

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA VARIANTE AMARILLA DEL VIRUS MOSAICO DEL PEPINO EN GLADIOLO (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) EN MÉXICO

R. De la Torre-Almaráz¹; A. Cruz Monsalvo-Reyes¹; M. Salazar-Segura²; R. A. Valverde³

¹Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). FES-IZTACALA-UNAM. Av. De los Barrios s/n Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C. P. 54090 (*Autor responsable).

²Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. C. P. 56230.

³Louisiana State University. Baton Rouge, USA, Baton Rouge 70803.

RESUMEN

Se aisló una variante del virus mosaico del pepino (CMV) que causa mosaico o rayado amarillo, deformación y aborto de flores en plantas de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) que se cultivan en los estados de Puebla y Morelos, México. Este aislamiento en particular causó mosaico amarillo intenso, manchas anulares y deformación severa en plantas de varias especies de Solanaceae que se inocularon por transmisión mecánica, síntomas que no causaron otras variantes comunes de CMV con las que se comparó. Los aislamientos del CMV obtenidos de gladiolo, probablemente pertenecen a una variante amarilla de CMV no reportada previamente en México y a la que se denominó preliminarmente como CMV-Ys ("Yellow strain"). La caracterización de esta variante del CMV se verificó por ensayos de transmisión mecánica a plantas de hospedantes diferenciales e indicadoras, microscopía electrónica, serología (ELISA y doble difusión en agar), transmisión por insectos vectores y análisis electroforético de ARN de doble cadena.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: cucumovirus, plantas ornamentales, enfermedad.

DETECTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A YELLOW VARIANT OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS IN GLADIOLA (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) IN MEXICO

SUMMARY

A variant of the cucumber mosaic virus (CMV) was isolated. This variant causes yellow mosaic or yellow stripes and deformation and abortion of flowers in gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) plants cultivated in the states of Puebla and Morelos, Mexico. This particular isolate caused intense yellow mosaic, ring spots, and severe deformation in plants of several species of Solanaceae that were inoculated by mechanical transmission. These symptoms were not caused by other common variants of CMV with which it was compared. The isolates of CMV obtained from gladiola probably belong to a yellow variant of CMV not previously reported in Mexico and which we preliminarily call CMV-Ys ("Yellow strain"). The characterization of this variant of CMV was verified by tests of mechanical transmission to differential and indicator host plants, by electronic microscopy, serology (ELISA and double diffusion in agar), by transmission by insect vectors, and by electrophoretic analysis of double-stranded RNA.

ADDITIONAL KEY WORDS: cucumovirus, ornamental plants, disease.

INTRODUCCIÓN

México exporta anualmente 2,554 de piezas de flores a los Estados Unidos de Norteamérica. Esta cantidad representa el 51.7 % del volumen total del mercado de exportación de flores a ese país. El gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es propagado a partir del cormo, de esta manera se conservan las características genéticas adecuadas a las preferencias del consumidor, en cuanto a color y al tamaño de la flor (Anónimo, 1991; Tayama, 1991).

El cultivo de gladiolo es una planta ornamental muy importante en México, en donde se cultivan aproximadamente 1,492 ha de esta especie en los estados de México, Puebla, Michoacán, Morelos, Guerrero, Veracruz y Tlaxcala.

Sin embargo, muchas plantas en parcelas comerciales presentan síntomas de mosaico o rayado amarillo foliar, distorsión de hojas, aborto de flores, enanismo y marchitez, síntomas similares a los causados

por virus. Datos de muestreos preliminares realizados en las zonas productoras, sugerían que posibles virus podían estar afectando significativamente el rendimiento y la calidad de flor de gladiolo y que limitan el cultivo de esta especie ornamental.

A pesar de que se ha reconocido que el gladiolo es afectado por diferentes virus, en diversas partes del mundo, en México solo se ha reportado al virus mosaico amarillo del frijol ("bean yellow mosaic virus," BYMV) en los campos de cultivo de gladiolo (Romero, 1996). Sin embargo, recorridos realizados por las zonas productoras de gladiolo en la zona centro, ha permitido observar una otros síntomas que indican la posible presencia de virus desconocidos o no descritos (observación personal).

