



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Enfoque metagenómico para la identificación de
virus y viroides en durazno (*Prunus pérsica* L.
Batsch) de la región centro de México.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA

FABIOLA VELASCO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARÁZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT (Clave del proyecto: IN218914), cuyo título de Proyecto fue: “Caracterización molecular de dos nuevas especies de trichovirus del durazno (*Prunus domestica*) en la región del centro de México “.

 - A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por la gran formación académica y profesional.

 - A los miembros del Jurado:
 - Dr. Jorge E. Campos Contreras
 - Dra. Martha Martínez García
 - Dr. Saúl Flores Maya.
 - M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes
- Por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.
- Mi gran sincero agradecimiento a mi tutor Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz por su asesoría, apoyo, comentarios, enseñanzas y por todas las oportunidades de la que me hizo partícipe.

 - A mis compañeros de laboratorio: Héctor, René, César, David y Miriam, por su apoyo, enseñanzas, risas, oh

A mis padres

Porque gracias a su apoyo y consejo he llegado a realizar la más grande de mis metas, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir.

Con admiración y respeto:

Fabiola

ÍNDICE

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
Características generales de los virus en plantas. _____	14
Características generales de los viroides en plantas. _____	17
ARN satélites _____	18
Virus reportados en durazno en el mundo y México. _____	18
Diagnóstico molecular de virus y viroides. _____	21
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Transcripción inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) _____	21
Metagenómica _____	21
RNA-seq como técnica para la identificación de virus en plantas. _____	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO	24
MATERIALES Y MÉTODO	25
Recolecta de material _____	25
Ensayo serológico (DAS-ELISA) _____	26
Extracción de ácidos nucleicos de origen viral _____	26
Método de Dellaporta _____	26
Extracción y análisis electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) de RNA de doble cadena. _____	27
Extracción de ARN total por Trizol _____	27
Determinación de la presencia de virus Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) _____	28
Secuenciación directa, análisis y comparación nucleotida _____	30
Secuenciación masiva de RNA-seq de muestras de durazno _____	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

Detección por serología (DAS-ELISA)	32
Extracción y análisis electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) de RNA de doble cadena.	33
Determinación de la presencia de virus por Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	36
Secuenciación nucleotídica directa de productos de la RT-PCR de un fragmento del a proteína de la cápside de PNRSV.	38
Secuenciación masiva de RNA-seq de muestra durazno.	39
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro 1. Cuadro 1. Virus y viroides que infectan a durazno (<i>Prunus pérsica</i> (L. Batsch)	19
Cuadro 2. Secuencias de cebadores usados para los ensayos de RT-PCR.....	28
Cuadro 3 . Genomas virales ensamblados de los datos de RNA-seq, con porcentajes de identidad a nivel de gen y el genoma completo, comparados mediante BLASTN y BLASTX con secuencias disponibles en el GenBank	41
Figura 1. Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno cultivadas en Coltzingo, Puebla.	14
Figura 2. Clasificación de Baltimore, basada en el genoma presente en el virión.....	15
Figura 3. Familias y géneros de virus que infectan plantas.....	16
Figura 4. Mapa de la zona de colecta de hojas de durazno en el Edo. De Puebla.....	25
Figura 5. Análisis electroforético de muestras de durazno para detección de ARNdc en gel de poliacrilamida.	34
Figura 6. Análisis electroforético de muestras de durazno para detección de ARNdc en gel de agarosa al 1.4%	35
Figura 7. RT-PCR de muestras de durazno para detectar el gen de la CP de PNRSV corridos en gel de agarosa al 1%	36
Figura 8. RT-PCR de muestras de durazno para detectar el componente RNA-3 de PNRSV corridos en gel de agarosa al 1%	37
Figura 9. RT-PCR de muestras de durazno para detectar PLMvd	38
Figura 10. Secuencia parcial de 409 pb del producto de RT-PCR de la CP de PNRSV....	39

Figura 11. Dendograma de los genomas completos de las secuencias obtenidos mediante BLAST que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMéxico1, la cual presenta una mayor relación con PcMV..... 43

Figura 12. Dendograma del genoma completo de las secuencias obtenidos mediante BLAST, que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMéxico2 , la cual presento una mayor relación con PCMV..... 44

Figura 13. Dendograma del genoma completo con las secuencias obtenidas mediante BLAST, que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMéxico3, la cual está más relacionada con los genomas de Cherry green ring mottle viru CGRMV y CTLV. 45

Figura 14. Dendograma del genoma completo de algunos de los géneros de la familia Betaflexiviridae. Además, de la cercanía de los genomas obtenidos de los virus de durazno 46

Figura 15 Dendograma, para el gen de la CP en la familia Betaflexiviridae. Además, de la cercanía del genoma de la CP obtenidos de los virus de durazno. 47

Figura 16 Dendograma para el gen de la RdRp en la familia Betaflexiviridae. Además, de la cercanía del genoma de la RdRp obtenidos de los virus de durazno..... 48

Figura 17. Esquema de la composición genómica de los Trichovirus. 50

Figura 18. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico 50

Figura 19. Esquema de la composición genómica de género Foveavirus. 52

Figura 20. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico2. 52

Figura 21. Esquema de la composición genómica de género Robigovirus 54

Figura 22. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico3. 54

GLOSARIO DE ABREVIACIONES

ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*

APLPV: *American plum line pattern virus*

ArMV: *Arabis mosaic virus*

BLAST: Basic Local Alignment Search Total

CGRMV: *Cherry green ring mottle virus*

CMLV: *Cherry mottle leaf virus*

CMV: *Cucumber mosaic virus*

CP: (Coat Protein) Cápside

DAS-ELISA: (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de sandwich de doble anticuerpo

DNAs: DNA de cadena sencilla

DNAdc: DNA de doble cadena

HSVd: *Hop stunt viroid*

MLRSV: *Myrobalan latent ringspot virus*

MP: (Movement Protein) Proteína de movimiento

NBP: (Nuclear Binding Protein) Proteína de unión nuclear

NGS: (Next Generation Sequencing) Siguiente Generación de Secuenciación

OpVX: *Opuntia virus X*

ORF: (*Open Read Frame*) Marco de lectura abierto

PCMV: *Peach chlorotic mosaic virus*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDV: *Prune dwarf virus*

PLMVd: *Peach latent mosaic viroid*

PcMV: *Peach mosaic virus*

PNRSV: *Prunus necrotic ringspot virus*

PPV: *Plum pox virus*

PRMV: *Peach rosette mosaic virus*

RdRp: (RNA-dependent RNA-polymerase) ARN Polimerasa dependiente de ARN

RNAcs+: RNA de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3'

RNAcs-: RNA de cadena sencilla de sentido negativo

RNAdc: RNA de doble cadena

RNAs: RNA small

RT-PCR: Transcripción inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa

SchVX: *Schlumbergera virus X*

TGB: (Triple gene block), bloque de gen triple

ToRSV: *Tomato ringspot virus*

TRSV: *Tobacco ring spot virus*

UTR: (Untranslated region) Región no traducible.

RESUMEN

El durazno (*Prunus pérsica* (L. Batsch) es considerado como uno de los árboles frutales más importantes del mundo y de México. Durante recorridos en huertas comerciales de durazno realizados en Puebla en 2016, se observaron daños foliares que se atribuyen a las causadas por virus así como patógenos similares, como los viroides, presentando anillos cloróticos, moteado amarillo y mosaico de color amarillo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue la confirmación de la presencia de virus y viroides en las muestras de durazno recolectadas de la región centro de México, con daños de origen viral; así como identificar y caracterizar molecularmente la presencia de virus de origen desconocido. Los ensayos serológicos (DAS-ELISA) fueron positivos para *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). En el análisis electroforético de RNAdc se observaron patrones con diferente peso molecular, que indican la probable presencia de un conjunto de virus en las muestras. Ensayos de RT-PCR utilizando distintos juegos de cebadores específicos para cada virus y viroide reportados en México, rindieron amplicones en el tamaño esperado para PNRSV y el viroide PLMVd, la identidad del PNRSV se confirmó a través de secuenciación directa, la comparación de la secuencia que amplificó la región de la CP, con las disponibles en el GenBank, confirmaron la identidad de este virus mostrando una similitud del 94 % con otros aislados de PNRSV. En base a los anteriores resultados y la posible mezcla de virus en las muestras de durazno, se realizó un análisis de secuenciación masiva RNA-Seq a partir de RNA total de muestras de durazno, para obtener los genomas completos de los posibles virus. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por RNA-Seq y la construcción de dendogramas, demostró la probable presencia de tres genomas de virus filamentosos de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, confirmando la identidad del Peach mosaic virus (PcMV. Trichovirus), Peach

chlorotic mottle virus (PCMV. Foveavirus) y Cherry green ring mottle virus (CGRM. Robigovirus). Los tres virus se ubicaron en la Familia Betaflexiviridae, Orden : Tymovirales.

INTRODUCCIÓN

El durazno (*Prunus pérsica* (L. Batsch), es considerado como uno de los árboles caducifolios más importantes del mundo, perteneciendo a la Familia *Rosáceas*. Son árboles de siete años de edad, con un buen manejo producen en promedio 15 toneladas de durazno por hectárea. Tiene un requerimiento de frío de 350 horas y su periodo de floración a cosecha oscila entre 120 y 130 días. El fruto pesa alrededor de 90 gramos, firme, de forma redonda con punta y sutura visible, madura de forma homogénea. Presenta una coloración externa totalmente amarilla en la maduración. Es rico en carbohidratos y pobre en proteínas y grasas. Contiene numerosos minerales y vitaminas esenciales.

Se considera que en la actualidad se produce en todo el mundo entre 10 y 11.5 millones de toneladas (To) de duraznos y nectarinas. Tan solo China aporta 2,837,620 To, que representan el 24% del total mundial producido. Le siguen Italia y Estados Unidos con 1,505,870 y 1,287,430 To, que representan el 12.5 y el 10.8% respectivamente. Otros países que son importantes productores son España, Grecia y Francia (Sagarpa, 2012).

México es el onceavo productor mundial de durazno con una participación de la producción del 1%. Tan solo en el año 2015, contó con una superficie sembrada de 35,692.84 hectáreas (Ha), con una producción de 176,302.74 (To) derivando un rendimiento promedio de 5.97 (To/Ha), con un valor de la producción de \$1,380,720.49 pesos. Son 25 estados los que se dedican al cultivo del durazno, siendo los principales: Zacatecas, Michoacán, Estado de México, Puebla, Chihuahua, Aguascalientes, Jalisco, Tlaxcala, Morelos, en cuyas huertas se cosecha el 75% de la producción mexicana. Tan solo en el estado de Puebla en el 2015 tuvo una superficie sembrada de 4,294.48 Ha con una producción de 22,283.17 To derivando un

rendimiento promedio de 5.56 Ton/Ha y un valor de producción estimado en \$161,762.31 pesos (SIAP, 2017).

La producción de durazno puede ser afectada por un grupo importante de patógenos, los virus. Estos patógenos son responsables de la reducción en el crecimiento, rendimiento y calidad en las cosechas, causando pérdidas económicas importantes a los productores de todo el mundo. Durante recorridos realizados en huertas comerciales de durazno en Puebla, se observaron daños foliares que se atribuyen a las causadas por virus así como patógenos similares, como los viroides. Se presentan anillos cloróticos, moteado amarillo y mosaico de color amarillo, en las hojas (Figura 1). Los moteados al crecer forman mosaicos y patrones lineales o anillos irregulares. El follaje de las plantas afectadas adquiere una tonalidad amarillenta o clorosis y causa una defoliación severa. Los frutos pueden presentar manchas tenues anilladas de color rojizo y reducción del tamaño y color del fruto, así como un retraso en su madurez (De la Torre *et al.*, 2014). Por la sintomatología observada, a esta enfermedad la denominamos como “moteado amarillo del durazno”.

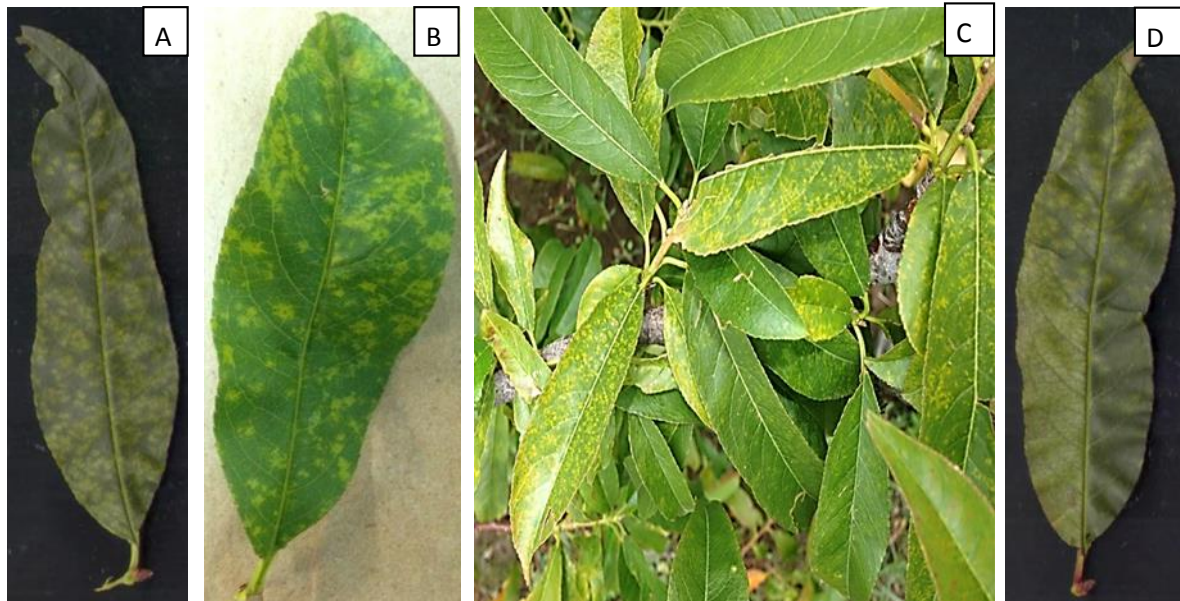


Figura 1. Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno cultivadas en Colzingo, Puebla. A y B) Anillos cloróticos o moteado amarillo C) moteado y mosaico D) mosaico y patrones irregulares

Características generales de los virus en plantas.

