. A. Wightman. 1988. Tomato Spotted Wilt Virus: thrips transmission and control. *In: Advances in Disease Vector Research*, Vol.5. K.F. Harris, ed. Springer-Verlag, New York. pp: 203-220.
- Yudin, S. L., E. B. Tabashnik, J. J. Cho, and C. W. Mitchell. 1988. Colonization of weeds and lettuce by thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 17: 522-526.