En 1998 y 1999 fueron colectadas plantas de gladiolo cv. Lupita en parcelas comerciales en los estados de México, Puebla y Morelos y se realizaron varias pruebas serológicas de detección de virus. Muchas muestras estuvieron infectadas por BYMV, pero al realizar pruebas de transmisión mecánica a especies indicadoras con las mismas muestras, se separó frecuentemente a un virus diferente al BYMV, que causó síntomas de mosaico severo de color amarillo en plántulas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa*, *Cucurbita pepo* y en ocasiones se observó lesiones locales cloróticas y necróticas en *Phaseolus vulgaris*. Debido a que los síntomas observados en las plantas indicadoras, utilizadas en las pruebas de transmisión mecánica, no fueron causados por infecciones del BYMV, el objetivo de este estudio fue la caracterización de un posible virus del gladiolo no reportado previamente en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales. Se colectaron hojas procedentes de plantas de gladiolo cv. Lupita, cultivado en los estados de México, Puebla y Morelos, con síntomas de mosaico, aborto de flores y distorsión foliar (Figura 1 A). Porciones de hojas de gladiolo con síntomas fueron maceradas en solución amortiguadora 0.02 M de fosfato de sodio, pH 7.2 (1:10, p:v). El macerado de hojas fue frotado en hojas de diferentes especies de plántulas sanas, previamente espolvoreadas con carborundum, utilizando un isopo de algodón. Las hojas inoculadas fueron lavadas brevemente con agua y colocadas en invernadero hasta la aparición de síntomas. Las plántulas de las especies inoculadas fueron: tabaco (*Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. Xanthi); chile (*Capsicum annuum* cv. Ancho); toloache (*Datura stramonium*); tomate (*Lycopersicon esculentum*); tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* cv. Rendidora); bledos (*Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*); melón (*Cucumis sativus* L.); calabaza (*Cucurbita pepo* cv. Gray Zucchini); chícharo de vaca (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.

'TVu 612'); frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); y crisantemo (*Dendrathera grandiflora*).

Pruebas de transmisión con insectos vectores. Se utilizaron 50 individuos ápteros de *A. gossypii* a los que se sometió a un ayuno de 30 minutos, para después colocarlos, con ayuda de un pincel a plantas de *N. rustica*, inoculadas con el virus aislado de gladiolo 25 días antes del ensayo. Se proporcionó un periodo de alimentación-adquisición de 5 minutos, transfiriendo 5 pulgones a cada una de 10 plantas sanas de *N. rustica*, para proporcionar un periodo de alimentación-transmisión de 2 horas. El mismo tipo de ensayo se realizó utilizando plántulas de *N. tabacum* var. Xanthi. La prueba de transmisión se confirmó como positiva por la aparición de síntomas y por serología.

Microscopía electrónica: rejillas de cobre cubiertas con carbono, fueron sumergidas por 5 minutos en una gota de extracto de hojas infectadas con el virus aislado de gladiolo. Cada rejilla se colocó después en una gota de ácido fosfotúngstico al 2 % (pH 7.2) o en acetato de uranilo al 2 % (pH 6.8), por 15 minutos. Posteriormente se colocaron en papel filtro, para eliminar el líquido sobrante y observar al microscopio electrónico de transmisión Jeol 100 CX. Se realizaron preparaciones similares con purificaciones parciales del virus separado de gladiolo (Scott, 1963).

Inclusiones citoplásmicas: se determinó el tipo de inclusiones que inducen los virus en estudio, utilizando tiras de tejido epidérmico de plantas enfermas y sanas de tomate de cáscara, que se tiñeron con azul de bromofenol por 15 minutos, lavadas con agua destilada y montada la preparación con glicerol en un porta y cubreobjetos, para observar al microscopio compuesto (Christie, 1967).