Los virus son parásitos intracelulares obligados, cuyo genoma está compuesto de uno o más componentes de ácido nucleico (DNA o RNA), que se encuentran dentro de una cápside; esta en algunos virus se encuentra rodeada por una envoltura de naturaleza lipoproteíca, a estos se les denomina virus con envoltura. En la capa lipoproteíca se pueden encontrar asociadas glicoproteínas o espículas. Los tamaños de los virus van desde los 18 nm (nanómetros) a más de 2000 nm. La forma de la cápside puede ser icosaédrica; de varilla rígida o flexible, baciliformes, redondos o pleomórficos (con envoltura), otros poseen estructuras sumamente complejas. El genoma de los virus está constituido de uno, dos, tres o varios componentes o “cromosomas”, a los que se denomina monopartita, bipartita, tripartita o multipartita, respectivamente (De La Torre, 2012).

La clasificación reciente de virus comprende 7 grupos independientes, propuesto por el sistema de Baltimore de 1971, esta clasificación se basa en el genoma presente en el virión (Figura 2), el cual es la partícula viral completa y con capacidad infectante.

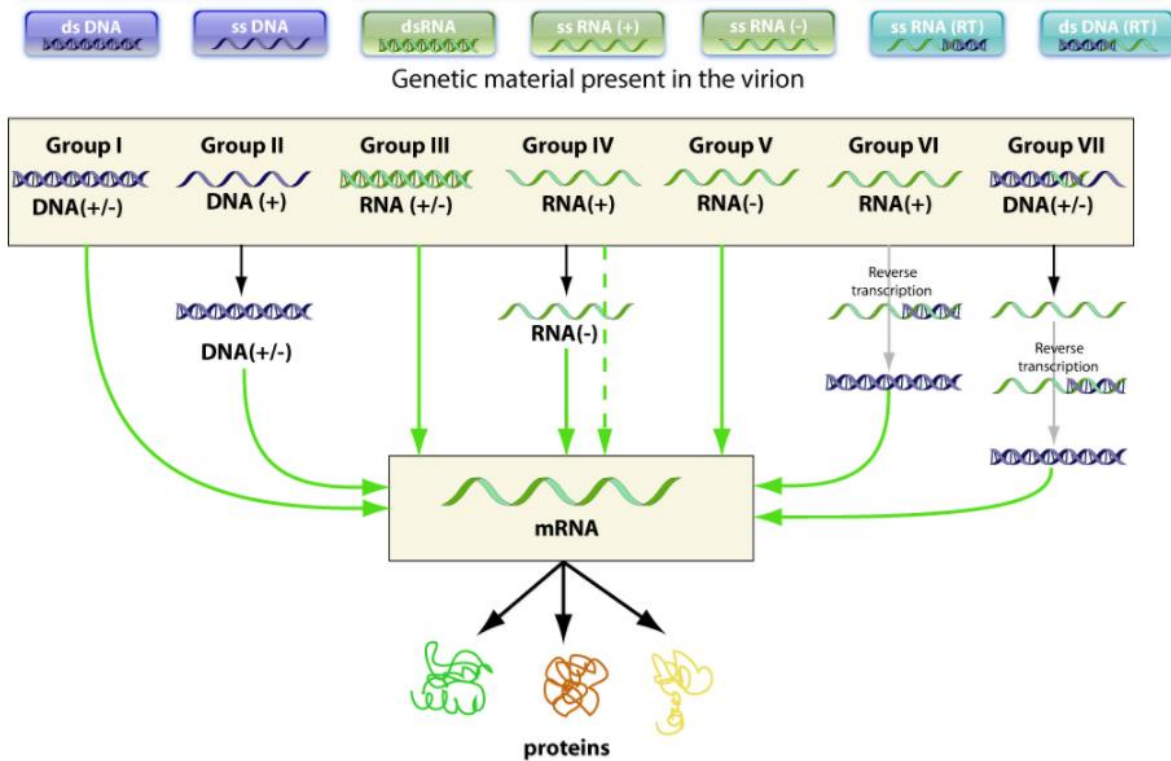


Figura 2. Clasificación de Baltimore, basada en el genoma presente en el virión. Tomado de Viral Zone, 2017

La mayoría de los virus que afectan a plantas poseen un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3' (RNAs +), que comprenden el grupo IV de la Clasificación de Baltimore. Existen virus de RNA de doble cadena (RNA dc, grupo III), la familia *Reoviridae* es la más grande de este grupo. De igual forma hay virus de ADN de cadena sencilla (grupo II) como la familia de los *Geminiviridae*. Son pocos los virus de plantas que poseen ARN de cadena sencilla de sentido negativo (ARNcs-, grupo V), como los virus de la familia *Rhabdoviridae*, mientras que los *Caulimoviridae* es la única familia de virus de ADN de

Generalmente en el caso de los virus de ARNcs + , poseen un gen que codifica la proteína usada en la replicación para la producción de ácidos nucleicos (*RNA-dependent RNA-polimerase*, RdRp), existen también genes para proteínas estructurales, como las proteínas que conforman la cápside (*Coat Protein*, CP), y otros componentes de la partícula viral, hay genes que codifican proteínas de movimiento (*Movement Protein*, MP) implicadas en el transporte del virus en las células contiguas a la que está infectado (Hull, 2014).

Los virus solo pueden infectar (por transmisión natural o artificial) y multiplicarse en células vivas de hospedantes susceptibles específicos, de donde utilizan los sistemas de transcripción y traducción para la síntesis de sus propias proteínas virales, lo que conduce a la alteración de los procesos normales de las células infectadas, que se traduce a la expresión microscópica y macroscópica de diversas clases de síntomas (De La Torre, 2012).

La respuesta vegetal a una infección puede ser desde asintomática hasta enfermedad severa y muerte de la planta. En algunos casos, en el lugar de infección se desarrollan lesiones localizadas (pequeños puntos cloróticos o necróticos), se dispersan a través de toda la planta causando una infección sistémica. La amplitud de hospederos para cada especie de virus, pueden ser muy reducidos o muy amplios. Dependiendo de la combinación especial de virus y hospedante, y de las condiciones ambientales (Gergerich y Dolja, 2008).

Características generales de los viroides en plantas.

Los viroides son ARNs infectivos, fueron descubiertos por Diner en 1967 (Astier *et al.*, 2001). Son ARN monocatenario circular de 250-400 nucleótidos que no codifican proteínas y no se transmiten, pero pueden viajar de célula a célula (dentro de la planta). Se replican en el núcleo de las células infectadas o en los cloroplastos: La RNA polimerasa celular lo replica

por su similitud con un ADN originando un RNA multimérico que es cortado en unidades individuales por la actividad ribosómica del propio viroide. Puede haber entre 200-10000 copias. Causan numerosas enfermedades en plantas, similares a las provocadas por virus. No se conocen que infecten a animales ni a procariontes (Flores, 2011).

ARN satélites

Son pequeñas moléculas de tamaño y estructura similar a viroides de plantas. Codifican unos productos génicos. Se empaquetan en cápsides de determinadas cepas de virus (virus colaborador), solo se replican en presencia de este, el cual aporta componentes necesarios para que complete su ciclo y modifican los efectos patogénicos del mismo (los aumentan o los disminuyen), (Martín, 2017).

Virus reportados en durazno en el mundo y México.

Existe una gran variedad de virus que infectan a los frutales de durazno en el mundo principalmente del género Ilarvirus, Potyvirus y Trichovirus (Uyemoto y Scott 1992; Brunt *et al.*, 1996; Pallas *et al.*, 2012): Cuadro 1. Cabe señalar que algunas plantas pueden ser afectadas por más de un virus, en algunos casos aumentando o disminuyendo los síntomas previamente descritos.

Cuadro 1. Virus y viroides que infectan a durazno (*Prunus pérsica* (L. Batsch)

<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)
Género: Ilarvirus
<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV)
Género: Fabavirus
<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)
Género: Secoviridae
<i>Cherry mottle leaf virus</i> (CMLV)
Género: Trichovirus
<i>Peach mosaic virus</i> (PcMV)
Género: Trichovirus
<i>Myrobalan latent ringspot virus</i> (MLRSV)
Género: Nepovirus
<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)
Género: Nepovirus
<i>American plum line pattern virus</i> (APLPV)
Género: Ilarvirus
<i>Plum pox virus</i> (PPV)
Género: Potyvirus

Plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNSPaV)

Género: Ampelovirus

Peach chlorotic mosaic virus (PCMV)

Género: Foveavirus

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

Género: Trichovirus

Peach latent mosaica viroid (PLMVd)

Género: Pelamoviroid

Hop stunt viroid (HSVd)

Género: Hostuviroid

En México se ha detectado el *Tobacco ring spot virus* (TRSV), *Peach rosette mosaic virus* (PRMV), *Prune dwarf virus* (PDV), (Velásquez, 2012). En estudios de la región centro de México el material vegetativo con síntomas de moteado amarillo se han asociado a: PCMV (Oldfield *et al.*, 1995); PNRSV (De La Torre, 2014); PLMVd (De La Torre *et al.*, 2015). En experimentos previos realizados de 2008 al 2010 en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en hojas y ramas tiernas de durazno de localidades del Estado de México, Morelos y Puebla, se obtuvieron aislados que indicaban la presencia de nos nuevas especies de Trichovirus, uno de los aislados se designó como “TrichoMex” y el otro como “PMVMex” (datos no publicados).

Diagnóstico molecular de virus y viroides.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Transcripción inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Transcripción inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), ha surgido como una metodología de grandes alcances y ampliamente utilizada en investigación biológica ya que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos, esta tecnología es rápida y precisa (Stock, 2006), permitiendo la amplificación de regiones específicas y altamente conservadas del genoma del virus de interés, este método se complementa con la secuenciación del fragmento amplificado del virus y confirmar su identidad por comparación con secuencias similares disponibles en la base de datos del Gen Bank.

Metagenómica

La metagenómica es el análisis de las comunidades microbianas en muestras ambientales a través de la secuenciación (Grasso, 2006). Es un conjunto de técnicas que permite obtener todos los fragmentos de ADN y ARN (huellas genéticas) que contiene una muestra concreta, para luego traducirlos a un lenguaje que pueda ser leído (secuenciación) y compararlos con todas las huellas genéticas conocidas y publicadas hasta el momento, almacenadas en bases de datos como GenBank. En definitiva, se basa en obtener las secuencias de ADN y ARN de las muestras objeto de estudio y compararlas con todas las secuencias conocidas, permitiéndonos buscar la homología entre ambas (Rubio-Guerri *et al*; 2012)

La metagenómica viral ha sido una herramienta poderosa en el descubrimiento de virus asociados a enfermedades de etiología desconocida que comparten poca identidad con virus conocidos o que no habían sido asociados anteriormente a una enfermedad.

Para los virus de plantas, estos estudios son todavía relativamente nuevos, demostrando que nuestro conocimiento actual subestima la diversidad de estos virus. Algunos estudios de virus de plantas están utilizando miles de plantas individuales, de manera que cada secuencia se remonta a su huésped. El hallazgo de nuevos virus de plantas que no causan síntomas en su huésped de planta silvestre, cambia nuestra percepción de los virus y cómo interactúan con sus anfitriones. Al igual que se han encontrados nuevos virus en plantas no domésticas, que podrían representar una amenaza para las plantas domésticas (Roossinck, 2012).

Una estrategia utilizada en metagenómica es la secuenciación masiva de todo del DNA presente en una muestra (NGS, por sus siglas en inglés Next Generation Sequencing), siendo un procedimiento mediante el cual es posible leer la sucesión de nucleótidos en varios fragmentos diferentes de DNA de manera simultánea. (Cobián, 2013).

RNA-seq como técnica para la identificación de virus en plantas.

La secuenciación de RNA por NGS, RNA-Seq, es una revolución para la detección de virus. La mayoría de los virus vegetales conocidos tienen un genoma de ARN, que puede ser detectado usando RNA-Seq, generando un panorama más amplio sobre el viroma presente en el huésped, así como nuevos y conocidos transcritos relacionados con defensa vegetal (Nagano *et al.*, 2015). Los datos arrojados por RNA-seq tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de PCR (Nagalakshmi *et al.*,

2008). Además, también se ha mostrado que los resultados son altamente reproducibles (Wang *et al.*, 2009).

La secuenciación masiva de ARN ha logrado identificación de nuevos virus pertenecientes a los géneros de Badnavirus y Mastrevirus en camote (*Ipomoea batatas*), (Kreuze *et al.*, 2009). En este mismo cultivo, pero reportados en Guatemala y Honduras se identificó 5 virus: *Sweet potato feathery mottle virus* y *Sweet potato virus C* (Potyvirus), *Sweet potato chlorotic* (Crinivirus), *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (Begomovirus *sp.*), y *Sweet potato badnavirus B* (Kashif *et al.*, 2012). En Sudáfrica en cultivos de uva se logró aislar 4 virus *Grapevine leafroll-associated virus 3*, *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, *Grapevine virus A.*, *Grapevine virus E* y un nuevo virus similar a *Penicillium chrysogenum virus* (*fam. Chrysoviridae*), (Coetzee *et al.*, 2010). En plantas de jitomate en México se obtuvo la secuencia completa de una nueva especie de *Tobamovirus*, (Li *et al.*, 2013). En cultivares de nopal verdura en México, se determinó la presencia e identidad del *Schlumbergera virus X* (SchVX) y *Opuntia virus X* (OpVX) , ambos del género de Potexvirus, *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) del género de Tobamovirus, además de un Carlavirus no identificado anteriormente (Salgado-Ortíz, 2016).

Por lo tanto, la RNA-seq representa una herramienta universal, con buenos resultados, para el diagnóstico e identificación de virus. En base a estos antecedentes y a la amplia diversidad de los daños observados en las plantas de durazno, así como por su incidencia, se planteó la posibilidad de que estos daños fueran causados por diferentes especies de virus (o patógenos similares) o de variantes altamente patogénicas. Por lo cual se planteó la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

Considerando el número de virus que se han reportado afectando al durazno (*Prunus pérsica*) en el mundo y en México al igual que la amplia diversidad de daños observados, es muy probable que existan otros virus y viroides aún no detectados e incluso desconocido en los materiales recolectados en la región centro de México.

OBJETIVO

- Confirmar la presencia de virus y viroides, presentes en las muestras recolectadas de durazno, con daños en forma de anillos cloróticos, moteado amarillo y mosaico de color amarillo; así como identificar y caracterizar molecularmente la presencia de virus de probable origen desconocido.

MATERIALES Y MÉTODO

Recolecta de material

Se recolectaron muestras de hojas de árboles de durazno con síntomas de moteado amarillo en huertas comerciales en la localidad de Santiago Coltzingo, Municipio de Tlahuapan, en Estado de Puebla (Figura 4).

