



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR
DE UN VIRUS ASOCIADO A LOS SÍNTOMAS
DE MOTEADO AMARILLO DEL DURAZNO
EN MORELOS Y PUEBLA, MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(E X P E R I M E N T A L)**

P R E S E N T A

BIOL. JUANA VERÓNICA MONTOYA PIÑA
DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
MÉXICO, D. F. FEBRERO, 2009



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

- ✎ A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR PERMITIRME SER PARTE DE ESTA GRAN INSTITUCIÓN, ES UN ORGULLO Y UN HONOR SER PUMA!!

- ✎ AL CONACYT Y AL COMECYT POR EL APOYO OTORGADO DE LA BECA DE TESIS PARA POSGRADO Y LA BECA DE TERMINO DE TESIS, RESPECTIVAMENTE.

- ✎ AL DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ POR SUS CONOCIMIENTOS Y TIEMPO DEDICADO A LA DIRECCIÓN DE ESTA TESIS, LA CONFIANZA QUE ME BRINDO PARA REALIZAR ESTE PROYECTO Y POR PERMITIRME FORMAR PARTE DE SU EQUIPO.

- ✎ AL DR. RAFAEL LIRA SAADE POR SU APOYO BRINDADO DESDE EL PRINCIPIO, POR SU TIEMPO Y VALIOSOS COMENTARIOS SIEMPRE PARA MEJORA DEL TRABAJO.

- ✎ AL DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO POR SU COLABORACIÓN Y SUGERENCIAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

- ✎ AL DR. JORGE E. CAMPOS Y DR. ALBERTO K. OYAMA POR EL APOYO, ASESORAMIENTO Y TIEMPO DEDICADO A ESTA TESIS.

- ✎ AL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N., A LA DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES.

- ✎ AL APOYO BRINDADO POR EL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, A LOS DRs. VICENTE PALLÁS BENET, JESÚS SÁNCHEZ NAVARRO, AÍNHOA GENOVÉS, LORENA LATORRE Y LORENA CORACHÁN.

- ✎ AL M. EN C. ALEJANDRO MONSALVO REYES QUE ES UN COMPAÑERO DE TRABAJO Y TAMBIÉN UN BUEN AMIGO.

DEDICATORIAS

- ❖ A MIS PAPAS RAMÓN Y LUPE, CON MUCHO CARIÑO PORQUE SIEMPRE HAN ESTADO CONMIGO, EN LOS MEJORES MOMENTOS DE MI VIDA, IMPULSÁNDOME A SEGUIR SIEMPRE ADELANTE. LOS AMO.
- ❖ A MIS NIÑOS HERMOSOS HUGUITO Y EMI QUE CON SUS SONRISAS ME ENSEÑAN QUE LA VIDA PUEDE SER TAN HERMOSA COMO ALCANZAR LA LUNA. SON MI VIDA, MI MOTOR Y MI ENERGÍA PARA SEGUIR ADELANTE Y TAMBIÉN A ESE HERMOSO BEBE QUE ESTA POR LLEGAR!!
- ❖ A MIS HERMANOS NANY, MARY, MONCHO Y MIS CUÑADOS HUGO Y CESAR POR SU AMOR, APOYO, COMPAÑÍA Y POR TENER QUE SOPORTAR MIS OCURRENCIAS Y LOCURAS.
- ❖ A JAVIER, GINA, ADRIANA, ISA, NAZA, ZINA Y LILIA POR HACER DE ESTE TIEMPO UNA EXPERIENCIA INOLVIDABLE. POR TODOS ESOS BUENOS MOMENTOS DE LOCURA, ENREDOS, DIVERSIÓN Y MÁS, VERDAD!!
- ❖ A MARTHA, LORE, MONI, LILI, RAÚL Y ARTURO QUE CONFORME PASA EL TIEMPO NOS ES MÁS DIFÍCIL PODERNOS REUNIR, PERO SABEMOS QUE EL ESFUERZO SERÁ RECOMPENSADO POR EL CORAZÓN QUE SIEMPRE ESTÁ DISPUESTO A TODO POR ESTA AMISTAD.
- ❖ A MIS ABUELITOS, TIOS Y PRIMOS QUE SIEMPRE ME APOYARON.

EL AMOR ES LA LOCURA MÁS LUCIDA QUE TIENE EL HOMBRE...




Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de noviembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MONTOYA PIÑA JUANA VERONICA** con número de cuenta **91413132** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE UN VIRUS ASOCIADO A LOS SÍNTOMAS DE MOTEADO AMARILLO DEL DURAZNO EN MORELOS Y PUEBLA, MÉXICO."**, realizada bajo la dirección del **DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ**:

Presidente: DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO
Vocal: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Secretario: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
Suplente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Suplente: DR. RAFAEL LIRA SAADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de febrero de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Resumen	9
1. Introducción	12
2. Antecedentes	15
3. Hipótesis	23
4. Objetivo general	24
5. Metodología	25
Recolección de muestras	25
Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes indicadoras	25
Detección por serología (DAS-ELISA)	26
Análisis de RNA de doble cadena (RNA-dc)	26
Hibridación molecular no radiactiva	27
Detección de virus por transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	27
Clonación y secuenciación	30
6. Resultados y Discusión	31
Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes indicadoras	31
Detección por serología (DAS-ELISA)	32
Análisis de RNA de doble cadena (RNA-dc)	33
Hibridación molecular no radiactiva	34
Detección de virus por transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	35
Clonación y secuenciación	40
7. Conclusiones	47
8. Referencias	48
9. Anexo I	53

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Virus y viroides que infectan al durazno (<i>Prunus persica</i>).	19
2	Oligonucleótidos utilizados para detectar virus en durazno.	28
3	Oligonucleótidos utilizados para detectar el RNA3 de PNRSV.	29

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Síntomas de origen fungoso en durazno.	12
2	Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno.	13
3	Electroforesis en gel de poliacrilamida de RNA-dc de plantas de durazno con síntomas de moteado amarillo.	33
4	Análisis Dot-blot de plantas de durazno infectadas con virus y viroides.	34
5	Electroforesis en gel de agarosa del PNRSV en muestras de Morelos.	35
6	Electroforesis en gel de agarosa del PNRSV en muestras de Puebla.	36
7	Electroforesis en gel de agarosa obtenido de diferentes tejidos de la planta de durazno.	37
8	Diagrama de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el RNA3 de PNRSV. Electroforesis en gel de agarosa del componente RNA3 de PNRSV.	38
9	Electroforesis en gel de agarosa del PLMVd	39
10	Electroforesis en gel de agarosa del TRSV.	39
11	Secuencia nucleotídica parcial del gen de la proteína de la cápside del PNRSV.	40
12	Secuencia nucleotídica del componente RNA3 del PNRSV.	41
13	Dendograma basado en la comparación de secuencias nucleotídicas del componente RNA3 del PNRSV.	43
14	Estructura genómica del PNRSV.	44

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
°C	Grados centígrados
AÁ	Amino ácido
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
APLPV	<i>American plum line pattern virus</i>
ApLV	<i>Apricot latent virus</i>
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i>
CMLV	<i>Cherry mottle leaf virus</i>
CP	Proteína de la cápside
DAS-ELISA	Análisis inmunoenzimático de doble sándwich
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dot-blot	Hibridación en punto
Ha	Hectárea
HSVd	<i>Hot stunt viroid</i>
HR	Humedad relativa
Hrs	Horas
Kb	Kilo bases
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MP	Proteína del movimiento
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanómetros
Nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto
P1	Proteína de la replicasa 1
P2	Proteína de la replicasa 2
Pb	Pares de bases
PBNSV	<i>Plum bark necrosis stem virus</i>

PDV	<i>Prunus dwarf virus</i>
PDA	Papa dextrosa agar
PLMVd	<i>Peach latent mosaic viroid</i>
PM	Peso molecular
PMV	<i>Prunus mosaic virus</i>
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-dc	Ácido ribonucleico de doble cadena
RT-PCR	Transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
Ton	Tonelada
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
UTR	Sitio de una secuencia de nucleótidos sin traducción
V	Volts
μL	Micro litros