Inmunodetección enzimática (ELISA): se utilizó la técnica de inmunoabsorción enzimática en fase sólida de doble "sándwich" (DAS-ELISA), para desarrollarse en dos días (Clark y Adams, 1977), para detectar infecciones por virus directamente en muestras de campo, hospedantes indicadoras y del virus purificados.

Los antisueros (Anti-IgG) utilizados en esta prueba fueron para BYMV, CMV y anti-IgG-fosfatasa alcalina para los mismos virus adquiridos en Agdia Corp. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Bio-Tek Model EL-309. En cada placa fueron incluidos antígenos positivos y negativos, diluidos con la solución amortiguadora de extracción. La detección de virus en muestras de campo se realizó en hojas y cormos de 25 plantas de gladiolo con síntomas de probable origen viral, colectadas en Atlixco, Puebla y en Oaxtepec, Morelos.

Doble difusión en agar: se utilizó la prueba de doble difusión en agar para determinar la reacción del virus aislado de gladiolo a los antisueros de dos aislamientos del virus

mosaico del pepino (CMV-Arkansas (1/500) y CMV-Louisiana (1/500), a otro del virus mosaico de la alfalfa (AMV) y uno más del “dulcamara yellow mosaic virus” (DYMV), proporcionados amablemente por el Dr. Rodrigo A. Valverde del Plant Virus Collection of Plant Pathology Department of Louisiana State University, USA. Macerados de extractos de hojas de gladiolo sanas y de plantas indicadoras infectadas inoculadas con el virus, fueron diluidos en solución amortiguadora de fosfato de sodio (0.1 M, pH 7.0) (1:2). Se agregaron 100 ml de dilución de extracto de hojas en pozos realizados en la periferia de placas de agar en cajas de Petri (0.5 % de ionagar, 5 % de NaCl en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M) y en el pozo central se colocó 100 ml de antisuero sin diluir. Cada caja fue incubada en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 48 h (Hampton *et al.*, 1990).

Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena. El ARN viral de doble cadena (ARN-dc) se obtuvo utilizando el método de cromatografía en columna de celulosa CF-11 (Morris y Dodds, 1979). El análisis del ARN-dc se realizó por electroforesis en poliacrilamida (6 %), utilizando un minigel (1.75 mm x 7 cm x 8 cm), montado en una minicámara Biorad doble. El volumen del extracto de ARN-dc, viral y de testigos fue de 40 ml por carril. Las condiciones de electroforesis fueron a 100 V por 2.5 h a temperatura de laboratorio. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (50 ng·ml⁻¹) y fotografiado en un transiluminador de luz ultravioleta o teñidos con nitrato de plata. Para calcular el peso molecular relativo del ARN-dc del virus del gladiolo se utilizaron los ARN-dc del virus mosaico del tabaco (TMV) (4.3 y 0.4 x 10⁶ Daltons) y virus mosaico del pepino (CMV) (2.0, 1.9, 1.3 y 0.5 x 10⁶ D), además de los tratamientos enzimáticos con ARNasa y ADNasa de los extractos de ARN-dc obtenidos de las plantas enfermas (Valverde *et al.*, 1990; Valverde *et al.*, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales. Varias especies de las plántulas sanas producidas en el invernadero e inoculadas mecánicamente con los macerados de hojas de gladiolo, mostraron síntomas a los 8 o 15 días después de la inoculación. Los síntomas incluyeron mosaicos, manchas anulares, deformación de hojas y lesiones locales cloróticas o necróticas en las distintas especies de hospedantes utilizadas, síntomas que se asocian a los causados por virus fitopatógenos, en la mayoría de los casos.