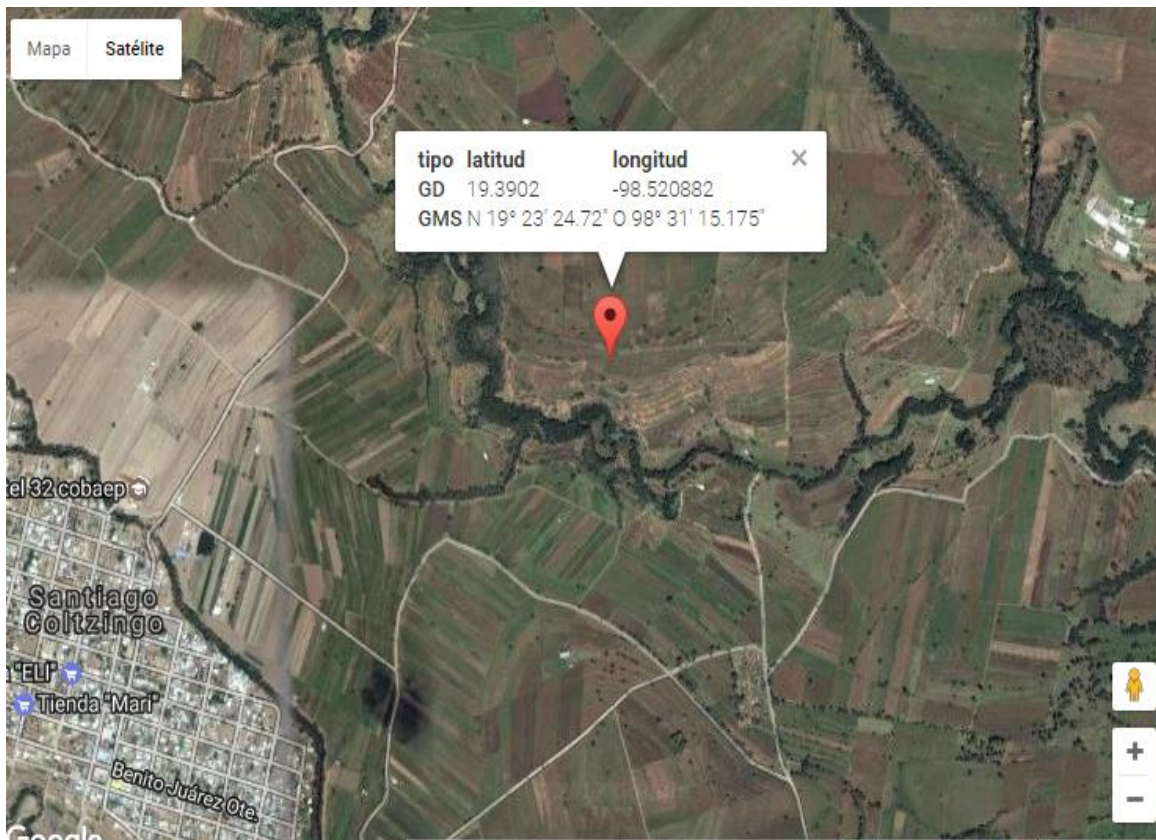


Figura 4. Mapa que muestra la zona de colecta de hojas de durazno en el Edo. De Puebla

Las muestras obtenidas fueron colectadas en bolsas de plástico y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ensayo serológico (DAS-ELISA)

La detección de la proteína viral fue llevada a cabo por inmunoadsorción ligada a enzimas en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA). Se utilizaron antisueros policlonales comerciales (Agdia, Inc., Elhart, IN) específicos para detectar *Prunus dwarf virus* (PDV) y *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), virus reportados en Durazno. La absorbancia de las reacciones antígeno-anticuerpo se registró en un micro lector a 405 nm, a los 60 minutos después de la adicción del sustrato.

La reacción fue considerada positiva tomando en cuenta dos criterios: La observación visual directa de la intensidad del color amarillo de los pocillos con muestras de durazno comparándolos con los testigos positivos y bien si la absorbancia era igual o superior a la lectura del control positiva.

Extracción de ácidos nucleicos de origen viral

Para poder determinar la presencia de virus y viroides asociados al moteado amarillo en durazno se utilizaron tres métodos de extracción de ácidos nucleicos.

Método de Dellaporta

Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales, por medio del método modificado de Dellaporta *et al.*, 1983, tomando 1 g de tejido, macerado con buffer de extracción. Se adicionó fenol-cloroformo, volumen a volumen y se centrifugó a 12000 rpm, obteniendo así la fase orgánica. Para obtener la precipitación de los ácidos nucleicos se agregó Isopropanol y Acetato de Amonio 10 M, centrifugando a 12 rpm. La pastilla que se obtiene se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 μ l de agua doble destilada libre de nucleasas, guardando el DNA a -20°C.

Extracción y análisis electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) de RNA de doble cadena.

Se realizó la extracción de ARN-dc, por medio del método modificado de Valverde *et al.*, 1990, tomando 3.5 g de tejido macerado en Buffer STE 1x, para lograr la separación de la fase orgánica se adicionó Fenol: STE 1x, SDS 10%, Bentonita 2%, centrifugando a 8000 rpm. Posteriormente se realizó columnas de celulosa CF 11 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo) que tiene la capacidad de adherirse al ARN-dc y elimina sustancias innecesarias, las columnas fueron eluidas con etanol. Después para lograr la precipitación del ARN-dc se adicionó Acetato de Sodio 3M, centrifugando a 8000 rpm, y se resuspendió la pastilla en 200 µl de agua doble destilada libre de nucleasas. La alícuota se conservó a -20 °C.

Las extracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% a 100 V por 2.5 hrs. Se incluyó como marcador molecular, el ARN-dc del *Cucumber mosaic virus* (CMV que contiene fragmentos de 3.4, 3.1, 2.2, 1.0 y 0.35 kilobases). Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y posteriormente con solución de Nitrato de Plata (0.011M).

Extracción de ARN total por Trizol

Se obtuvieron extracciones de ARN total, mediante el kit de Trizol (Ivitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Macerando el tejido, en un buffer de extracción de dicho fabricante, separando la fase orgánica y acuosa en presencia de cloroformo, para después precipitarlo con isopropanol y resuspenderlo en H₂O libre de nucleasas.

Determinación de la presencia de virus Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la identificación de los posibles virus asociados a los síntomas del moteado amarillo en las hojas de durazno se desarrollaron ensayos de RT-PCR, en un solo paso (SuperScript® III Platum® One-step, Invitrogen, Carlsbad, CA), usando varios pares de cebadores para detectar: PNRSV, PLMVd, “PMVMex” y “TrichoMex” estos dos últimos son específicos para los aislados encontrados en México: Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias de cebadores usados para los ensayos de RT-PCR.

Virus o Viroide	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño aproximado
<u>PNRSV</u>	VP 968s	CACAAAGCTTGTTTTTACAATCGAAATCGTAAC	1800 pb
	VP969s	CACAAAGCTTGTTGTTTTTACCAAAATGAAATCGT	
		AAC	
	VP 970s	CACAAAGCTTGTTTTTATATGCCAGAAATCGTAAC	
	VP 313as	CACACTGCAGCTTCCCTAACGGGGC	
<u>PNRSV</u>	PNRSVF-	ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA	455 pb
	C537	TGGTCCCACTCAGAGCTCAACAAAG	
	PNRSVR-H83		
<u>PLMVd</u>	PLMVd F-	CACACTCGAGCAGGTACCGCCGTAGAA	340 pb
	1174	CACAGTCGTCGACCCCCCTCGGAACCA	
	PLMVd R- 1180		
TrichoMe x	VP 2025	GGGCTTTGACCTGGCAGATCTG	509 pb
	VP 2026	CACTCCCACTGGTTAGTTCC	

PMVMex	VP 2132	TGACGTTGGCTTGTACGACACC	650 pb
	VP 2177	ACA AAACCTGTATGAAGG TGCG	

Para detectar los posibles virus del género Trichovirus que fueron detectados en México (datos no publicados), se utilizaron los cebadores para "TrichoMex" (VP 2025/VP 2026) amplifican la región NBP (Nuclear Binding Protein) y la UTR 3' (untranslated region UTR por sus siglas en inglés) completa, con un amplicón de 509 pb y los cebadores para "PMVMex" (VP 2132/VP2177) amplifica completo el marco de lectura abierto (*open reading frame* ORF por sus siglas en inglés) de la CP y la mitad del ORF de la MP, rindiendo un producto de 650 pb, ambos aislados

Para los virus PcMV y "TricoMex", así como el viroide PLMVd (Mac-Kenzie *et al.*, 1997; Delano y Upton, 1999; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005), se utilizaron las condiciones de 40 ciclos de 95°C por 10 s de desnaturalización, 52°C por 10 s de alineamiento, 68 °C por 40 s de extensión.

Usando los cebadores PNRSVF-C537/PNRSVR-H83 (Mac-Kenzie *et al.*, 1997), que amplifican una región muy conservada y ubicada en el ORF de la proteína de la cápside (CP) del PNRSV (Scott *et al.*, 1998; Untiveros *et al.*, 2010), suficiente para confirmar la presencia de este virus en las muestras analizadas. Se utilizaron las condiciones de 30 ciclos de 95°C por 10 s de desnaturalización, 52°C por 10 s de alineamiento y 68°C por 1 m de extensión.

Para una identificación más precisas del PNRSV se utilizarón tres cebadores en sentido positivo (s) VP968, VP969, VP970, con el cebador en antisentido (as) VP313, para amplificar el componente RNA3 completo de este virus (De La Torre *et al.*, 2014), los cuales amplifican la proteína del movimiento (MP) y la proteína de la cápside (CP), que nos sirvieron para

poder identificar hasta especie. Con las condiciones de 30 ciclos de 94°C por 15 s de desnaturalización, 50°C por 30 s de alineamiento y 68°C por 2.5 m de extensión.

Los productos de la RT-PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etido, calculando su peso molecular por comparación con el marcador de peso molecular 1 Kb PLUS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de electroforesis fueron de 100V durante 30 min.

Secuenciación directa, análisis y comparación nucleotídica

Los amplicones de interés de la RT-PCR se purificaron utilizando el kit Wizard® (PROMEGA, USA). Se determinó la secuencia directa de nucleótidos de los amplicones de interés en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO, FES-IZTACALA, UNAM.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas y comparadas con las secuencias nucleotídicas disponibles en la base de datos del GenBank disponible en NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Total).

Secuenciación masiva de RNA-seq de muestras de durazno

Debido a las evidencias de un posible complejo viral presente en las muestras analizadas con los primeros ensayos de diagnóstico (transmisión mecánica, microscopía electrónica, RT-PCRs, anteriores a este trabajo), se realizó la secuenciación masiva de RNA-Seq de muestras de durazno con el propósito de obtener genomas completos de todos los posibles virus presentes en durazno. Las muestras obtenidas mediante Trizol de hojas con daños se enviaron a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA-UNAM, (UUSMD) en el

Instituto de Biotecnología (IBT) UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos, donde se realizó la secuenciación masiva de ARN dirigido a ARNm (RNA-seq) por extremos pareados (*paired-end*), con un tamaño de biblioteca de 300 pb, y tamaño de lectura (*reads*) de 75 pb. La secuenciación masiva se realizó con la plataforma ILLUMINA Next-seq 500. Se evaluó la integridad y concentración del ARN total de la muestra mediante un microchip de 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA), el cual utiliza el algoritmo de RIN (RNA integrity number), que arroja un número entre 1 a 10, siendo el 10 un ARN íntegro y concentrado, en base a la presencia y concentración de bandas de ARN ribosomal correspondiente al 18S y 28S, que son separados por electroforesis (Schroeder *et al.*, 2006).

Se evaluó la calidad de los datos obtenidos (lecturas o *reads*) por medio del software FASTQC (Andrews, 2010). Las *reads* se analizaron por comparación con genomas completos (Mapeo) obtenidos del GenBank utilizando el software Geneious 7.1 (<http://www.Geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Por otra parte se realizó el ensamble de novo, con el software Trinity que hace uso de gráficas de Bruijn (Hass *et al.*, 2013) para el armado de *contigs* más grandes que fueron analizados mediante BLASCT y BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; 1997) para la búsqueda de otros virus. Se construyeron árboles filogenéticos por máxima verosimilitud, con en el gen de la CP,RdRp y de sus genomas completos, de los genomas virales obtenidos por RNA-Seq, y virus reportados en el GeneBank, ajustando el modelo por medio del software jModelTest 2.0 ver 0.1.1 (Darriba *et al.*, 2012), y PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel 2003) para generar los árboles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección por serología (DAS-ELISA)

Los resultados de DAS-ELISA para PDV, por observación visual directa de la intensidad en el cambio de color amarillo de los pocillos, comparándolos con los testigos positivos, fueron de menor intensidad y la absorbancia nos indicó que no había diferencias entre los controles positivos y negativos, con las muestras.

Los resultados de DAS-ELISA para PNRSV con las muestras de durazno, por observación visual directa de la intensidad en el cambio de color amarillo de los pocillos, comparándolos con los testigos positivos, fueron de menor intensidad para durazno y la absorbancia nos indicó valores cercanos a los positivos.

La detección del PNRSV en los árboles frutales es muy problemática, ya que la concentración del virus fluctúa entre las estaciones correlacionado con el estado fenológico de las plantas, dando como resultado que el virus se distribuye de manera desigual en el árbol (Abdel-Salam *et al.*, 2008; Matic *et al.*, 2008). Zotto *et al.*, 1999, indican que la diferencia entre plantas infectadas por el PNRSV y sanas de durazno, no es evidente al analizar la flor sola, material más preferido para diagnosticar el virus. Por lo tanto, las plantas deben ser analizadas durante la floración y brote o floración y latencia (yemas latentes).

Una baja concentración de la proteína viral o la presencia de metabolitos de la planta afectan la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA y el hecho de que existen 3 variantes del PNRSV y que probablemente alguno se encuentre en las hojas utilizadas, sean distintos a los antisueros comerciales usados (Hammond y Crosslin, 1998).

Extracción y análisis electroforético en geles de poliacrilamida (PAGE) de RNA de doble cadena.

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida del ARN-dc de origen viral obtenido de las muestras de durazno con daños de moteado amarillo, mostraron bandas de diferente peso molecular que indicaron la posible presencia de diferentes virus en las muestras, (Figura 5; Carriles 5-8 y Figura 6; carriles 4-5).