RESUMEN

El durazno (*Prunus persica* (L. Batsch)) es uno de los frutales más importantes de las regiones templadas de México. Durante recorridos en huertas comerciales de durazno realizados en Morelos y Puebla, México en 2005, muchos árboles fueron observados con síntomas foliares que incluyen moteado amarillo, manchas anilladas, patrones lineales y mosaico. Muestras de flores, ramas y hojas fueron colectadas de árboles sintomáticos en diferentes localidades de Morelos y Puebla. Todas las muestras fueron examinadas por DAS-ELISA para los siguientes virus: *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prune dwarf virus* (PPV), *Plum pox virus* (PDV) y *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). Los extractos de savia de hojas jóvenes sintomáticas y corteza fueron usados para inocular mecánicamente *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *Datura stramonium*, *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum*. Los extractos de savia fueron también usados para extracción y análisis de RNA-dc y extracción de RNA para el uso en la transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) fue el único virus detectado por DAS-ELISA en flores y corteza de ramas jóvenes que vienen de muestras con síntomas de moteado amarillo. El extracto inoculado causó síntomas de mosaico en *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* y lesiones necróticas en *Gomphrena globosa*. Todos estos hospedantes fueron positivos para PNRSV por DAS-ELISA. Los patrones electroforéticos de RNA-dc obtenidos de muestras de árboles con síntomas mostraron tres bandas de aproximadamente 3.6, 2.5 y 1.8 Kb de peso. La presencia de PNRSV fue confirmada en todas las muestras de campo por la RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de la proteína de la cápside y para el componente RNA3 del PNRSV. Los productos de RT-PCR de 455 y 1950 pb fueron clonados y secuenciados. Las secuencias de los aislados fueron alineadas y comparadas en la base de datos del GenBank, mostrando una similitud del 98% con otros aislados de PNRSV tanto de la proteína del movimiento

como la proteína de la cápside, confirmando la presencia, identidad y relación del PNRSV con los síntomas de moteado amarillo en el durazno cultivado en Morelos y Puebla, México.

Palabras claves: PNRSV, moteado amarillo, Ilarvirus.

ABSTRACT

Peach (*Prunus persica* (L. Batsch) is one of the most important fruit crops in the temperate regions of Mexico. During a survey of commercial peach orchards realised in Morelos and Puebla, Mexico in 2005, many trees were observed with foliar symptoms that included yellow mottle, ringspot, linear patterns and mosaic. Samples of flowers, branches and leaves were collected from symptomatic trees in different localities the Morelos and Puebla. All samples were tested by DAS-ELISA for the presence of the following virus: ApMV, PPV, PDV and PNRSV. Sap extracts from young symptomatic leaves and shoots were used to mechanically inoculate *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, *N. glutinosa*, *N. levelandii*, *N. benthamiana*, *Datura stramonium*, *Capsicum annuum* and *Solanum lycopersicum*. Sap extracts were also used for dsRNA extraction and analyses, and RNA extraction for use in reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR). *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) was the only virus detected by DAS-ELISA in flowers and crust of young branches coming from the samples with symptoms of yellow mottle. The extract inoculated it caused mosaic symptoms in *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* and necrotic local lesions in *Gomphrena globosa*. All these hosts were positive for PNRSV by DAS-ELISA. The electrophoretic pattern of RNA-dc of samples of trees with symptoms showed three bands of approximately 3.6, 2.5 and 1.8 Kb of MW. The PNRSV presence was confirmed in all the samples of field by the RT-PCR using specific primers for the coat protein gene and for the RNA3 component of the PNRSV. The products of the RT-PCR of 455 and 1950 bp were cloned and sequenced. The sequences of the isolated of the PNRSV were aligned and compared to the NCBI/GenBank database, showing 98% similarity to other isolated of PNRSV mainly with the movement protein and the coat protein, confirming the presence, identity and relation of PNRSV with the symptoms of yellow mottle in the peach tree cultivated in Morelos and Puebla.

Key words: PNRSV, yellow mottle, llarvirus.

INTRODUCCIÓN

ESTADO ACTUAL DEL DURAZNO EN MÉXICO

El durazno (*Prunus persica* (L. Batsch) se cultiva en 23 estados de la República Mexicana en una superficie total plantada de 45,000 ha, destacando por su volumen de producción los estados de Zacatecas, Michoacán, México, Chihuahua, Morelos y Puebla. Los estados de Morelos y Puebla se destacan también por calidad de producción y superficie sembrada, en ellos se cultivan aproximadamente 4,500 ha y la producción estimada es de 35,000 ton de durazno por año (SAGARPA, 2008), pero diversas enfermedades afectan el rendimiento y la vida media de este frutal destacando la cenicilla (*Podosphaera leucotricha* (Ellis. & Everh.) E. S. Salmon), cáncer o muerte descendente de ramas (*Cytospora leucostoma* Sacc.) (Figura 1A), pudrición morena de fruto (*Molinia fructicola* (G. Wint.) Honey), roya (*Tranzschelia discolor* (Funkel) Tranzschel & Litv. f. sp. *persica*) (Figura 1B), verrucosis (*Taphrina deformans* (Berk.) Tul.) (Figura 1C), tiro de munición (*Coryneum beijerinckii* (Oud.)) todas éstas de origen fungoso y también nemátodos del género *Meloidogyne* (De la Torre, 1992).

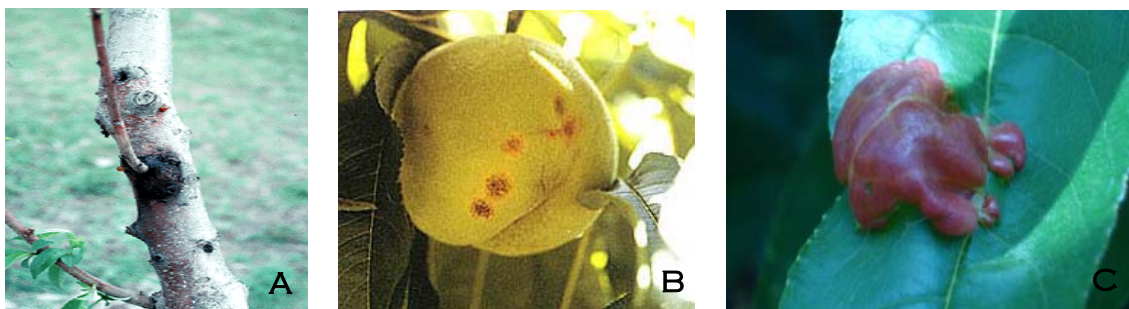


Figura 1. Síntomas de origen fungoso en durazno. A) cáncer o muerte descendente. B) roya. C) verrucosis.

Sin embargo, en recorridos de campo realizados en el año 2005 en zonas productoras de Morelos y Puebla, se observó la presencia de una enfermedad foliar que al parecer, disminuye la calidad de la fruta y la vida útil de los árboles.

La enfermedad se caracteriza por la presencia de pequeñas manchas redondas o moteados de color amarillo brillante en las hojas jóvenes (Figura 2A), los moteados al crecer forman anillos irregulares y patrones lineales (Figura 2B). Los tejidos dañados se desprenden dejando perforaciones irregulares con márgenes necróticos (Figura 2C); en los frutos pueden presentarse eventualmente moteados tenues o manchas anilladas de forma irregular. Con fines de descripción y por la sintomatología observada, a esta enfermedad la denominamos como "moteado amarillo del durazno".



Figura 2. Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno. A) manchas redondas o moteado amarillo y B) anillos irregulares y patrones lineales. C) perforaciones irregulares con márgenes necróticos.

Aunque no se tiene registro del efecto que causa esta enfermedad en el durazno, regionalmente se reconoce que causan la reducción del tamaño, la maduración y la vida productiva del durazno en la región.