El virus separado de gladiolo causó mosaico, deformación de hojas y marchitez en *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annuum* y *Physalis ixocarpa*; mosaico en *Cucumis sativus* and *Cucurbita pepo*; mosaico de color amarillo brillante, manchas anulares y deformación severa de hojas en *Nicotiana glutinosa* y *N. tabacum* var. Xanthi (Figura 1B-C); lesiones locales



Figura 1. A) Estrías del mosaico en plantas de gladiolo en condiciones naturales; B) Mosaico amarillo y deformaciones en hoja de *Nicotiana rustica*; c) mosaico amarillo en *N. tabacum* cv. Xanthi; D) lesión local necrótica en *Vigna unguiculata*.

cloróticas o necróticas en *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* y *Vigna unguiculata* ‘TVu 612’ (Figura 1 D). Por el contrario no se observaron síntomas en plantas inoculadas de *Datura stramonium*, *D. metel* o en *D. grandiflora* (Cuadro 1).

CUADRO 1. Síntomas en plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con la variante amarilla de CMV (CMV-Ys), aislada de gladiolo.

Hospedantes	Variante amarilla de CMV (CMV-Ys)
<i>Nicotiana glutinosa</i>	MA
<i>N. rustica</i>	MA
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	MA
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	LLC
<i>C. amaranticolor</i>	LLC
<i>Gomphrena globosa</i>	LLN
<i>Cucumis sativus</i> L.	M
<i>Cucurbita pepo</i> L.	M
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. TVu 612	LLN
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. Bayo Madero	SS
<i>Capsicum annuum</i> L. Ancho	M
<i>Datura stramonium</i> L.	SS
<i>Lycopersicon esculentum</i>	DH
<i>Physalis ixocarpa</i>	MA

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

Pruebas de transmisión con insectos vectores: el virus separado de gladiolo fue transmitido con una eficiencia del 100 % de plantas de *N. rustica*, inoculadas mecánicamente, a plantas de *N. rustica* y *N. tabacum* var. Xanthi por el áfido *Aphis gossypii*, causando mosaico de color amarillo brillante, manchas anulares y distorsión foliar, síntomas idénticos a los obtenidos por transmisión mecánica.

Microscopía electrónica: el examen de preparaciones de macerados de hojas de plantas con síntomas inducidos por el supuesto virus de gladiolo o de purificaciones parciales, mostró únicamente partículas de simetría icosaédricas, con un diámetro aproximado de 30 nm (Figura 2).

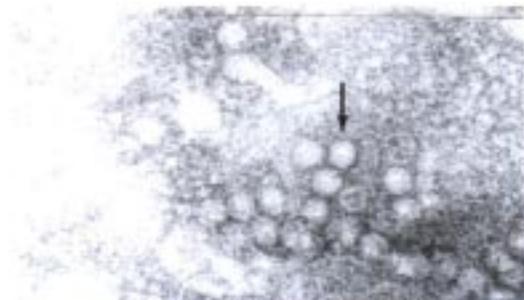


Figura 2. Partícula viral de CMV-Ys 30-nm teñida negativamente con 2 % de uranilo acetato.

Inmunodetección enzimática (ELISA): la detección de virus en 25 plantas (hojas y cormos) utilizando los antisueros de BYMV y CMV mostró que 15 plantas estaban infectadas con CMV y 10 con BYMV, y cinco se encontraron infectadas por ambos virus. En 20 de los cormos analizados se detectó el BYMV y sólo en cinco cormos se encontró infección por CMV.

Doble difusión en agar. El ensayo serológico de doble difusión en agar fue positivo únicamente para los antisueros de CMV-Arkansas y CMV-Louisiana, formándose un halo de precipitación en la periferia de los pozos que contenían los extractos de hojas de plantas de gladiolo con síntomas de mosaico o de los extractos de las plantas indicadoras en donde se transfirió el virus. No se formaron halos de precipitación en los pozos correspondientes a extractos de plantas sanas o en los casos en donde se utilizó a los antisueros de AMV o DYMV, en lugar de los distintos antisueros de CMV.

Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena: el análisis electroforético, en geles de poliacrilamida al 6 %, de ARN-dc extraído de plantas de *N. rustica*, con síntomas de mosaico de color amarillo brillante y deformación severa de plantas, producto de la inoculación

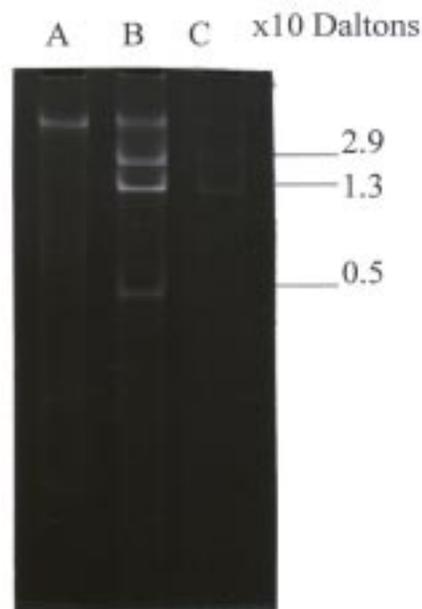


Figura 3. Gel de poliacrilamida donde se muestra el perfil electroforético ds-ARN de aislamientos de CMV (70 volts por 3.5 h). A) virus de aspermia del tomate (TAV); B-D) ARN-celular; C) CMV-del pimiento; E) planta sana; F) CMV-Ph 1 (*Physalis*); G) CMV-Ph 2 (*Physalis*); H) planta sana; I) CMV-Ys (Cepa de gladiola).

con extractos de hojas de gladiolo con síntomas de probable origen viral, mostró la presencia de cuatro bandas de ARN-dc, cuyos pesos fueron de 2.0, 1.9, 1.3 y 0.5 $\times 10^6$ Daltons, respectivamente (Figura 3 carril A). El patrón electroforético de cuatro bandas de ARN-dc, fue similar con aislamientos de CMV obtenidos de tomate de cáscara o chile (Figura 3; carril B), pero diferente con los de los virus TMV o AMV (Figura 3, carril C y D, respectivamente). No se observó ninguna de las cuatro bandas cuando se agregó ARN-asa a los extractos de ARN-dc obtenidos de *N. rustica* con síntomas de mosaico amarillo, pero el patrón electroforético de cuatro bandas se conservó aún con el tratamiento de ADN-asa (Figura 3, carril E y F, respectivamente), que indicó que el genoma del virus causante del mosaico amarillo del gladiolo es del tipo de ARN en su forma replicativa.

Los análisis electroforético de hojas de gladiolo con síntomas de mosaico amarillo o de los hospedantes susceptibles en los que se transfirió, únicamente mostraron el patrón de cuatro bandas de ARN-dc característico de CMV y en ningún caso se observaron bandas adicionales de otros posibles virus (Valverde, 1984; Holcomb y Valverde, 1991; Valverde, *et al.*, 1990).

Sin embargo, al parecer la movilidad de las bandas de ARN-dc del aislamiento de CMV de gladiolo fue al parecer diferente al de otros aislamientos de CMV que se utilizaron en este estudio. Diferentes aislamientos de CMV han sido caracterizados por análisis de ARN-dc y sus

propiedades biológicas corresponden con la movilidad del ARN-dc (Daniels y Campbell, 1992; Palukaitis *et al.*, 1983).

Por la severidad de daños causados por el aislamiento de CMV-Ys en gladiolo y en las plantas diferenciales susceptibles, se sospechó que era posible la presencia del ARN-satélite del CMV (CARNA-5 o ARN -5 asociado al CMV), el cual se puede observar en los geles de poliacrilamida como una quinta banda de 0.2×10^6 Daltons. La presencia del CARNA-5, en la mayoría de los casos, incrementa significativamente los daños del CMV, sin tener con este virus ninguna relación genética (Palukaitis *et al.*, 1983). Sin embargo, en ningún gel se observó la presencia del CARNA-5, lo que indica que la severidad del CMV-Ys está genéticamente regulada por el mismo virus y no depende de los hospedantes inoculados o de la asociación con otros virus o partículas parecidas a virus. Por esta razón es posible que el CMV separado de gladiolo sea una variante diferente a las que se han aislado de tomate, chile o tomate de cáscara, que son menos agresivas que aquella (De La Torre, *et al.*, 1998).