El análisis electroforético de ARN-cd permite detectar componentes de diferentes virus del tipo RNA, que son los más comunes de infectar plantas, con lo que es factible identificar un virus en particular o mezclas de diferentes virus, pero aún más importante es detectar patrones de bandas de posibles virus desconocidos (Valverde & De La Torre, 2017). En el caso de las muestras de diversas muestras de durazno analizadas por este método y recolectadas en las regiones productoras de la región centro de México, se han observado bandas típicas de PNRSV, pero también bandas adicionales desconocidas que indican la presencia de posibles virus desconocidos, que para identificar su posible origen viral se tendría que complementar con otras pruebas de diagnóstico.

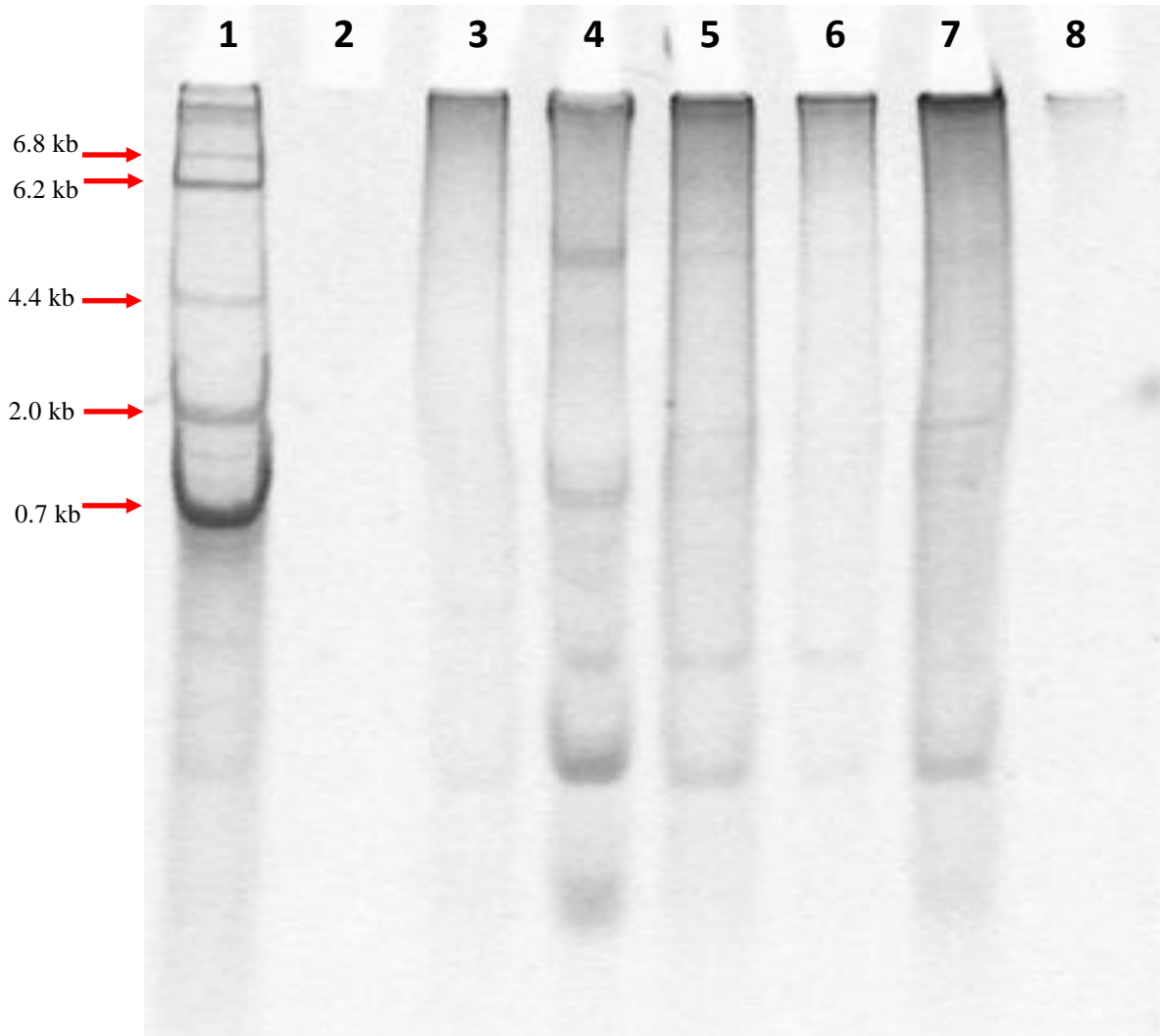


Figura 5. Análisis electroforético de muestras de durazno para detección de ARNdc en gel de poliacrilamida 6% teñido con Bromuro de Etidio (40 μ L de ARNdc; 10 μ L de amortiguador de carga; 100 V; 2:30 hrs). Carril 1: Patrón electroforético de ARNdc del CMV y su satélite (CARNA-5); Carril 3: ARNdc de muestras de Crisantemo; Carril 4: ARNdc de muestras de Rosa; Carril 5-8: ARNdc de muestras de Durazno, se observan bandas que podrían corresponder a un conjunto de virus.

El análisis electroforético de muestras de durazno para detección de ARNdc en gel de agarosa al 1.4%, dio mejores resultados en cuanto a la intensidad y calidad del ARNdc (Figura 6).

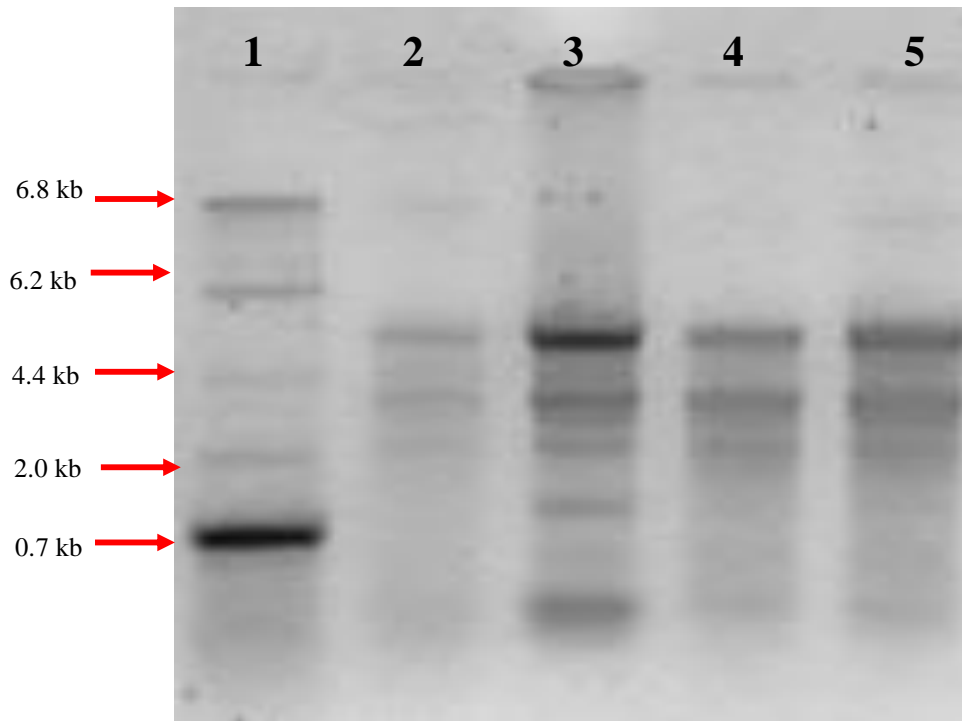


Figura 6. Análisis electroforético de muestras de durazno para detección de ARNdc en gel de agarosa al 1.4% teñido con Bromuro de Etidio (5 μ L de ARNdc; 5 μ L de amortiguador de carga; 100 V,30 min). Carril 1: Patrón electroforético de ARNdc del CMV y su satélite (CARNA-5); Carril 2: ARNdc de muestras de Crisantemo; Carril 3: ARNdc de muestras de Rosa; Carril 4-5: ARNdc de muestras de Durazno, se observan bandas que podrían corresponder a un conjunto de virus.

Determinación de la presencia de virus por Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se confirmó la presencia del PNRSV por RT-PCR en las muestras de durazno, obteniéndose amplicones del tamaño esperado, para los cebadores PNRSVF-C537/PNRSVR-H83, de 455 pb aproximadamente (Figura 7), los cuales nos indica la probable presencia de este virus en las muestras analizadas. Al igual se obtuvo el producto esperado de 1800 pb con la mezcla de los 3 cebadores en sentido positivo (s) VP968s, VP969s, VP970s y con el cebador en antisentido (as) VP313as (Figura 8), que amplifican el componente RNA 3 completo del PNRSV. Estos resultados coinciden con la detección del PNRSV por De La Torre *et al.*, 2014 y Montoya, 2008.

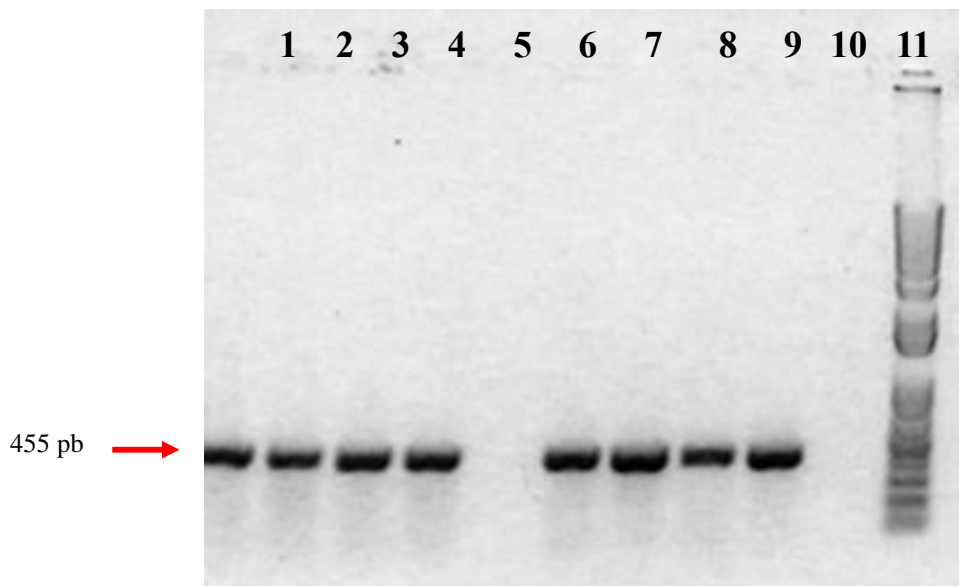


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (100 V, 30 min). Se utilizaron los cebadores PNRSVF-C537/PNRSVR-H83 para el gen de la CP del PNRSV obteniéndose un amplicón de 455 pb aproximadamente. Carril 1-4: muestras de durazno; Carril 6-9: muestra de Rosa; Carril 11: Marcador 1 Kb

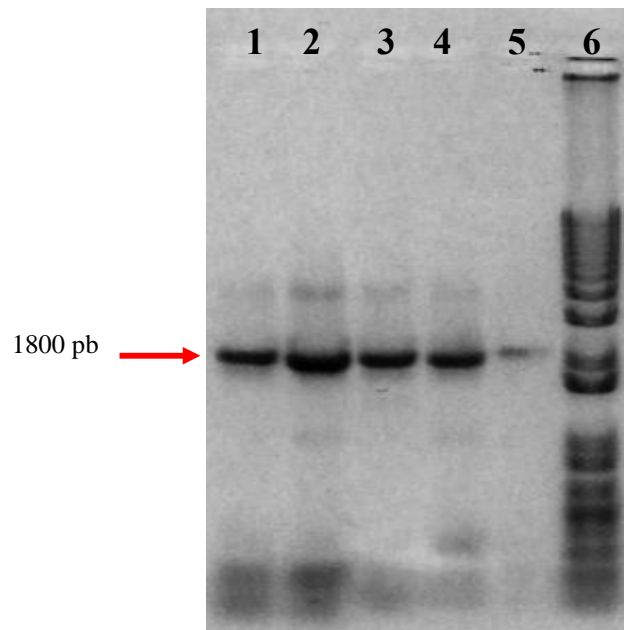


Figura 8 .Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (100 V, 30 min). Se utilizaron los cebadores que amplifican el componente RNA-3 completo del PNRV, obteniéndose un amplicón de 1800 pb aproximadamente: VP 968s, VP969s, VP 970s/VP 313as. . Carril 1-5: Muestra de durazno; Carril 6: Marcador 1 Kb.

Se detectó por RT-PCR la presencia del *Peach latent mosaic viroid* (PLMvd), utilizando los cebadores PLMvd 1179/ 1180 amplificando un fragmento de 350 pb aproximadamente (Figura 9).

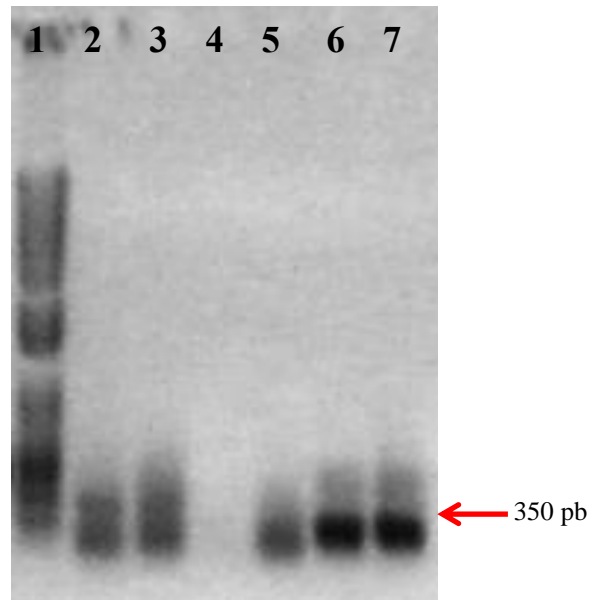


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (100 V, 30 min). Se utilizaron los cebadores PLMvd 1179/ 1180 para amplificar el PLMvd obteniéndose un amplicón de 350 pb aproximadamente. Carril 1: Marcador 1 Kb; Carril 2-5: muestras de durazno; Carril 6-7: muestra de Rosa

Para los virus PMVMex y TrichoMex, no hubo amplificación, muy probablemente no se encuentren presentes en los tejidos.

Secuenciación nucleotídica directa de productos de la RT-PCR de un fragmento del a proteína de la cápside de PNRSV.