Con el objeto de determinar el agente o los agentes causales de esta enfermedad se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la UBIPRO, FES-Iztacala, análisis fitopatológicos (anexo 1) de material enfermo con los síntomas antes descritos de algunas localidades del estado de Morelos y Puebla, que incluyeron la observación y descripción directa de los síntomas, así como la observación del material dañado bajo el microscopio estereoscópico, en busca de microorganismos fitopatógenos. También se realizó la transferencia de pequeños segmentos (2 mm) de ramas, hojas, flores, tallos y raíces de plantas de durazno en diferentes medios de cultivo artificiales estériles, con el objeto de aislar posibles patógenos. Los resultados de estos análisis mostraron que estos daños no eran causados por bacterias, hongos, nematodos o patógenos similares como los identificados en este frutal en otras partes del mundo (Aparicio *et al.*, 1999), por lo que se sospechó que estos síntomas pudieran ser causados por virus, fitoplasmas o viroides desconocidos, de los cuales se ignoran sus características biológicas, las condiciones que favorecen su diseminación y la distribución en las zonas productoras de durazno.

La información bibliográfica revisada indicó que síntomas similares a los de moteado amarillo del durazno se han asociado a infecciones por los virus de la mancha anular necrótica del durazno (*Prunus necrotic ringspot virus*. PNRSV), virus enano de la ciruela (Prune dwarf virus. PDV) o el virus mosaico del durazno (Peach mosaic virus. PMV) lo que relaciona entonces a éstos síntomas con la posible presencia de virus, por lo que se sospechó que pudieran ser causados por alguna clase de patógenos como virus, fitoplasmas (Blomquist y Kirkpatrick, 2002), viroides (Hadidi *et al.*, 1997) o una mezcla de éstos.

La misma información disponible mostró que en México no existen reportes científicos que indiquen la presencia e identidad de virus, viroides o fitoplasmas en durazno, lo que planteo la necesidad de realizar un diagnóstico que permitió la identificación de los posibles virus, fitoplasmas o viroides que están infectando al durazno en nuestro país.

ANTECEDENTES

PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Aunque es evidente que desde tiempos prehistóricos ya existían enfermedades y plagas de las plantas, fue con la transformación del hombre en agricultor, modificando las tierras y cultivándolas cuando los agentes causantes de las mismas comenzaron a cobrar una notable importancia, incidiendo negativamente en la producción. El hombre en su afán por obtener una gran variedad de productos vegetales con fines alimenticios, medicinales, industriales u ornamentales, cada día al aumentar la población y con las facilidades del comercio mundial, ha introducido en sus lugares de asentamiento numerosas especies y con ellas, sus plagas y enfermedades en muchos de los casos. Al romper los equilibrios naturales entre las plantas y sus enemigos, éstos han proliferado en ocasiones de forma alarmante obligando al hombre a una continua lucha con medios diversos.

Dentro de la agricultura, la denominación plaga afecta a todos los animales que causan daños a las plantas lo que incluye a vertebrados, artrópodos, moluscos y gusanos, mientras que la enfermedad afecta a los organismos que causan perturbaciones en el metabolismo de la planta pudiéndole producir incluso la muerte, lo que incluye una serie de organismos microscópicos tales como hongos, bacterias, viroides, fitoplasmas y virus.

ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS

Este es el grupo más grande de patógenos de plantas y se presentan en grandes variedades de formas y tipos. Los hongos están formados por filamentos microscópicos llamados hifas, son organismos heterótrofos. Las hojas infectadas presentan inicialmente zonas amarillas, las cuales se transforman en pardas al

morir las células enfermas. En el caso de infecciones vasculares, la planta se marchita y muere en poco tiempo (fusariosis). En general, producen infecciones locales y superficiales que dan lugar a clorosis foliar, marchitez, decoloración vascular, achaparramiento o una combinación de éstos. La incidencia y severidad de los síntomas está en función de la especie hospedante, variedad, temperatura del suelo, aire y humedad. Por ejemplo la antracnosis del melón causada por *Collectrichum lagenarium* que ocasiona manchas grandes y oscuras a simple vista en hojas, tallos y frutos de melón y pepino; el mildíu ocasionado por *Plasmopara viticola*; enrollamiento de la hoja de durazno por *Taphrina deformans* que no afecta directamente a la fruta aunque reduce la cosecha, solo por mencionar algunos (Agrios, 1999).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos procariontes, unicelulares, de formas bacilar, esférica o en espiral, pueden ser móviles (flagelos) o inmóviles. Se encuentran en los más diversos ambientes, involucradas en procesos naturales importantes como la degradación de materia orgánica, pero también pueden ocasionar patogénesis en plantas y animales. Entre los géneros que causan enfermedades en plantas tenemos a *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium* y *Xanthomonas*. Algunas especies atacan una sola planta mientras que otras bacterias infectan un gran número de especies de plantas que pertenecen a diferentes familias (Bovey, 1977). No son tan frecuentes como los hongos, los síntomas no son tan variados, en general manchas y podredumbres húmedas que despiden muy mal olor, manchas, clorosis y moteados. Los daños pueden ser estéticos o llegar a causar la muerte de la planta, como por ejemplo la bacteria *Erwinia amylovora* que produce la enfermedad llamada "Fuego bacteriano" y mata a especies de la familia Rosácea.

ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIROIDES

Los viroides son moléculas de RNA circular con 250 a 400 nt y a diferencia de los virus no codifican proteínas y no contienen una cápside proteica. Estos patógenos son causantes de algunas enfermedades en cultivos importantes como papa, tomate y frutales. Los síntomas más característicos en plantas infectadas son el achaparramiento o enanismo, amarillamiento y deformaciones de los puntos de crecimiento de las plantas.

Éstos se diseminan mediante transmisión mecánica, por medio de herramientas sucias con savia, o por medio de propagación vegetativa. Algunas enfermedades causadas por viroides son la exocortis de los cítricos y la enfermedad del tubérculo fusiforme de la papa (Agrios, 1999; Chase, 1997).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR FITOPLASMAS

Son microorganismos unicelulares, carecen de pared celular por lo que son parásitos obligados. Su genoma es DNA y se diferencian de los virus en que poseen una membrana celular. Son responsables de enfermedades en más de 200 especies de plantas. Los vectores de estos patógenos son las chicharritas (Homoptera: Cicadellidae), se pueden transmitir por injerto y no mecánicamente (Powell y Lindquist, 1992).

Causan amarillamiento uniforme o enrojecimiento en las hojas, enanismo, acortamiento de entrenudos, achaparramiento de la planta, flores estériles, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas, desarrollo de apariencia de escoba de bruja y muerte de la planta. Se conoce al fitoplasma de la madera gomosa del manzano que se transmite por injerto; el fitoplasma de los amarillamientos del áster que se transmite por vectores y ataca a muchas plantas de ornato y el fitoplasma del achaparramiento del maíz que se transmite por vectores (Agrios, 1999; Dickinson y Lucas, 1987).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS

Un grupo importante que afecta también a las plantas son los virus, éstos actúan como parásitos celulares especializados, son patógenos que viven y se multiplican sólo dentro de las células vivas de sus hospederos, siendo entonces parásitos intracelulares obligados. Están compuestos de ácido nucleico y proteínas; el ácido nucleico en el 90% de los virus de plantas es RNA, sólo el 10% están compuestos de DNA, algunos poseen una envoltura de lípidos. Su tamaño puede variar entre los 20 y 300 nm. Pueden presentar dos formas básicamente: cilíndrico o helicoidal e isométricos o icosaédricos (Dacis *et al.*, 1984).

Las enfermedades causadas por virus en plantas pueden ser muy distintivas o en otros casos difíciles de reconocer, dañan las hojas, tallos, raíces, frutos, semillas o flores y producen pérdidas económicas ya que disminuyen la productividad y calidad de los productos agrícolas. Las pérdidas en las cosechas pueden ser severas, moderadas o mínimas. La severidad de las enfermedades virales varía con la localidad, la variedad del cultivo y de una estación a otra (Agrios, 1999).