Se separó un virus de plantas de gladiolo con síntomas de mosaico y rayado amarillo por transmisión mecánica a plantas de hospedantes susceptibles de diferentes familias taxonómicas. El análisis en el microscopio electrónico, de extractos de plantas infectadas con el virus del gladiolo, reveló un solo tipo de partícula con simetría icosaédrica de 30 nm de diámetro y los análisis serológicos de ELISA y de doble difusión en agar, utilizando anticuerpos específicos, parecen indicar que el virus aislado de gladiolo con los síntomas antes descritos, es una variante severa del virus mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV). Por los síntomas causados por esta variante de virus, el mosaico de color amarillo brillante en las especies de *Nicotiana*, se le designó preliminarmente como CMV-Ys ("cucumber mosaic virus-Yellow strain").

CMV tiene un amplio número de especies hospedantes susceptibles y múltiples variantes que se puede diferenciar parcialmente por los síntomas de mosaico en *C. pepo*, mosaico, deformación severa de hojas en *N. glutinosa* y las lesiones locales (necróticas o cloróticas) o mosaico en *Vigna unguiculata*.

Aunque fue común la separación del CMV-Ys por transmisión mecánica, es probable que en infecciones en mezcla con los otros virus detectados por serología, la infección y multiplicación de este virus sea competitivamente más eficiente, considerando factores como la susceptibilidad de los hospedantes utilizados y las condiciones ambientales de manejo.

Los síntomas observados en los hospedantes inoculados con el virus aislado de gladiolo, permiten suponer que este es una variante del virus mosaico del

pepino (CMV) y no se detectaron aislamientos pertenecientes a los virus aspermia del tomate (TAV) ni al enanismo del cacahuete (PSV) miembros también del grupo de Cucumovirus (Francki *et al.*, 1979; Kaper y Waterworth, 1981).

Las variantes del CMV pueden ubicarse por la sensibilidad térmica en la inducción de síntomas, en los subgrupos CMV-I y CMV-II, que corresponden a los serotipos CMV-LQ y CMV-Cyn, respectivamente (Hasse, *et al.*, 1989).

Las variantes del grupo CMV-I no son sensibles a 32 °C, causando síntomas aún a mayores temperaturas. Variantes de este subgrupo se encuentran en regiones tropicales y subtropicales. El subgrupo CMV-II causa síntomas a 25 °C, pero no a 32 °C y sus variantes se localizan en regiones templadas (Owen y Palukaitis, 1988).

Los aislamientos de CMV obtenidos de gladiolo se identificaron como variantes pertenecientes al subgrupo CMV-Ib. Los subgrupos de CMV pudieron ser diferenciados, sin necesidad de pruebas serológicas adicionales, ya que el subgrupo CMV-Ia causó mosaico sistémico reticular en *V. unguiculata* y el subgrupo CMV-Ib indujo lesiones locales necróticas, sin mosaico sistémico en el mismo hospedante (Daniels y Campbell, 1992).

Será importante continuar con la caracterización biológica del CMV y sus variantes, considerando que CMV tiene una distribución mundial e infecta a una gran variedad de plantas, siendo uno de los 10 virus más importantes en el mundo y de que numerosas variantes de este virus han sido reportadas en muchos cultivos (Kaper y Waterworth, 1981; Hasse, *et al.*, 1989; Owen y Palukaitis, 1988). Aislamientos de CMV han sido reportados en México afectando cultivos como tomate y tomate de cáscara (Pacheco y Apodaca, 1992; De La Torre *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