Una secuencia parcial directa se obtuvo de los productos de la RT-PCR de PNRSV (Figura 10), detectado de muestras de durazno procedente de la localidad de Santiago Coltizingo, Puebla. La comparación de la secuencia que amplificaron la región de la CP, obtenida de los aislados de PNRSV de durazno, con las disponibles en el GenBank, confirmaron la identidad de este virus por mostrar una similitud del 99 % con aislados del mismo virus presentes en

otras regiones del mundo, mostrando quizá un origen común (De La Torre *et al.*, 2014; Sánchez y Pállas, 1997).

5´-
ATAGAACCCGAATAGGGTTTCGAATGTTGCAGGACCTGTGGTCCGACAGCAACCAGTCGTGAAG
ACTACGTGGACCGTGAGAGGTCCGAACGTGCCGCCAGAATTCCAAAAGGGTTTGTTCGCATA
GTCACCGGGAGGTGACGACTACAGAGGTAGTGAAGTATCTCAGCATCGACTTCACGACCACTTT
CCCTCAGTTGATGGGTCAAAATTTGACTCTATTAAGTGTCAACCGAATGAAGTCTATGAGCT
CGAATGGTTGGATTGGGATGGTGGAGGACTATAAGGTGGATCAACCTGATGGTCCGAATGCCCT
GTCTAGGAAGGGTTCTTGAAGGACCAACCGAGAGGTTGGCAATTTGAACCTCCTTCCGATTTA
GATTCGACACTTTTGC GCGTAATAGGAACCCGAATAGGGTTTTCGAGCGGTATAGGACCTGCGG
TCCGACCGCAACCGGTCGTGAAGACCACTTGGACCGTGAGGGTCCGAATGTGCCTCCCCGAAT
TCCTAAGGGTTATGTAGCACATAATCACCGAGAGGTGACGACGACAGAGGCAGTGAAGTACTTG
AGTATTGACTTCACGACCACTCTCCCTCAGTTGATGGGTGAGAATTTGACCTTATTAAGTGTGAT
AGTCCGAATGAAGTCTATGAGTTCGAATGGTTGGATTGGGATGGTGGAGGACTATAAGGTGGAT
CAACCTGATGGTCCGAATGCCCTGTCTAGGAAGGGTTCTTGAAGGACCAACCGAGAGGTTGGC
AGTTCGAACCTCCCTCCGATTTAGATTTTCGACACTTTTGC GCGTA-3´

Figura 10 . Secuencia parcial de 409 pb del producto de RT-PCR de la CP de PNRSV.

La detección del PNRSV en árboles frutales es problemática por que la distribución del virus en la planta fluctúa entre las estaciones (Scott *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 2008).

Secuenciación masiva de RNA-seq de muestra durazno.

Se obtuvieron 30 millones de secuencias y el análisis de “ novo“, referenciado con secuencias de virus de durazno reportados en el GenBank, permitió contruir aproximadamente 75000 secuencias, utilizando herramientas bioinformáticas. El análisis de secuenciación masiva de RNA-seq, permitió la identificación de 3 virus al obtener secuencias completas de sus genomas.

El ensamblado con Trinity de contigs y su análisis de mapeo con referencia con el software Geneious ver. 7.1, además de BLASTN y BLASTX (Cuadro 3), mostró la presencia de un virus (DurColtzingoMéxico1. No. Acceso DQ117579.1) con un genoma de 7986 pb de largo, relacionado con el Peach mosaic virus (**PcMV**. Trichovirus. Betaflexiviridae) con un porcentaje de identidad del 84% nt con el genoma completo de este virus; del 82% nt para la

RdRp (RNA dependent RNA polimerase); del 86% nt para la Proteína del Movimiento (MP) y del 89% nt para el gen de la CP. A nivel de aminoácidos 99 y 91 % aa para el gen de la CP y la RdRp, respectivamente

Otra secuencia indicó la presencia de un virus (DurColtzingoMéxico2. No. Acceso EF693898.1) con un genoma de 9004 pb de largo, relacionado con Peach chlorotic mottle virus (**PCMV**. Foveavirus. Betaflexiviridae) con un porcentaje de identidad del 85% nt para el genoma completo, con una identidad del 84 % nt para RdRp, del 85% nt para el TGB1 (*Triple Gene Block ORF1*), 91% nt para el TGB2, de 91 % nt para el TGB3 y para el gen de la CP de 86% nt. A nivel de aminoácidos 93 % aa para el gen de la CP y la RdR, para ambos casos.

Una tercera secuencia indicó la presencia de un virus (DurColtzingoMéxico3. No. Acceso KR820548.1) con un genoma de 8304 pb de largo y el análisis de BLAST lo relacionó principalmente con el *Cherry green ring mottle virus* (**CGRM**. Robigovirus. Betaflexiviridae), con un porcentaje de identidad de 77% nt con el genoma completo, con una identidad del 75% nt para RdRp; del 81% nt para el TGB1, 78% nt para TGB2 y 80% nt con TGB3, y del 78% nt para el gen de la CP. A nivel de aminoácidos 83% y 94 % aa para el gen de la CP y la RdRp, respectivamente.

Cuadro 3 .Genomas virales ensamblados de los datos de RNA-seq, con porcentajes de identidad a nivel de gen y el genoma completo, comparados mediante BLASTN y BLASTX con secuencias disponibles en el GenBank.

Virus	Tamaño del genoma (pb)	Genoma relacionado	Genoma completo	RdRp	CP	MP	NBP	TGB 1	TGB 2	TGB 3	
DurColtzingo México1 (No de Acceso KY774447)	7986	<u>PcMV</u> Trichovirus Fam. Betaflexiviridae	nt	84	82	89	86	86	-	-	-
			aa	91	91	99	87	85	-	-	-
DurColtzingo México2 (No de Acceso KY774446)	9004	<u>PCMV</u> Foveavirus Fam. Betaflexiviridae	nt	85	84	86	-	-	85	91	91
			aa	93	93	93	-	-	98	98	94
DurColtzingo México3 (No. De acceso KY774448)	8304	<u>CGRMV</u> Fam. Betaflexiviridae	nt	77	75	78	-	-	81	78	80
			aa	74	74	83	-	-	85	73	76

Las construcciones de dendogramas con las secuencias nucleotídicas de los virus obtenidos por RNA-seq y secuencias del GenBank, en primera instancia, utilizando el genoma completo, confirmó la identidad y la relación filogenética con otras secuencias reportadas para los mismos virus en el GenBank (Figura 11, 12 y 13). Utilizando el genoma completo de algunos de los géneros de la familia *Betaflexiviridae*, nos permitió relacionarlos con los géneros *Trichovirus*, *Foveavirus*, *Robigovirus* (Figura 14). Por otra parte utilizando la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la CP, siendo una region muy conservada en la mayoría de los virus, nos permitio identificar a las posibles especies (Figura 15). Utilizando la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la RdRp, la cual es una proteína esencial que se codifica en los genomas de todos los virus que contienen ARN, nos permitió identificar los distintas especies y sus generos (Figura 16).

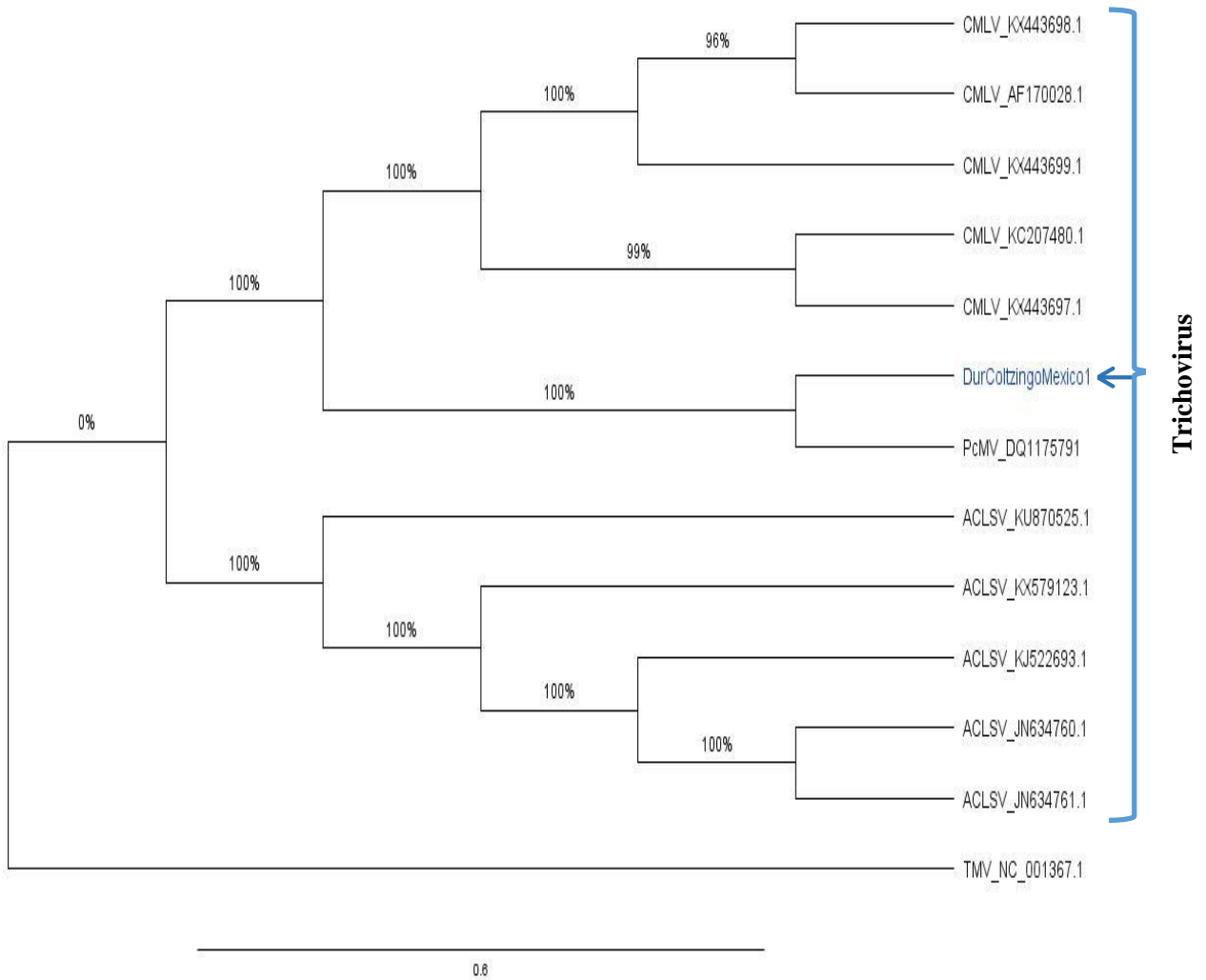


Figura 11. Dendrograma por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (100 réplicas) del genoma completo (GTR+G) de las secuencias obtenidos mediante BLAST que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMexico1 (señalado con flecha), la cual presenta una mayor relación con *Peach mosaic virus* (PcMV. Trichovirus. Betaflexiviridae).

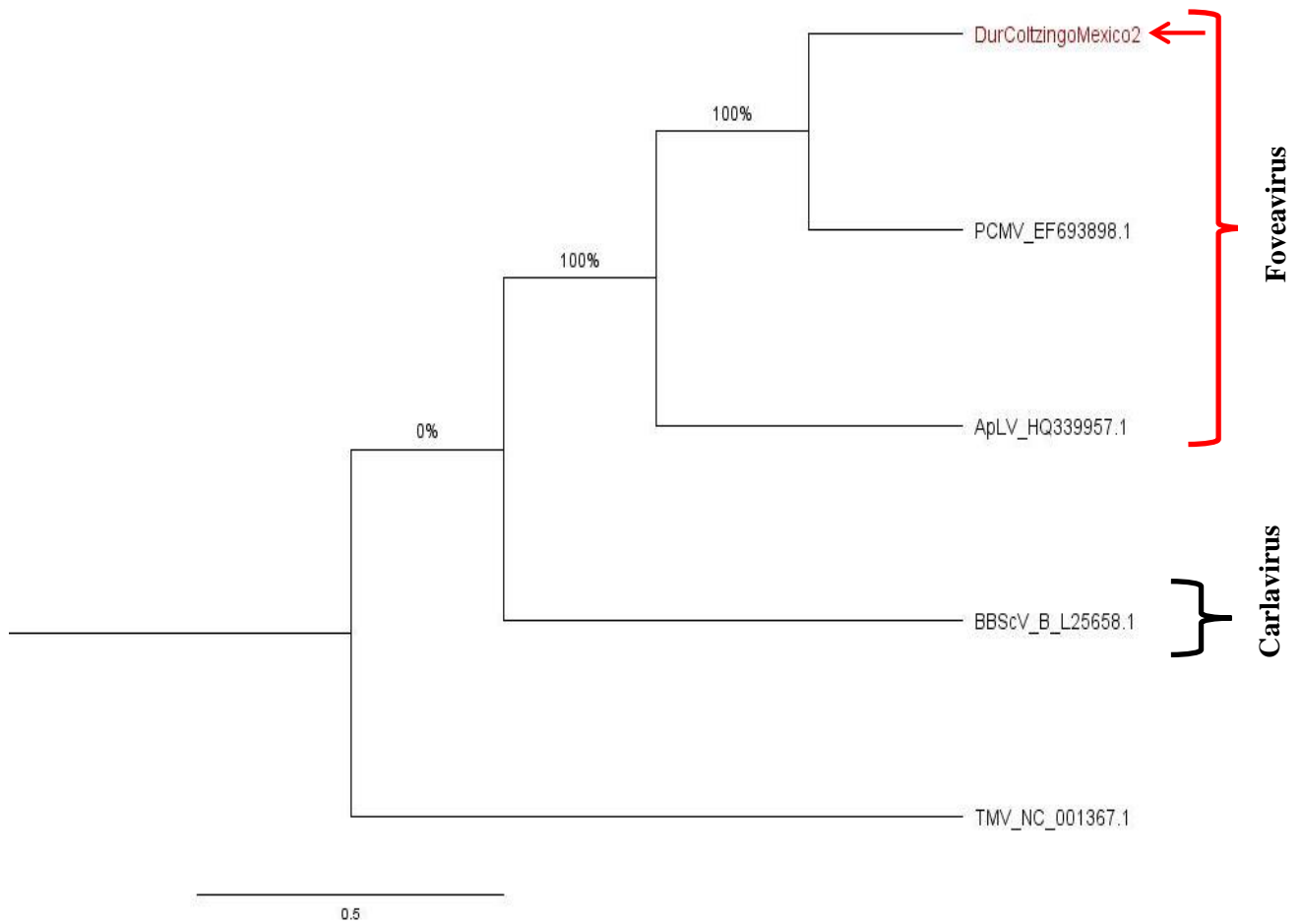


Figura 12 Dendrograma por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (100 réplicas) del genoma completo (GTR+G) de las secuencias obtenidos mediante BLAST, que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMéxico2 (señalado con flecha), la cual presento una mayor relación con *Peach chlorotic mottle virus* (PCMV. Foveavirus. Betaflexiviridae).