Las enfermedades virales afectan a las plantas produciéndole diversos síntomas, tales como: mosaicos, rayados, clorosis de hojas, aclaración de nervaduras, bandeado de nervaduras, anillos, puntos necróticos, puntas de tallos o nervaduras distorsionadas, hojas deformes, enanismo, coloración anormal de las flores, afectan la reproducción, tamaño del fruto, reducen la cantidad de semillas, provocan esterilidad, reducen viabilidad de las semillas, marchitez y muerte de la planta (Bos, 1978; Cann, 1997).

Algunos virus pueden destruir plantaciones enteras como ha sucedido con la viruela del ciruelo, la hoja blanca del arroz, los amarillamientos de la remolacha y la tristeza de los cítricos. Sin embargo, la mayor parte de las enfermedades virales aparecen año con año en los cultivos con pérdidas por lo general, en ocasiones sin inducir algún síntoma visible. Por ejemplo, el *Potato virus X* (PVX) en las plantas

de papa cultivadas en Estados Unidos causa disminuciones en la producción de casi un 10% aun cuando no muestren síntomas visibles en el campo (Agrios, 1999).

Existe una amplia variedad de virus que infectan frutales particularmente al durazno en diversas partes del mundo, Cuadro 1. (Brunt et al., 1996). Entre los que destacan 3 virus (PDV, PNRSV y ToRSV) y 2 viroides (HPSVd y PLMVd).

Cuadro 1. Virus y viroides que infectan al durazno (*Prunus persica*).

VIRUS	SINTOMATOLOGÍA
<i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus</i>	Manchas verde oscuro
<i>Arabis mosaic nepovirus</i>	Mosaico, anillos cloróticos y distorsión de hoja
<i>Cherry mottle leaf virus</i>	Manchas cloróticas irregulares
<i>Myrobalan latent ringspot nepovirus</i>	Severo arrosamiento
<i>Peach rosette mosaic nepovirus</i>	Mosaico
<i>Peach yellow leaf closterovirus</i>	Hojas cloróticas
<i>Plum american line pattern ilarvirus</i>	Anillos cloróticos
<i>Plum pox potyvirus</i>	Aclaración de venas, hojas cloróticas y malformación, frutos con anillos pálidos
<i>Prune dwarf virus</i>	Detiene el crecimiento
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	Mosaico, líneas y anillos amarillos
<i>Strawberry latent ringspot nepovirus</i>	Detiene el crecimiento
<i>Tomato ringspot nepovirus</i>	Hojas y venas amarillas
<i>Plum bark necrosis stem virus</i>	Necrosis de corteza y gomosis
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	Deformación de frutos
<i>Hop stunt viroid</i>	Deformación de frutos

Continuación cuadro 1.

En México no se tienen cálculos precisos de las pérdidas ocasionadas por virus, aunque en la mayoría de los casos las enfermedades de origen viral no ocasionan la muerte de las plantas pero sí reducen su calidad ocasionando la disminución de su valor. En nuestro país, la propagación masiva de virus en los principales frutales se realiza en su mayoría a partir de injerto, la cual se ha convertido en la forma más importante de diseminación de virus inclusive superando la realizada por insectos vectores (Ochoa, 2002).

MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE VIRUS Y VIROIDES EN DURAZNO

Para la identificación y caracterización de virus y viroides de plantas se recurre a diversos métodos como son la serológicas (ELISA), microscopía electrónica, análisis de RNA-dc, PCR para virus de DNA y RT-PCT para virus de RNA, así como la clonación y secuencia de productos, la hibridación del tipo Dot-blot, etc.

En 1989 Scott y colaboradores determinaron la prevalencia de *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) en huertas de durazno de Carolina del Sur e investigaron la variación en la incidencia del virus entre los principales cultivares y áreas de producción. La detección del virus fue por ELISA de flores o tejidos jóvenes. Los principales cultivares de durazno crecidos en el estado fueron muestreados, colectando árboles de entre 6 y 10 años de edad. La incidencia observada de PNRSV en huertas individuales se extendió de 0 a 100%. La incidencia estimada de PNRSV en los cultivares fue 6.9% en Harvester, 10.6% en Junegolg, 15% en Redglobe, 39.5% en Loring, 44.1% en Blake, 52.9% en Coronet y 74.5% en Redhaven. Algunas huertas jóvenes fueron aparentemente infectadas, esto se dedujo por haber utilizado injertos de árboles infectados con PNRSV. Estos niveles de infección junto con las pérdidas potenciales de la producción causadas por este virus, son inmensas.

Hadidi y colaboradores en 1997 trabajaron con *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), el cual está ampliamente distribuido en plantas de durazno por Europa,

Asia, Norteamérica y Sudamérica. PLMVd o un viroide estrechamente vinculado, fue ocasionalmente detectado en cerezo, ciruelo y chabacano en ciudades de Europa y Asia. Se obtuvo como resultado un aislado de PLMVd en cerezo de 337 nt de longitud y es 92% homólogo al PLMVd aislado de durazno. Experimentos de hibridación molecular demostraron que PLMVd no se relaciona con el agente causal de la enfermedad del mosaico de durazno. También encontraron que es transmitido fácilmente en huertos por material de poda contaminado.

James y Upton en 1999 desarrollaron un ensayo de RT-PCR para la detección y diferenciación simultánea de PMV y CMLV, virus que afectan de manera importante a especies frutales. Usaron un primer oligonucleótido sentido con 100% de complementariedad a PMV y uno segundo oligonucleótido antisentido con 83% de complementariedad al sitio correspondiente del genoma de CMLV. Esto permitió la amplificación diferencial de fragmentos específicos de PMV y CMLV, 419 y 705 pb respectivamente. El par de oligonucleótidos de PMV detecta confiablemente todos los aislados de este virus examinado por RT-PCR, ambos en hojas de durazno y tejido de yemas.

La forma más eficiente de control de los virus en frutales es la utilización de material limpio en el establecimiento de los huertos. Por tanto, es de primordial importancia la limpieza de virus en plantas de viveros. Herrera y Madariaga en 2002 cuantificaron la incidencia de PNRSV, PDV, ToRSV y PPV en viveros de frutales de Carozo en la zona central de Chile, mediante pruebas serológicas de ELISA. Los virus que presentaron mayor incidencia fueron PDV (17.1%) y ToRSV (15.4%), seguido de PNRSV (9.7%) y PPV (4.2%). Entre las especies frutales, las más afectadas fueron los almendros (29.7%) y damascos (23.3%), seguido de durazneros (10.4%), nectarines (8.8%), cerezos (7.1%) y ciruelos (6.9%).

Una nueva estrategia para la detección simultánea de virus en plantas ha sido desarrollada, la hibridación molecular. Herranz y colaboradores en 2005 diseñaron polisondas de dos, cuatro o seis virus. La polisonda cuatro (poly 4) cubre cuatro

llarvirus que afectan árboles frutales incluyendo *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) y *American plum line pattern virus* (APLPV) mientras la polisonda dos (poly 2) fue diseñado para detectar simultáneamente, *Plum pox virus* (PPV) y *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), los dos virus más importantes que afectan estos árboles. Finalmente, la polisonda seis (poly 6) fue generada para detectar cualquiera de los seis virus. Las tres polisondas fueron comparadas con sondas individuales en términos de dilución y especificidad. La validación de la nueva estrategia de detección simultánea fue confirmada por el análisis de 46 muestras de campo de siete hospederos colectados en diez diferentes áreas geográficas.