Se determinó que una variante del virus mosaico del pepino ("cucumber mosaic virus"), CMV, no descrita previamente en México, causa un rayado y mosaico de color amarillo intenso, deformación foliar y aborto de flores en plantas de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*), que se cultiva en los estados de México, Puebla y Morelos. Por el tipo de síntomas que causa, a este aislamiento de CMV se le denominó preliminarmente como "yellow strain" de CMV (CMV-Ys). Esta variante de CMV-Ys causó mosaico amarillo intenso, manchas anulares, severa distorsión foliar y marchitez en varias de las especies de solanáceas en donde se inoculó. Las características biológicas de esta variante de CMV indicaron que es CMV-Ys es diferente a otros aislamientos de CMV encontrados en México, con los que se comparó. CMV-Ys se aisló de plantas infectadas

en el campo y de los cormos que se utilizan para el cultivo. No se conocen las pérdidas que causa esta variante de virus en gladiolo, por lo que es recomendable realizar estudios complementarios para conocer los daños que causa en la producción de flor y la distribución de este virus en gladiolo, así como promover el uso de cormos libres de este virus para prevenir los daños en este cultivo.

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO, 1991. Estadísticas de importaciones de flores realizadas por E.U.A. por tipo de flor y país. *Floricultura Intensiva* 2: 29-32.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. M. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- CHRISTIE, R.G. 1967. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. *Virology* 31:268-271.
- DANIELS, J.; CAMPBELL, R. N. 1992. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. *Plant Dis.* 76:1245-1250.
- DE LA TORRE, A. R.; TÉLIZ, O. D.; CÁRDENAS, S. E.; BARRÓN, R. B. L.; GARCÍA, L. E.; CÁRDENA, A. M.; RIVERA, R. R. 1998. Identificación de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16:1-11.
- FRANCKI, R. I. B.; MOSSOP, D. W.; HATTA, T. 1979. Cucumber mosaic virus, pp.1-6. *In: Description of Plant Viruses. Commonw. Mycol. Inst./ Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.* No 213.
- HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. *The American Phytopathological Society. APS Press.* pp. 387.
- HASSE, A.; RICHTER, J.; RABENSTEIN, F. 1989. Monoclonal antibodies for detection and sero-typing of cucumber mosaic virus. *J. Phytopathology* 127: 129-136.
- HOLCOMB, G. E.; VALVERDE, R. A. 1991. Identification of a virus causing a mosaic on coleus. *Plant Dis.* 75: 1183-1185.
- KAPER, J. M.; WATERWORTH, H. E. 1981. Cucumovirus. pp 257-331 *In: Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis.* E. Kurstak (ed.) Elsevier/North-Holland Bimedical Press. Amsterdam, Netherlands.
- MORRIS, T. J.; DODDS, J. A. 1979. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus- infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.
- OWEN, J.; PALUKAITIS, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I.Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166:495-502.
- PALUKAITIS, P.; GONSALVES, D.; ZAITLIN, M. 1983. A comparison of four satellites RNAs of cucumber mosaic virus. Plant infectious agents. *Current Communications in Molecular Biology.* Cold Spring Harbor Lab. Boca Raton, Florida. USA. pp. 171-174.
- ROMERO C., S. 1996. *Plagas y Enfermedades de Ornamentales.* Edit. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 114-129.
- SCOTT, H. A. 1963. Purification of cucumber mosaic virus. *Virology* 20: 103-106.
- TAYAMA, H. K. 1991. Producción global de flor fresca para corte, comercio internacional y demandas mundiales de consumo: una panorámica y prospectiva hacia el siglo XXI. *Apuntes mimeográficos.* Puebla, México UPAEP. 12 páginas.
- VALVERDE, R. A. 1984. Unusual strain of cucumber mosaic virus causing flower- breaking symptoms in wild violets. *Plant Disease* 68: 913-915.
- VALVERDE, R. A.; NAMETH, S. T.; JORDAN R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.
- VALVERDE, R. A.; PROVVIDENTI, R.; CLARK, C. A. 1990. Cucumber mosaic virus and Desmodium yellow mottle virus infections in wild groundnut (*Apios americana*). *Plant Disease* 74: 151-153.