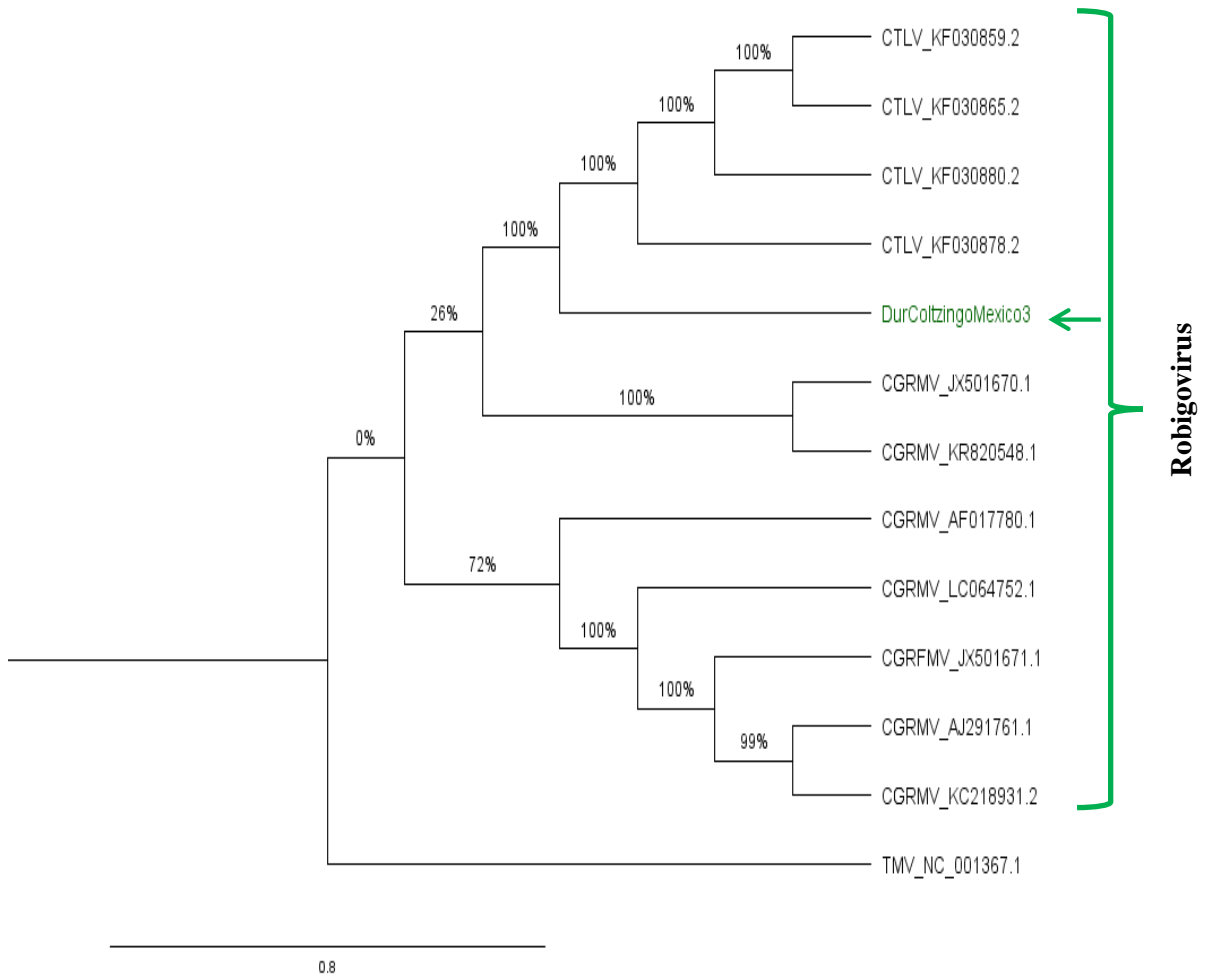


Figura 13 Dendrograma por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (100 réplicas) del genoma completo (GTR+G) con las secuencias obtenidas mediante BLAST, que presentaron mayor similitud con la secuencia del virus identificado en durazno: DurColtizingoMexico3 (señalado con flecha), la cual está más relacionada con los genomas de *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV.Robigovirus. Betaflexiviridae) y *Cherry Twisted Leaf Associated Virus* (CTLV. Robigovirus. Betaflexiviridae).

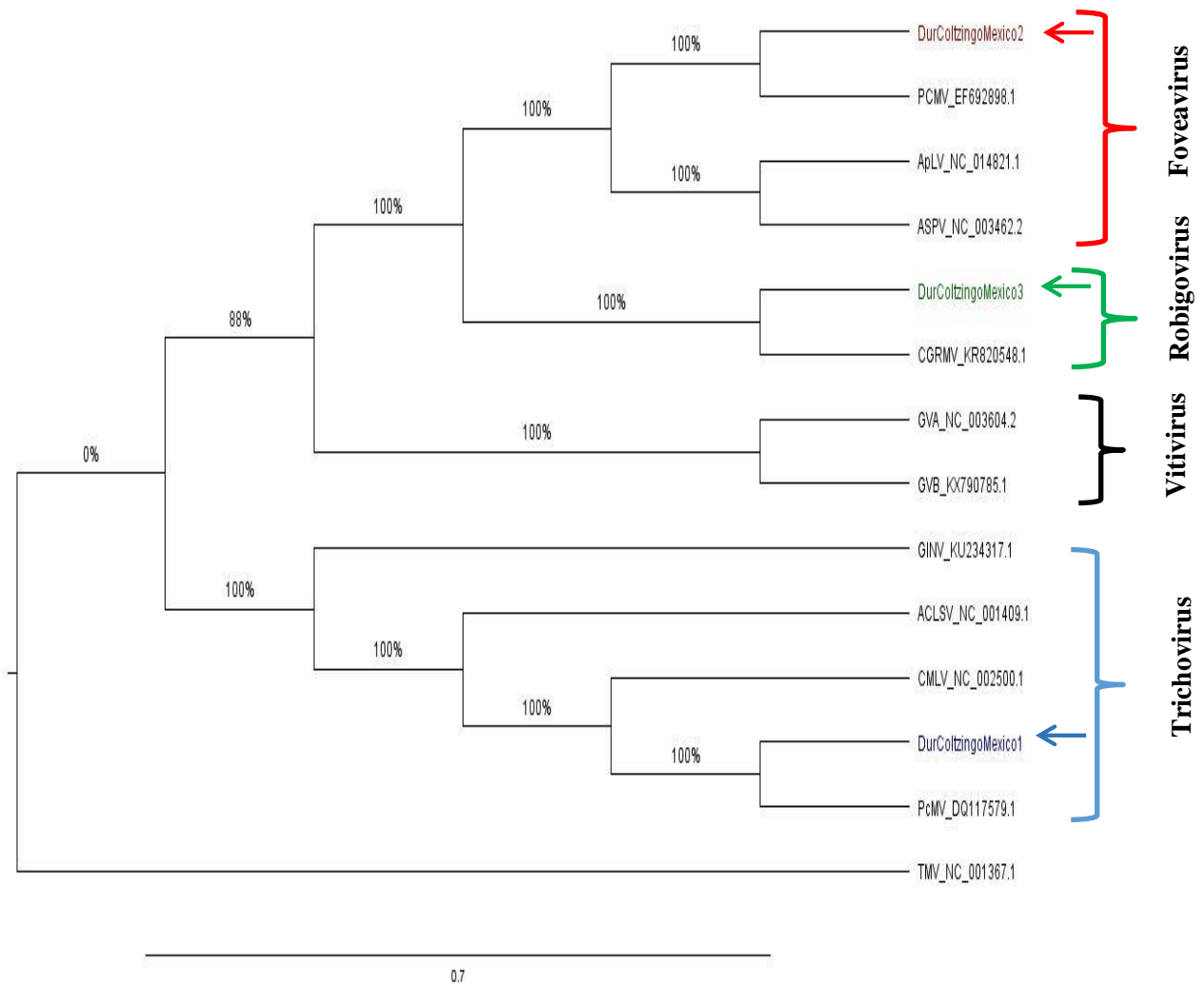


Figura 14 Dendrograma por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (100 réplicas) del genoma completo de algunos de los géneros de la familia Betaflexiviridae (GTR+G+I), se observa la separación de algunos de los géneros (Foveavirus, Trichovirus, Vitivirus,) de dicha familia. Además, de la cercanía de los genomas obtenidos de los virus de durazno, señalados con flechas: DurColtzingoMexico1, DurColtzingoMexico2 y DurColtzingoMexico3, con PcMV, PCMV y CGRMV, respectivamente.

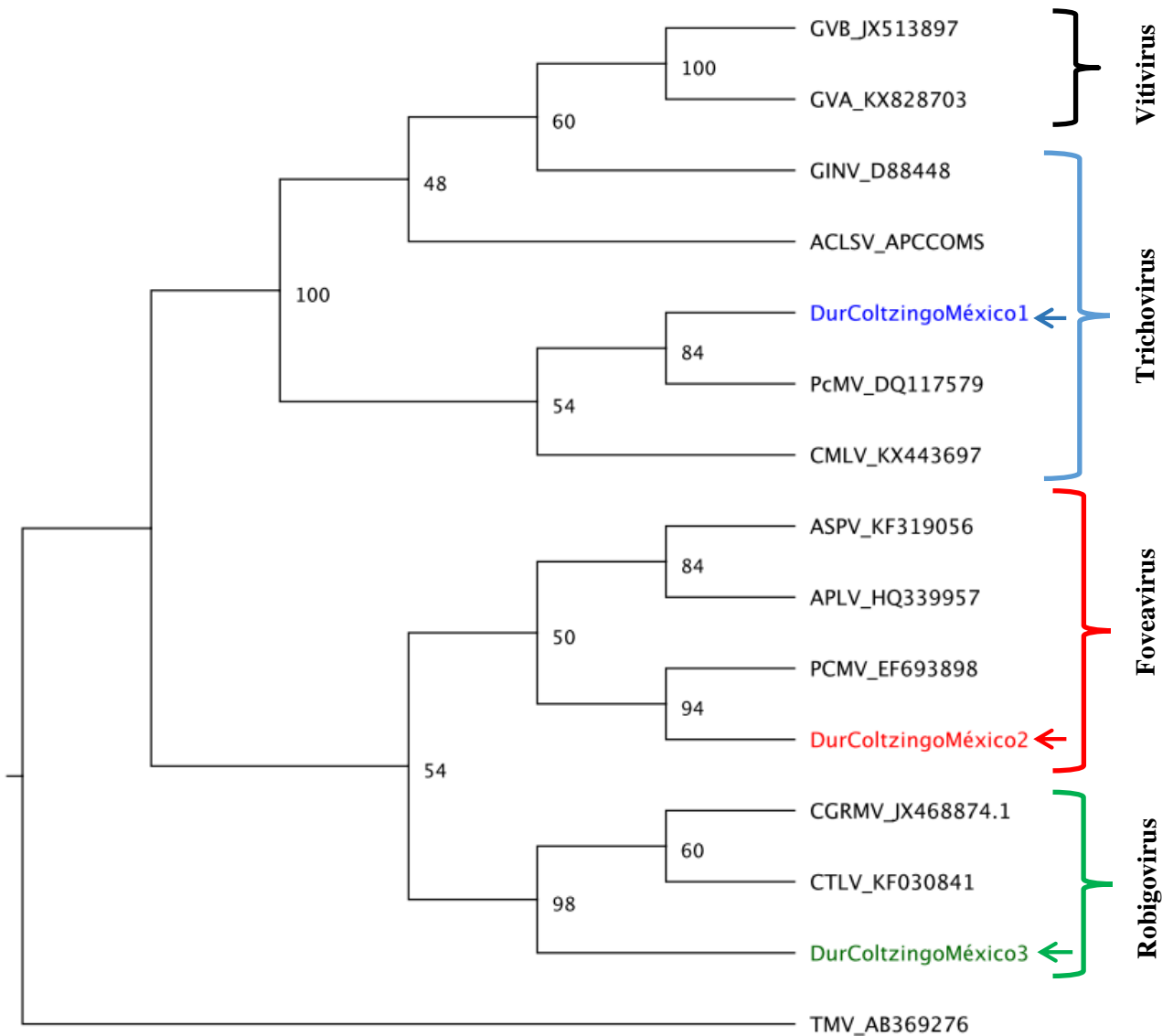
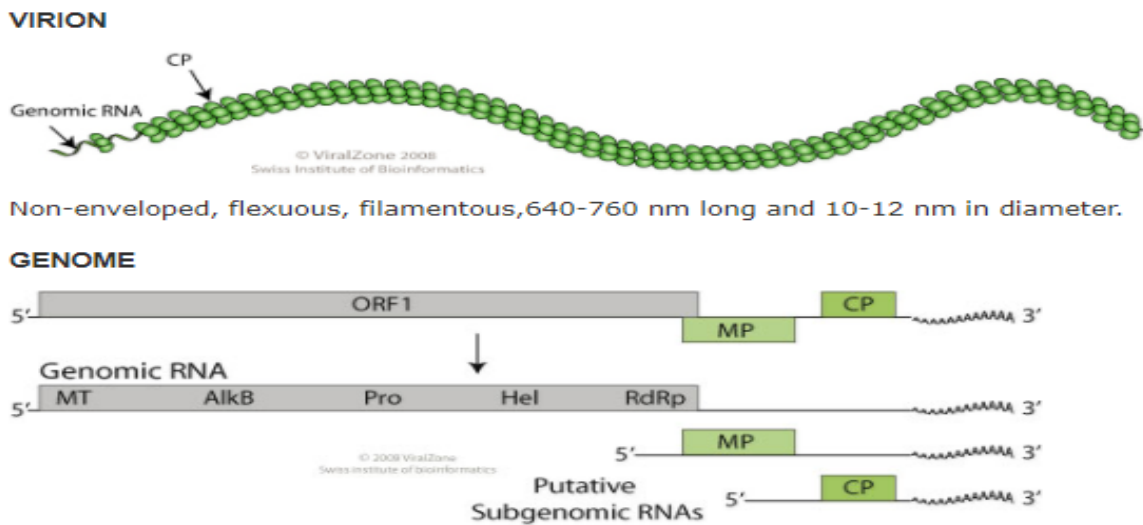


Figura 15 Dendrograma por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (100 réplicas), para el gen de la CP en la familia Betaflexiviridae (T92+G), se observa la separación de algunos de los géneros (Foveavirus, Trichovirus, Robigovirus y Vitivirus) de dicha familia. Además, de la cercanía del genoma de la CP obtenidos de los virus de durazno, señalados con flechas: DurColtzingoMexico1, DurColtzingoMexico2 y DurColtzingoMexico3, con PcMV, PCMV y CGRMV, respectivamente.