Sánchez-Navarro y colaboradores en 2005 desarrollaron una reacción de RT-PCR en un paso para detectar y diferenciar 8 importantes virus que afectan árboles frutales: *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *American plum line pattern virus* (APLPV), *Plum pox virus* (PPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apricot latent virus* (ApLV) y *Plum bark necrosis stem pitting associated virus* (PBNPaV). La amplificación de fragmentos de la PCR de tejido infectado individualmente usando los 8 juegos de oligonucleótidos demostró la especificidad de la reacción de la RT-PCR. Los fragmentos de la PCR fueron detectados cuando una infección simultánea de 8 virus diferentes fue hecha por una mezcla del extracto de ácidos nucleicos de tejido infectado individualmente. Los fragmentos de la PCR esperados fueron observados en todos los casos. Naturalmente ocurren infecciones en mezcla encontrándose al PNRSV, PDV, APLPV y ACLSV.

HIPÓTESIS

- Considerando que los daños que muestran las plantas de durazno en algunas localidades de Morelos y Puebla como moteado amarillo, anillos irregulares y mosaico y que de acuerdo con análisis fitopatológicos, en donde se demostró que estos no son causados por bacterias, hongos o nemátodos, entonces se plantea la hipótesis de que estos daños pudieran ser inducidos por virus, fitoplasmas o viroides de origen desconocido o no descritos en México.

Dado que en México no se cuenta con la información bibliográfica necesaria para la detección de los patógenos que causan la enfermedad del "moteado amarillo del durazno" el objetivo del presente trabajo fue:

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar biológica y molecularmente el o los agentes causales de la enfermedad del moteado amarillo del durazno (*Prunus pérsica* (L. Batsch) en Morelos y Puebla, México.

METODOLOGÍA

Por la posibilidad de que el o los agentes causales del moteado amarillo del durazno fueran causados por virus, se utilizaron diferentes técnicas de diagnóstico y caracterización para este tipo de patógenos (Kurstak, 1981; Dijkstra y De Pajer, 1998).

❖ Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de flores, hojas y ramas jóvenes de árboles con síntomas de moteado amarillo en huertas comerciales en las localidades de Ocuituco, Tétela del Volcán, San Miguel y Tlacotepec ubicadas en el estado de Morelos y en las localidades de Domingo Arenas, Tepetzala, Tepetlaxco, San Martín Texmelucan y Las Dalias, Puebla, regiones que destacan por la superficie sembrada, volumen y calidad de producción.

❖ Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes indicadoras

Se maceraron porciones de hojas de durazno con síntomas de moteado amarillo en solución amortiguadora (NaPO_4 0.02 M, pH 7-DIECA). El macerado de hojas fue frotado en hojas de 11 especies diferentes de plántulas sanas con 2 a 4 hojas verdaderas, previamente espolvoreadas con carborundum, usando un hisopo de algodón. Las hojas inoculadas fueron lavadas con agua para eliminar residuos del macerado y del carborundum. La separación de virus y la determinación de su amplitud de hospedantes se repitió tres veces (Dijkstra y De Jager, 1998).

Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero a una temperatura de entre 25 y 35° C, 70% HR y 12 horas luz/oscuridad esto hasta la aparición de síntomas. Las plántulas de las especies inoculadas fueron tabaco (*Nicotiana*

glutinosa, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyii* y *N. tabacum* var *Xanth*), toloache (*Datura stramonium*), quelites (*Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*), gonfrena (*Gomphrena globosa*), chile (*Capsicum annum* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* M.).

❖ Detección por serología (DAS-ELISA)

Se utilizó la técnica de análisis inmunoenzimático de doble sándwich (DAS-ELISA), para desarrollarse en dos días (Clark y Adamas, 1977), con el fin de detectar infecciones virales directamente en muestras de campo. Se utilizaron antisueros policlonales comerciales específicos para *Apple mosaic virus* (ApMV), *Prunus dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV), Potyvirus y *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) (Agdia, Inc., Elkhart, IN), virus que han sido reportados para durazno en otros países (Brunt *et al.*, 1996; Mackenzie *et al.*, 1997; Yuyemoto *et al.*, 2003). La absorbencia de las posibles reacciones antígeno-anticuerpo se registró en un micro lector a 492 nm, a los 20 y 60 minutos después de la adición del sustrato. La reacción fue considerada positiva si la absorbencia era igual o superior a la lectura del control positivo para los virus probados (Clark y Adamas, 1977).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS

❖ Análisis de RNA de doble cadena (RNA-dc)

Se realizó la extracción y análisis del RNA-dc viral a partir de flores, hojas y de corteza de ramas jóvenes de durazno con síntomas de moteado amarillo, usando el protocolo propuesto por Valverde *et al.*, 1990.

El RNA-dc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, usando un mini gel (1.75mm x 7cm x 8cm) montado en una cámara Biorad doble. El volumen del extracto de RNA-dc viral de las muestras fue de 30µL por carril (no se determinó concentración). Se incluyeron como marcadores de peso molecular

de los componentes virales, muestras de RNA-dc de *Cucumber mosaic virus* o *Tobacco mosaic virus* para determinar el peso molecular de los componentes de los supuestos virus separados del durazno. Las condiciones de electroforesis fueron de 100 volts por 2:30 hrs. a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos con solución de nitrato de plata (0.011 M) (Valverde *et al.*, 1990).

❖ Hibridación molecular no radiactiva

Para detectar la presencia de los diferentes virus se realizó una hibridación molecular Dot-blot, como sonda se utilizó un fragmento del gen clonado de la proteína de la cápside de los virus: PBNSV, ApLV, PPV y PNRSV y de los viroides HSVd y PLMVd. Las sondas fueron marcadas con Digoxigenina fluorescente no radiactiva (Dig-UTP-T7 fluorescent).

Para el ensayo Dot-blot, el RNA de las muestras fue previamente desnaturalizado para ser transferido directamente a membranas de Nylon (+) y posteriormente ser fijado mediante exposición a luz ultravioleta. Las membranas fueron pre-hibridadas e hibridadas a 65 °C usando la sonda respectiva. En condiciones de hibridación, esta sonda marcada se hibrida a cualquier hebra de ácido nucleico complementaria fijada a la membrana. Cualquier exceso de sonda no hibridada se eliminó por lavados y los híbridos marcados se detectaron mediante autorradiografía (Surzycki, 1999; Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook y Russell, 2001).

❖ Detección de virus por transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

La RT-PCR se efectuó en un solo paso (RT-PCR Access, Promega. USA) usando RNA-dc obtenido de plantas con síntomas de moteado amarillo descrito previamente, utilizando distintos pares de oligonucleótidos (Cuadro 2), que amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside (CP) específicos

para virus que se encuentran en durazno (Mackenzie *et al.*, 1997; James y Upton, 1999; Saade *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para detectar virus, viroides^Ω y fitoplasmas^Φ en durazno.

OLOGONT	SECUENCIA (5'-3')	PB
PNRSV C537 PNRSV H83	ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAG	455
PNRSV VP77 PNRSV VP78	GCATCCCATTGGGGCATC GAACCTCCTCCGATTAG	356
ApMV VP77 ApMV VP79	GCTTCCTTAGGGGGCATC CGTCGAGGAAGTTAGGTTG	417
PDV VP77 PDV VP80	GCTTCCTTAGGGGGCATC CAACGTAGGAAGTTCACAG	517
PM16 AFF PM16 AFR	CAAACATGGCTTTCACCTTCTGCA TCTTGCCCCACCCTCAACAAATG	419
PM16 AFF CML-26R	CAAACATGGCTTTCACCTTCTGCA AGATCCTCTTCCCTTCTAAAATG	705
TRSV F TRSV R	CTTGCGGCCCAAATCTATAA ACTTGTGCCCAGGAGAGCTA	350
PM-AF1 PM-AFR	TCACCTTCTGCAGATACGAAGTA GCTGTTCTCACAAAGAATCTA	383
PDV H PDV C	CCGGTATGATATCTCGTACCGAG TAGTGCAGGTTAACCAAAAGGAT	517
PPV F PPV R	ACAATGCTCTTCAAAGATGGAA GTCTCTGCACAAGAACTATAACC	313

ΩPLMVd dc PLMVd dH	AACTGCAGTGCTCCGT CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG	300
ΩHSVd dc HSVd dH	TCGGAAGAGCCAGAAGG TGAGACGCGACCGGTGGCATCACCT	250
ΦP1 TINT	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT TCAGGCGTGTGCTCTTAACCAGC	1600
ΦR16F2 R16R2	ACGACTGCTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1200

Continuación Cuadro 2.