El genoma de DurColtzingoMexico1 tiene una organización de genoma similar al género Trichovirus (Figura 17), posee un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3' (RNAs +), consiste en 7986 nucleótidos. Por medio de los ensamblajes referenciados de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1, se identificaron 4 ORFs (Figura 18). El producto codificado por ORF1 es homologa con la proteína de la replicación (RdRp) la cual tiene una longitud de 5658 nt y un intervalo 151-5808 nt. La ORF2 codificante para la proteína implicada en el movimiento de célula a célula, constituido por la MP, está localizado después de la polimerasa, tiene una longitud de 1149 y un intervalo de 5840-6988 nt. El ORF 3 pertenece a la CP (putativo subgenómico), con un intervalo de 6708-7289 nt y una longitud de 582nt. ORF4 codifica una proteína de unión a ácido nucleico (NBp), con una longitud de 414 nt y un intervalo de 7435-7848 nt. El genoma del virus posee tiene un tramo poliadenilado en el extremo 3' de 11 nt con un intervalo de 7976-7986nt.

Trichovirus



Non-enveloped, flexuous, filamentous, 640-760 nm long and 10-12 nm in diameter.

Figura 17. Esquema de la composición genómica de los Trichovirus, se observan los distintos marcos de lectura que poseen el género, los componentes subgenómicos generados durante su replicación y traducción. (Tomado del ViralZone, Consultado el 5 de junio del 2017).

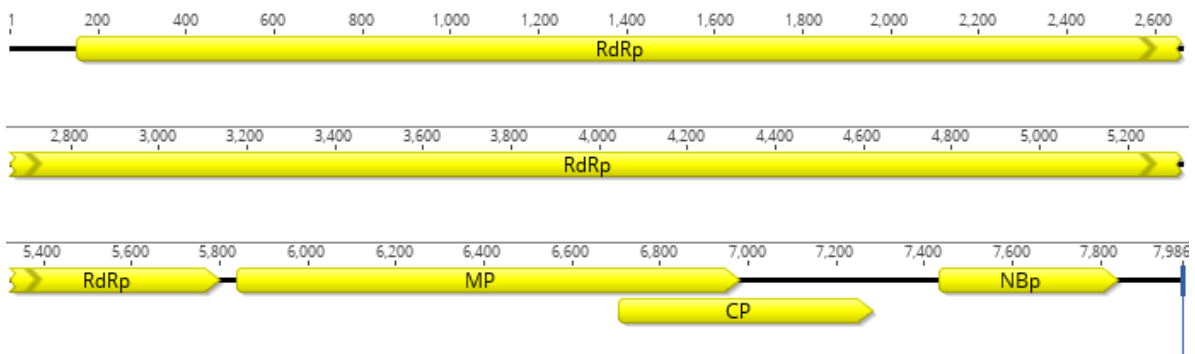


Figura 18. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico1, el cual presenta organización de genoma similar al género Trichovirus, se identificaron 4 ORFs, correspondientes a la RdRp, MP, CP y NBP (Obtenidos por los ensamblados de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1).

El genoma de DurColtzingoMexico2 posee un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3' (RNAs +), consiste en 9004 nucleótidos. Análisis filogenéticos y la comparación de secuencias justifica que probablemente se encuentra dentro del género Foveavirus (Figuro 19). Por medio de los ensamblajes referenciados de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1, se caracterizaron 5 ORFs (Figura 20), el producto codificado por ORF1, que sigue a una corta secuencia 5'-UTR con un intervalo de 1-54 nt y una longitud de 54 nt, es homóloga con la proteína de la replicación (RdRp) la cual tiene una longitud de 6387 nt y un intervalo 55-6441 nt. ORFs de menor tamaño codifican para las proteínas implicadas en el movimiento de célula a célula, constituido por “tripe gene block” (TGB). El ORF 2 corresponde al TGB1 el cual está localizado después de la polimerasa, tiene una longitud de 669 nt y un intervalo de 6481-7149 nt. El ORF 3 pertenece al TGB2 tiene una longitud 348 nt y un intervalo 7153-7500nt. EL ORF 4 pertenece al TGB 3 con una longitud 204 nt y un intervalo de 7421-7624 nt. El ORF 5 pertenece a la CP (putativo subgenómico) se encuentra localizado después del TGB, con un intervalo de 7738-8874 nt y una longitud de 1137 nt. El genoma del virus posee un extremo 3'-UTR el cual tiene un intervalo de 8875-8992 nt con una longitud de 118nt, y tiene un tramo poliadenilado en el extremo 3' de 12 nt con un intervalo de 8992-9004 nt.

Foveavirus

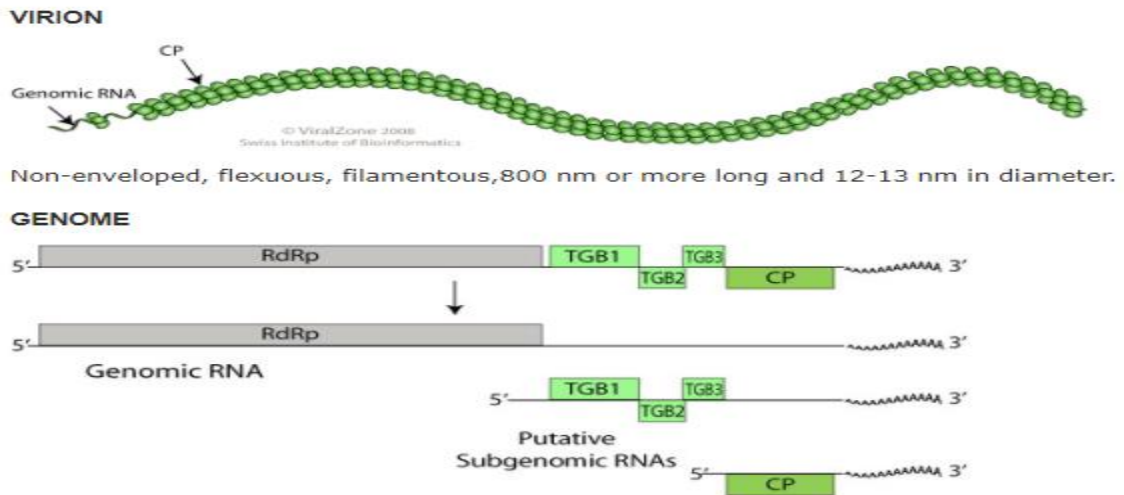


Figura 19. Esquema de la composición genómica de género Foveavirus, se observan los distintos marcos de lectura que poseen el género, los componentes subgenómicos generados durante su replicación y traducción. (Tomado del ViralZone, Consultado el 5 de junio del 2017).

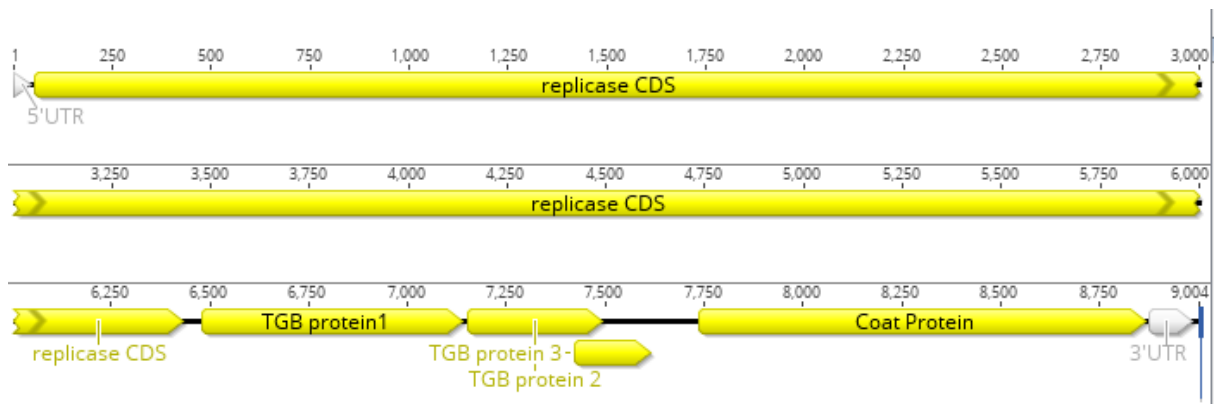


Figura 20. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico2, el cual presenta organización de genoma similar al género Foveavirus, se identificaron 5 ORFs correspondientes a la RdRp, TGB y CP (Obtenidos por los ensambles de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1).

El genoma de DurColtzingoMexico3 posee un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo de 5'- 3' (RNAs +), consiste en 8304 nucleótidos. Análisis filogenéticos y la comparación de secuencias justifica que probablemente se encuentra dentro del género Robigovirus (Figura 21). Por medio de los ensamblajes referenciados de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1, se caracterizaron 5 ORFs (Figura 22), el producto codificado por ORF1 es homologa con la proteína de la replicación (RdRp) la cual tiene una longitud de 5085 nt y un intervalo 92-5175nt. ORFs de menor tamaño codifican para las proteínas implicadas en el movimiento de célula a célula, constituido por “tripe gene block” (TGB). El ORF 2 corresponde al TGB1 el cual está localizado después de la polimerasa, tiene una longitud de 669 nt y un intervalo de 6128-6796 nt. El ORF 3 pertenece al TGB2 tiene una longitud 348 nt y un intervalo de 6797-7144 nt. EL ORF 4 pertenece al TGB 3 con una longitud 204 nt y un intervalo de 7074-7277 nt. El ORF 5 pertenece a la CP se encuentra localizado después del TGB, con un intervalo de 7324-8127 nt y una longitud de 804 nt. El genoma del virus probablemente posea un tramo poliadenilado en el nucleótido 9004.

Robigovirus

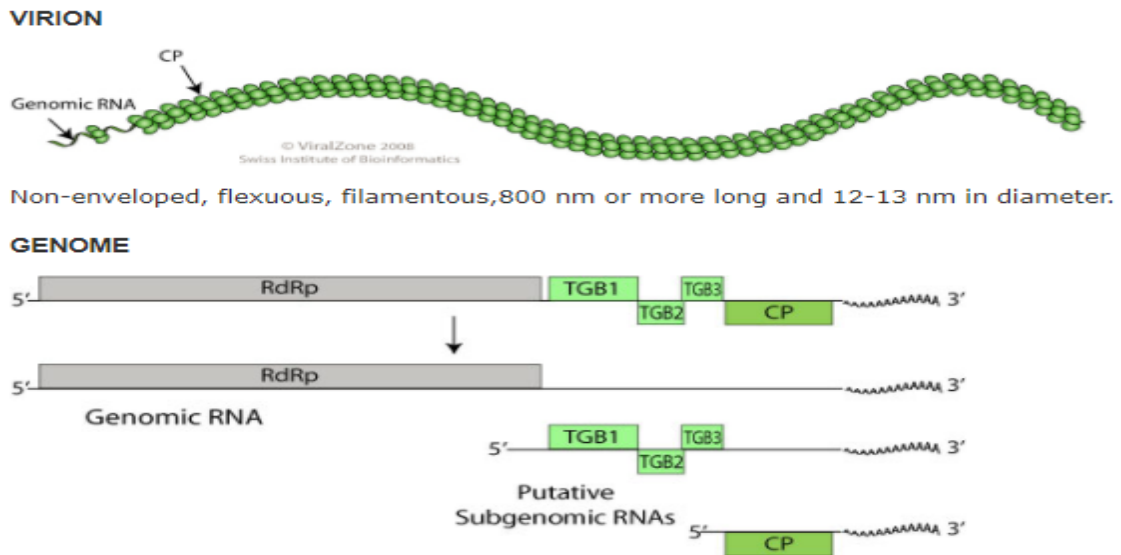


Figura 21. Esquema de la composición genómica de género Robigovirus, se observan los distintos marcos de lectura que poseen el género, los componentes subgenómicos generados durante su replicación y traducción. (Tomado del ViralZone, Consultado el 5 de junio del 2017).

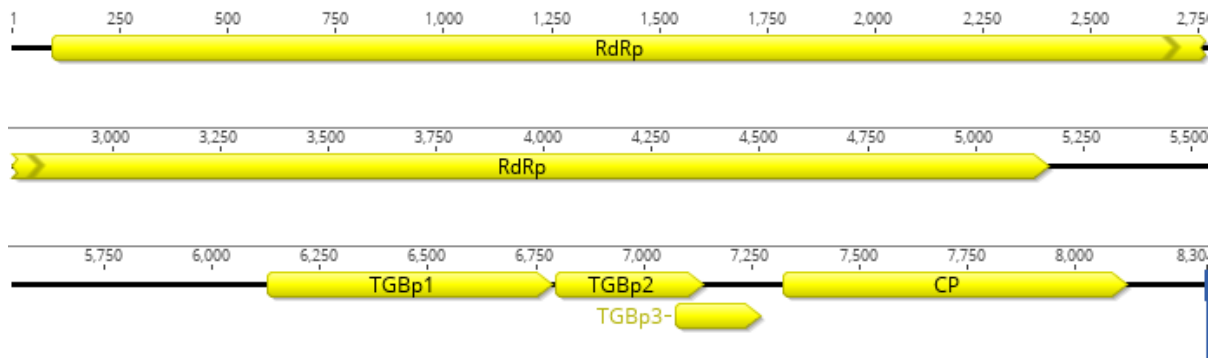


Figura 22. Esquema de la composición genómica del virus DurColtzingoMexico3, el cual presenta organización de genoma similar al género Robigovirus, se identificaron 5 ORFs correspondientes a la RdRp, TGB y CP (Obtenidos por los ensamblados de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1).