Los productos de la RT-PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, usando buffer TBE. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.5% y su peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular 1 Kb plus (GIBCO BRL) incluido en el mismo gel. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 V por 1 hr a temperatura ambiente.

Para una identificación más precisa y poder realizar un análisis filogenético se utilizaron tres juegos de oligonucleótidos para amplificar el componente RNA3 completo como fue el caso del PNRSV (Cuadro 3), el cual contiene la MP y CP proteínas que sirven para poder identificar hasta especie.

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para detectar el componente RNA 3 completo del PNRSV.

OLOGONT	SECUENCIA (5'-3')	PB
VP 968 VP 313	CACAAAGCTTGTTTTACAATCGAAATCGTAAC CACACTGCAGCTTCCCTAACGGGGC	600
VP 969	CACAAAGCTTGTTGTTTTACCAAATGAAATCGTAAC	300

VP 313	CACACTGCAGCTTCCCTAACGGGGC	
VP 970	CACAAAGCTTGTTTTATATGCCAGAAATCGTAAC	1200
VP 313	CACACTGCAGCTTCCCTAACGGGGC	

❖ Clonación y secuenciación

Secuenciación directa

Se obtuvieron fragmentos de la RT-PCR que fueron purificados a partir del gel de agarosa al 1%, estos fragmentos se cortaron y limpiaron con el kit de Wizard (wizard SV Gel and PCR clean-up System, PROMEGA) los cuales fueron secuenciados directamente de un fragmento de 455 pb de la proteína de la cápside, amplificado por RT-PCR los cuales fueron analizado en un secuenciador Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer en el laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM.

Clonación y secuenciación

El componente RNA-3 del PNRSV que incluye los genes completos de la MP y CP clonados de forma independiente en *E. coli* cepa DH5α utilizando el vector pTZ57R (InsT/Aclone PCR, Fermentas). Los productos clonados fueron analizados en un secuenciador Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), en Valencia, España. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se juntaron y fueron analizadas y comparadas para su identificación con secuencias disponibles de otras partes del mundo en la base de datos del GenBank, utilizando el método Clustal (MegAlign, DNA Star software, Madison, WI) (Sanger et al., 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ❖ Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes indicadoras

Se separó un virus de los macerados de hojas y ramas tiernas de durazno con síntomas de moteado amarillo, procedente de Ocuituco, Tétela del Volcán, San Miguel y Tlacotepec en el estado de Morelos y Domingo Arenas, Tepetzala, Tepetlaxco, San Martín Texmelucan y Las Dalias en el estado de Puebla. El virus relacionado con el moteado amarillo del durazno causó grandes manchas irregulares de color blanquecino sólo en las hojas inoculadas de todas las especies de tabaco (*Nicotiana tabacum* var *Xanthi*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana* y *N. debneyii*). Manchas similares aunque muy tenues se observaron en chile y tomate, sin movimiento sistémico. En las hojas inoculadas de *Gomphrena globosa* se observaron pequeñas lesiones locales necróticas, sin movimiento sistémico. En las demás plantas indicadoras no se observaron síntomas o daños de alguna clase.

Al parecer el virus relacionado con el moteado amarillo del durazno tiene una reducida amplitud de hospedantes, afectando solo a especies de solanáceas y quenopodiáceas. Sin embargo, se ha observado que la concentración de diferentes especies de virus en durazno varía dependiendo del estado fenológico (Dal Zotto *et al.*, 1999). Por tanto, es posible que la carga viral fuera baja en las muestras recolectadas, lo que posiblemente afectó el proceso de transmisión mecánica del virus relacionado con el moteado amarillo del durazno a las hospedantes indicadoras utilizadas en este trabajo. También es posible que se encuentren otros virus que no se transmiten mecánicamente (James *et al.*, 1999) o que tienen una amplitud de hospedantes diferentes al usado en este trabajo, lo que indica la importancia de realizar el diagnóstico de virus en durazno en diferentes épocas del año usando otros métodos de detección (Saade *et al.*,

2000; Moury *et al.*, 2000; Marbot *et al.*, 2003).

❖ Detección por serología (DAS-ELISA)

Los ensayos de detección serológica de virus en durazno cultivado en las regiones de Morelos y Puebla, fueron positivos sólo para el antisuero de PNRSV. El ensayo de DAS-ELISA fue positivo sólo en 50% de las muestras recolectadas, aunque todas mostraron síntomas de moteado amarillo. La detección de PNRSV por DAS-ELISA sólo fue posible cuando se usó la corteza de las ramas más jóvenes y las hojas, los resultados fueron negativos cuando se usaron otras partes de la planta, como flores, sépalos o pétalos. Es posible que una baja concentración de proteína viral o la presencia de compuestos desconocidos en estructuras florales afectaran la sensibilidad de la detección de PNRSV por DAS-ELISA en el material recolectado.

La detección serológica de virus en durazno no fue el método más eficiente de diagnóstico probablemente debido a diferencias en la concentración de virus en la planta, ya que se ha determinado que la carga viral, que varía durante todo el año y que incluso es distinta entre los diferentes tejidos, redujo significativamente la sensibilidad de la técnica (Dal Zotto *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1989). Es factible que en el material enfermo se encuentren variantes de PNRSV, distintas a los antisueros usados y que esto haya afectado su detección (Hammond y Crosslin, 1998; Moury *et al.*, 2000) o que se encuentren otros virus distintos al PNRSV aun no identificados en México (James y Upton, 1999; James *et al.*, 1999). En 1995 se reportó por serología la presencia de *Prunus mosaic virus* (PMV) (Oldfield *et al.*, 1995) en algunos estados de la República Mexicana sin precisar la localidad. Por tanto es necesario establecer la mejor época del año para detectar infecciones por el PNRSV e identificar la presencia de otros virus que infectan al durazno en la región, no sólo por serología sino en combinación con otras técnicas (Moury *et al.*, 2000).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS

❖ Análisis de RNA de doble cadena (RNA-dc)

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de RNA-dc de origen viral obtenido por columnas de celulosa, mostró consistentemente la presencia de tres bandas de 3.6, 2.5 y 1.8 Kb de peso molecular (Figura 3 Carriles A y G), similares a los patrones electroforéticos del PNRSV (Fulton, 1985). Este tipo de bandas fueron visibles en algunas muestras y en otras fueron muy tenues (Figura 3 Carriles B y F) o no se observaron a pesar de mostrar síntomas claros del moteado amarillo; esto indica que la carga viral del PNRSV fue diferente entre las muestras analizadas. Aunque el patrón electroforético de RNA-dc del PNRSV observado fue el más frecuente en la mayoría de las muestras, en algunas se observaron patrones electroforéticos de RNA-dc que indicaron la presencia de otros virus en mezcla con el PNRSV (Figura 3 Carriles C y E).

Estos resultados confirman la necesidad de evaluar en diferentes tiempos y en distintos tejidos de durazno la concentración de RNA-dc viral, que pudiera estar relacionada con la carga viral del PNRSV (Marbot *et al.*, 2003), pero que también permita identificar por este método otros virus desconocidos y usarse como una alternativa relativamente segura de diagnóstico de virus en esta planta (Valverde *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 1997).

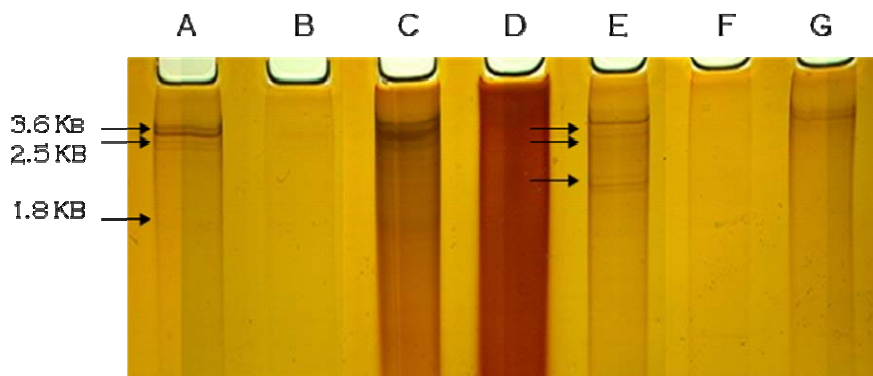


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de RNA-dc de plantas de durazno con síntomas de moteado amarillo. Carriles A y G) patrón electroforético de PNRSV. Carriles C y E) PNRSV en mezcla con virus no identificados. Carriles B y F) RNA-dc de PNRSV en baja concentración. Carril D) RNA de planta sana degradado.

❖ Hibridación molecular no radiactiva

Se detectaron infecciones por virus y viroides en plantas de durazno con síntomas de moteado amarillo recolectadas en varias localidades de Morelos y Puebla, por medio del ensayo de Dot-blot. El virus detectados fue: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) y el viroide *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Figura 4). Sin embargo, aunque en la mayoría de las muestras se detectaron el PNRSV y el PLMVd, se obtuvieron manchas muy tenues por lo que la detección no fue tan eficiente como el RT-PCR.

En esta prueba se detectó una mancha que pareció corresponder al ApLV dando positivo a todas las muestras, sin embargo la clonación y secuenciación del producto de la RT-PCR fue negativa en todos los casos, por lo que se concluyó que este virus no estaba presente en las muestras analizadas y que algún producto de la planta hibridó con la sonda correspondiente.

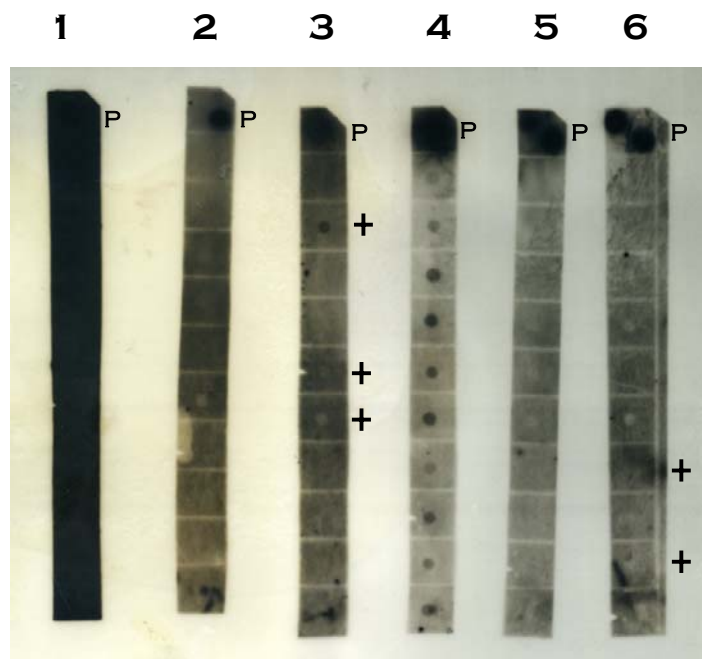


Figura 4. Análisis Dot-blot de plantas de durazno infectadas con virus y viroides. Tira 1) HSVd. Tira 2) PBNSV. Tira 3) PLMVd. Tira 4) ApLV. Tira 5) PPV. Tira 6) PNRSV. Control positivo (P) para cada virus. Los resultados positivos se marcan con una cruz.

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

Se determinó la presencia del PNRSV por la RT-PCR en la mayoría de las muestras recolectadas con los síntomas de moteado amarillo obteniéndose un producto esperado de 455 pb (Figura 5 y 6) con los oligonucleótidos PNRSV-C537 y PNRSV-H83 (Mackenzie *et al.*, 1997). Sin embargo, en algunas muestras se obtuvieron visiblemente bajas concentraciones de los productos de la RT-PCR lo que al parecer indica que la carga viral del PNRSV fue diferente en las muestras recolectadas, esto de alguna forma, determinó la sensibilidad en la detección de este virus no sólo por la RT-PCR sino también por DAS-ELISA. La carga viral del PNRSV visiblemente varía entre los tejidos de durazno (Figura 7), lo que dificulta la detección de este virus (Dal Zotto *et al.*, 1999; Yuyemoto *et al.*, 2003).

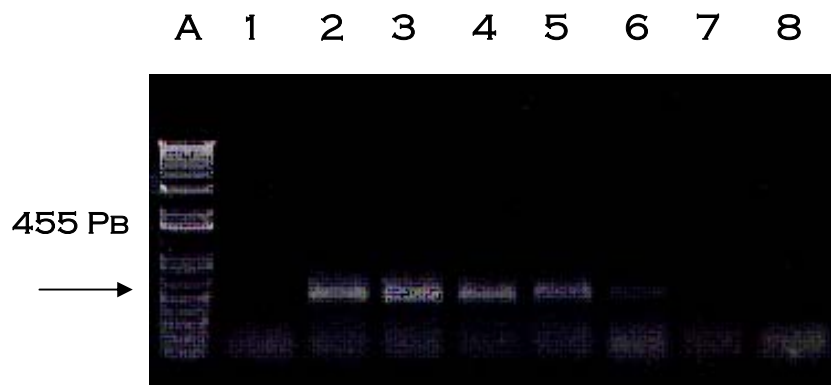


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de productos de la RT-PCR del PNRSV (455 pb) obtenido de diferentes muestras de plantas de durazno cultivadas en Morelos. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carriles 1-7) durazno con síntomas de moteado amarillo. Carril 8) testigo negativo (agua). Muestras positivas para el virus son: carriles 2, 3, 4, 5 y 6.

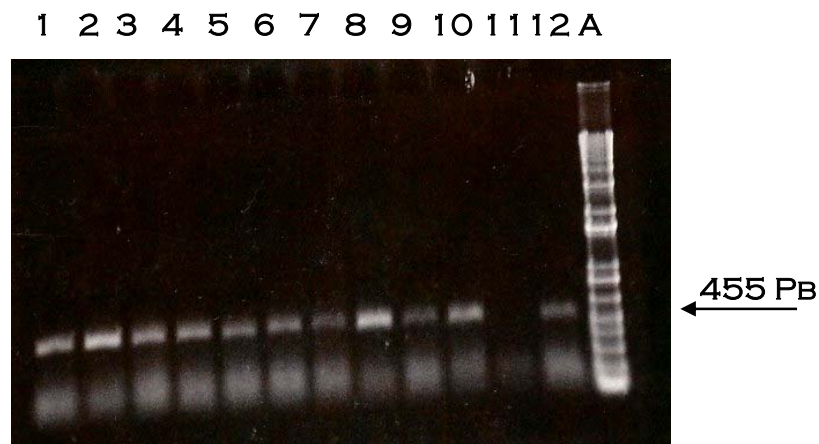


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de productos de la RT-PCR de PNRSV (455 pb) obtenido de diferentes muestras de plantas de durazno cultivadas en Puebla. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carriles 1-10) durazno con síntomas de moteado amarillo. Carril 11) testigo negativo (agua). Carril 12) testigo positivo PNRSV. Muestras positivas para el virus son: carriles 1-10 y 12.

En nuestro material se obtuvieron productos amplificados de hojas y de corteza de ramas jóvenes (Figura 7). Sin embargo, la RT-PCR fue más consistente y reproducible cuando se utilizó el RNA-dc de hojas jóvenes, sobresaliendo de otros métodos para la obtención de RNA viral (Plant Trizol o RNA Reagent, Invitrogen, USA), lo que permitirá detectar a este virus en cualquier época del año, en combinación con otros métodos de detección (Mackenzie *et al.*, 1997; Marbot *et al.*, 2003).