De acuerdo a los criterios de especies y demarcaciones dentro de la familia Betaflexiviridae, se espera que diferentes especies tengan menos de aproximadamente 72% de identidad de nucleótidos (o 80% de identidad de aminoácidos de proteínas codificadas) en los genes CP o replicasa. Los virus de diferentes géneros generalmente tienen menos de aproximadamente 45% de identidad de nucleótidos en estos genes (Adams et al., 2012),

Tomando en cuenta los análisis filogenéticos y la comparación de secuencias mediante BLAST con los genomas de los virus encontrados en durazno, podemos considerar que son variaciones dentro de los virus que presentan una identidad mayor. Dado que los virus no presentan un sistema de reparación de errores, en las enzimas de replicación de virus, esto provoca que sus tasas de mutación sean muy altas. Generalmente se acepta, que por cada genoma viral replicado, se produce una mutación, esto sumado a las grandes concentraciones de genomas virales replicados, da como resultado una amplia variabilidad de secuencias genómicas pertenecientes al mismo virus (Eigen, *et al.*, 1989).

Debido a que la RNA-seq posee una profundidad de amplificación y secuenciación mayor que los métodos estándar, nos permitió identificar los genomas completos de los virus presentes en durazno. La aplicación de la secuenciación masiva de RNA-seq, ha generado buenos resultados en otros trabajos, donde se han obtenido secuencias correspondientes a virus ya reportados anteriormente e incluso de nuevos virus no identificados obtenidos de cultivos de jitomate (Li *et al.*, 2013), camote (Kreuze *et al.*, 2009 y Kashif *et al.*, 2012), uva (Coetzee *et al.*, 2010). Estos estudios la secuenciación masiva se dirigió a RNA *small* (RNAs), la cual facilita la identificación de genomas virales, ya que aumenta la cobertura de los mapeos a referencias, o ensamblado de *novo* de *contigs*, debido al corto tamaño de los

reads (20-30 nt) (Pirovano *et al.*, 2014). En este trabajo se utilizó RNA-seq dirigida a ARNm, el cual arroja buenos resultados para la detección de genomas virales vegetales, como en el caso de la reciente identificación de 2 *Potexvirus*, 1 *Tobamovirus* y un probable nuevo *Carlavirus* (Salgado-Ortíz, 2016), utilizando esta secuenciación dirigida a ARN, de igual forma este tipo de secuenciación masiva nos proporciona datos del transcriptoma de la planta, lo cual permite realizar análisis de la respuesta del hospedero a la infección viral, y el silenciamiento provocado por el virus hacia el sistema de respuesta del hospedero (Nagano *et al.*, 2015), pero este método delimita la secuenciación a ARN a solo aquellas virus que poseen en su extremo 3' un segmento de Poli-A (Wang *et al.*, 2009).

Algunos de estos virus recién identificados se han detectado en cultivares de nopal verdura (Salgado-Ortíz, 2016). La principal dificultad de éstos estudios (como en todos los estudios de metagenómica) sigue siendo la necesidad de mejores herramientas bioinformáticas para descifrar los grandes conjuntos de datos (Soto y López, 2012).

Por otra parte los virus relacionados con el genoma de PcMV, PCMV y CGRMV encontrados mediante RNA-seq se tendrán que detectar directamente en las muestras, es decir diseñando cebadores que nos ayuden a detectarlos biológicamente y poder determinar si son cepas de estos virus o son nuevas especies. Esto permitirá realizar trabajos posteriores de diagnóstico de esos virus en otras plantas de durazno o incluso en otras especies de *Prunus sp.*, así como de la familia Rosaceae al cual pertenece el durazno y además de evaluar la separación de los virus en las plantas del ensayo de transmisión.

El PcMV ha sido reportado anteriormente en Chihuahua, México y en varios estados del centro de México (Oldfield *et al.*, 1995), así como en Estados Unidos, los síntomas de este virus incluye mosaico en hojas en el verano y a principios del verano, mosaico nervacional,

quebramiento de color y deformación de pétalos, hojas atrofiadas, deformación en frutos y enanismo en las ramas (Gispert *et al.*, 1998).

Por otra parte el Peach chlorotic mottle virus (PCMV), es miembro del género Foveavirus (Jame y Croft, 2007), y que afecta a Pera y Manzana ambos pertenecientes a la familia Rosaceae (Yoon *et al.*, 2014), al cual pertenece el durazno. James *et al.*, 1994, menciona que el material con el que se trabajó para detectar a PCMV se cree que provino de México. Los síntomas que produce son moteado y patrón de anillos clorótico.

Cherry green ring mottle virus (CGRMV) ha sido reportado en Japón, Nueva Zelanda, algunos países de África, Europa, Norte América, Chile y Sur América (Wang *et al.*, 2009; Fiore y Zamorano, 2015), afectando severamente *Prunus spp.*, pertenece al género Robigovirus. Los síntomas de este virus incluye amarillamiento de las hojas y moteado oscuro alrededor de las venas secundarias (Wang *et al.*, 2013).

En este trabajo, las muestras presentaron algunos de los síntomas anteriormente descritos, por lo que sugiere que el durazno es susceptible a varios virus y presenten una co-infección que pueda agravar los síntomas y por ende afectar el rendimiento de la planta.

CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de la mezcla viral por medio de RT-PCR y secuenciación masiva de RNA-Seq en las muestras de durazno de la región centro de México, con síntomas de anillos cloróticos, moteado amarillo y mosaico de color amarillo, la presencia de PNRSV, PLMvd por medio de ensayos de DAS-ELISA y RT-PCR.
- Se identificó y caracterizó molecularmente la presencia de 3 virus mediante RNA-Seq, relacionados con el genoma de *Peach mosaic virus* (PcMV), *Peach chlorotic mottle virus* (PCMV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), los dos últimos no han sido reportados en México.

PERSPECTIVAS

- ❖ Diseño y evaluación de cebadores específicos para la secuencias de los virus encontrados a partir del análisis de RNA-seq, con el fin de comprobar la presencia de dichos virus en las muestras colectadas.
- ❖ Se recomienda la caracterización biológica completa de los virus encontrados, mediante la secuenciación del genoma completo por medio de productos de RT-PCR clonados, y el armado posteriormente de una clona infectiva, para hacer ensayos de inoculación mecánica en rango de hospedantes, para determinar que tipos de síntomas son ocasionados por el o los posibles nuevos virus asociados.
- ❖ Secuencia masiva por RNAsmall, poder detectar otros virus que no presenten el extremo 3'-Poli A.

REFERENCIAS

- Abdel-Salam, A. M., Ibrahim, A. M., Abdelkader, H. S., Aly, A. M., & El-Saghir, S. M. (2008). Characterization of two isolates of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. *Arab J Biotechnol*, 11, 107-112.
- Adams, M. J., Candresse, T., Hammond, J., Kreuze, J. F., Martelli, G. P., Namba, S., Pearson, M. N., Ryu, K. H., Saldarelli, P., and Yoshikawa, N. (2012). Family Betaflexiviridae. Pages 920-941 in: *Virus Taxonomy – Ninth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses*. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E.J. Lefkowitz, eds. Elsevier Academic Press, London.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., & Lecoq, H. (2001). Principles of plant virology: genome, pathogenicity, virus ecology. Institut National de la Recherche Agronomique.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35(3), 235.

- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Cobián-Güemes, A.G. (2013). Metagenómica viral y bacteriana de enfermedades respiratorias graves. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Bioingeniería, UNAM, Cuernavaca. 199 p.
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157-163.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- Delano, J., & C. Upton. (1999). Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of Peach mosaic virus and Cherry mottle leaf virus. *J. Virol. Methods* 83: 103-111.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. y Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep version II. *Plant Molecular Biology reporter*. 1(4): 19-21
- De La Torre Almaraz, R., & Almaraz, R. D. L. T. (2012). Enfermedades de origen viral en plantas cultivadas en México (No. 632.32).
- De La Torre-Almaraz, R., Sánchez-Navarro, J., & Pallás, V. (2014). Detección del Prunus necrotic ringspot virus en durazno (*Prunus persica* (L.) en México y caracterización molecular de su componente ARN-3. *Agrociencia*, 48(6), 583-598.

- De La Torre-Almaráz, R., Pallás, V., & Sánchez-Navarro, J. A. (2015). First Report of Peach latent mosaic viroid in Peach Trees From Mexico. *Plant Disease*.
- Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P. (1989). The molecular quasi-species. *Advances in Chemical Physics*. 75: 149–263.
- Fiore, N., & Zamorano, A. (2015). First report of Cherry green ring mottle virus and Cherry necrotic rusty mottle virus in sweet cherry (*Prunus avium*) in Chile and South America. *European Journal of Plant Pathology*, 142(2), 403-409.
- Flores R. 2011. Descendiendo la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida: los viroides. *Virología*. 14:30-47.
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2008). Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. Trans. Silvina L. Giammaría.
- Gispert, C., Oldfield, G. N., Perring, T. M., & Creamer, R. (1998). Biology of the transmission of peach mosaic virus by *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae). *Plant disease*, 82(12), 1371-1374.
- Grasso, D. (2006). Metagenómica: un viaje a las estrellas. *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 189-189.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.
- Hammond, R. W., & Crosslin, J. M. (1998). Virulence and molecular polymorphism of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates. *Journal of General Virology*, 79(7), 1815-1823.

- Hull, R. 2014. Plant Virology. 5a Edition, Elsevier, Academic Press. Amsterdam. 1091 p.
- James, D., Thompson, D. A., & Godkin, S. E. (1994). Cross reactions of an antiserum to plum pox potyvirus1. EPPO Bulletin, 24(3), 605-614.
- Kashif, M., Pietilä, S., Artola, K., Jones, R. A. C., Tugume, A. K., Mäkinen, V., & Valkonen, J. P. T. (2012). Detection of viruses in sweetpotato from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs. Plant Disease, 96(10), 1430-1437.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28(12), 1647-1649.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. Virology, 388(1), 1-7.
- Li, R., Gao, S., Fei, Z., & Ling, K. S. (2013). Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico. Genome announcements, 1(5), e00794-13.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., & Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease, 81(2), 222-226.

- Martín, S. I. (2017). Departamento de Microbiología de la UGR. http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=493&Itemid=659
- Matic, S., Sánchez-Navarro, J. A., Mandic, B., Myrta, A., & Pallás, V. (2008). Tracking three ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology*, 137-141.
- Montoya-Piña, J.V. (2009). Caracterización biológica y molecular de un virus asociado a los síntomas de moteado Amarillo del durazno en Morelos y Puebla, México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. 54 p.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344-1349.
- Nagano, A. J., Honjo, M. N., Mihara, M., Sato, M., & Kudoh, H. (2015). Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq. *Plant Virology Protocols: New Approaches to Detect Viruses and Host Responses*, 89-98.
- Oldfield, G. N., Creamer, R., Gispert, C., Osorio, F., Rodriguez, R., & Perring, T. M. (1995). Incidence and distribution of peach mosaic and its vector, *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae) in Mexico. *Plant disease*, 79(2), 186-189.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Amari, K., Sanchez-Pina, M. A., Myrta, A., & Sanchez-Navarro, J. A. (2012). Iilarviruses of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees. *Phytopathology*, 102(12), 1108-1120.

- Pirovano, W., Miozzi, L., Boetzer, M., & Pantaleo, V. (2014). Bioinformatics approaches for viral metagenomics in plants using short RNAs: model case of study and application to a *Cicer arietinum* population. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Roossinck, M. J. (2012). Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annual review of genetics*, 46, 359-369.
- Rubio-Guerri, C., Vicente-Rubiano, M. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. 2012. Metagenómica, la técnica de “descubre” nuevos virus. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid.
- Salgado-Ortíz, H. (2016). Caracterización molecular de virus asociados a manchas anulares en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. 70 p.
- Sánchez-Navarro, J. A., & Pallaás, V. (1997). Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA 3. *Archives of virology*, 142(4), 749-763.
- Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Herranz, M. C., Minafra, A., Myrta, A., & Pallas, V. (2005). Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1), 77-84.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), 1.
- Scott, S. W., Barnett, O. W., & Burrows, P. M. (1989). Incidence of *Prunus* necrotic ringspot virus in selected peach orchards of South Carolina. *Plant disease*, 73(11), 913-916.

Scott, S. W., Zimmerman, M. T., Ge, X., & MacKenzie, D. J. (1998). The coat proteins and putative movement proteins of isolates of Prunus necrotic ringspot virus from different host species and geographic origins are extensively conserved. *European Journal of Plant Pathology*, 104(2), 155-161.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Plan rector del comité nacional sistema producto durazno. Disponible en : http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNISP_DURAZNO/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_DURAZNO_2012.pdf

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B105.aspx>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Acciones y Programas, Reportes. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2015. <https://www.gob.mx/senasica/prensa/mejoran-estatus-sanitario-productores-de-manzana-y-durazno-en-cinco-municipios-de-puebla-20581>.

Soto Sedano, J. C., & López Carrascal, C. E. (2014). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.

Stock, S., R., P. (2006). PCR en tiempo real. IBT-UNAM. 55 p.

- Untiveros, M., Perez-Egusquiza, Z., & Clover, G. (2010). PCR assays for the detection of members of the genus Ilarvirus and family Bromoviridae. *Journal of virological methods*, 165(1), 97-104.
- Uyemoto, J. K., & Scott, S. W. (1992). Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant disease*, 76(1), 5-11.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., & JORDAN, R. L. (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74(3), 255-258.
- Valverde, R. A., & De La Torre-Almaraz, R. (2017). Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(1)
- Van Regenmortel, M. H. V. (2007). Virus species and virus identification: past and current controversies. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), 133-144.
- Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63.
- Wang, L. P., Hong, N., Wang, G. P., Michelutti, R., & Zhang, B. L. (2009). First report of Cherry green ring mottle virus in plum (*Prunus domestica*) in North America. *Plant Disease*, 93(10), 1073-1073.
- Wang, L., Jiang, D., Niu, F., Lu, M., Wang, H., & Li, S. (2013). Complete nucleotide sequences of two isolates of cherry green ring mottle virus from peach (*Prunus persica*) in China. *Archives of virology*, 158(3), 707-710.

Velásquez Valle, R. (2012). Presencia de virus en durazno, ciruelo y chabacano de los estados de zacatecas y querétaro, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 11(2).

ViralZone. (2017). Disponible en : <http://viralzone.expasy.org/254>

Yoon, J. Y., Joa, J. H., Choi, K. S., Do, K. S., Lim, H. C., & Chung, B. M. (2014). Genetic diversity of a natural population of Apple stem pitting virus isolated from apple in Korea. *Plant Pathol J*, 30, 195-199.

Zotto, A. D., Nome, S. F., Di Rienzo, J. A., & Docampo, D. M. (1999). Fluctuations of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. *Plant disease*, 83(11), 1055-1057.