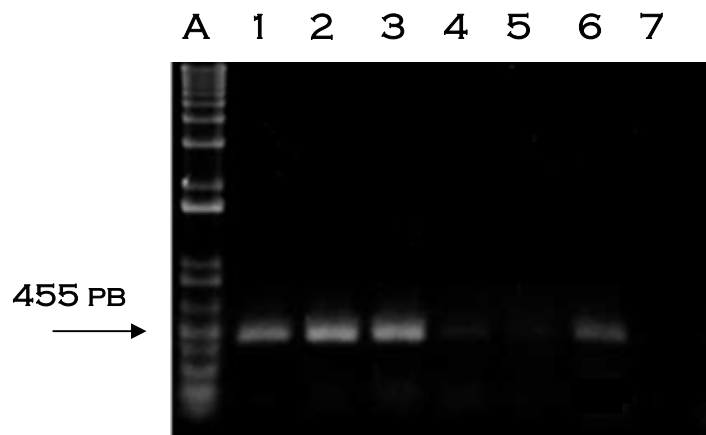
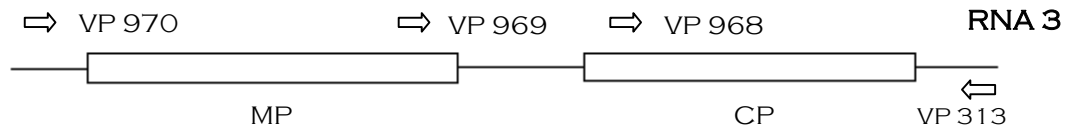


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% obtenido de diferentes tejidos de la planta de durazno. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carril 1) hojas jóvenes. Carril 2) hojas viejas. Carril 3) pecíolos. Carril 4) tallos tiernos. Carril 5) hojas enchinadas. Carril 6) testigo positivo PNRSV. Carril 7) testigo negativo (agua). Muestras positivas para el virus son: carriles 1, 2, 3, 4 y 6.

El análisis electroforético de los productos de la RT-PCR para el componente 3 del PNRSV obtenido de muestras de hojas de durazno con síntomas de moteado amarillo, mostró 3 bandas de 300, 600 y 1200 pb utilizando los oligonucleótidos VP969-VP313, VP968-VP313 y VP970-VP313 (Figura 8A) respectivamente que dirigen la amplificación del componente RNA3 que está conformado por el gen de la proteína del movimiento (MP) y el gen de la proteína de la cápside (CP) (Figura 8B).

A



B

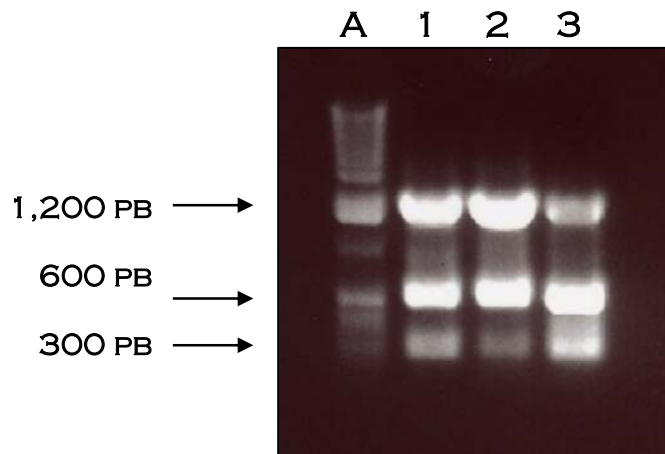


Figura 8. A, Diagrama de *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) RNA 3 mostrando la localización de los oligonucleótidos usados para la RT-PCR, clonación y secuenciación de los aislados de PNRSV. B, Electroforesis en gel de agarosa al 1% del componente RNA3 de PNRSV. Carril A) marcador PM 1Kb. Carril 1) Las Dalias (5). Carril 2) Las Dalias (11). Carril 3) Tepetlaxco (5). Muestras positivas para el virus son: carril 1, 2 y 3.

Se detectó también por la RT-PCR la presencia del *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Figura 9) amplificando un fragmento de 337 pb que corresponde al gen de la proteína de la cápside. El análisis de la secuencia nucleotídica es 98% homologa al PLMVd de durazno de otros aislados de diferentes partes del

mundo, confirmando esto junto con el análisis de Dot-blot para PLMVd reportándose en México por primera vez. Además se logró determinar la presencia preliminar del *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Figura 10) amplificando un producto de 400 pb.

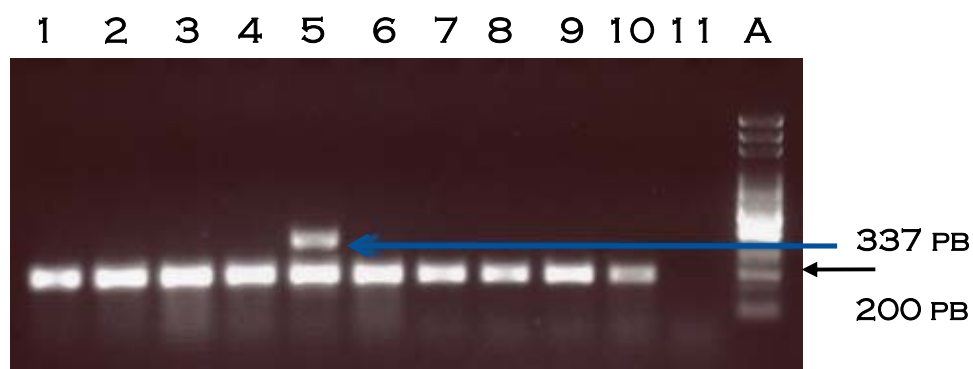


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% del PLMVd obtenido de diferentes plantas de durazno. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carriles 1a 10) durazno con síntomas de moteado amarillo. Carril 11) testigo negativo (agua). La banda de 200 pb es el control interno de la planta. Muestra positiva para el virus es: carril 5.

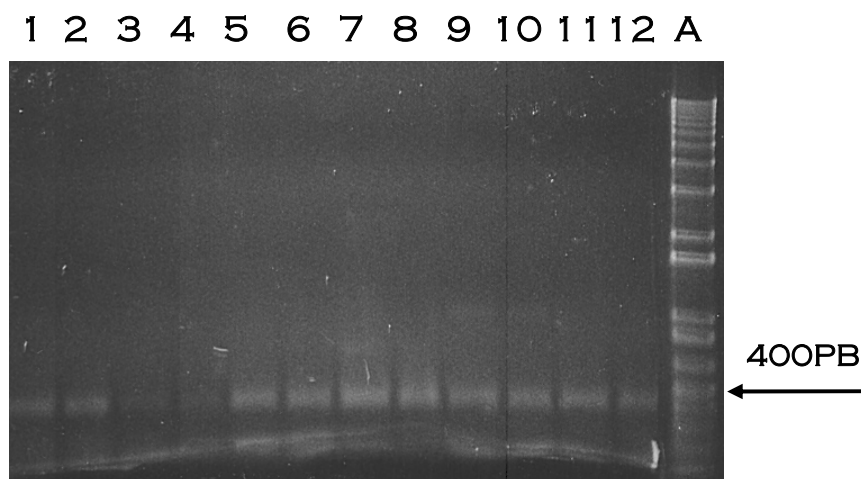


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% para TRSV obtenido de diferentes muestras de plantas de durazno. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carriles 1 a 12) durazno con síntomas de moteado amarillo. Muestras positivas para el virus TRSV son: carriles 1, 2, 5-12.

❖ Clonación y secuenciación

Secuenciación directa

Se obtuvieron secuencias de los productos de la RT-PCR de aislados de PNRSV de las localidades de Ocuituco (No de Acceso EF456764, EF456765, EF456766), Tétela del Volcán (No de Acceso EF456767, EF456768, EF456769, EF456770) y Tlacotepec (s/No) del estado de Morelos y Domingo Arenas (No Acceso DQ979004), Tepetzala (No de Acceso DQ979005), San Martín Texmelucan (No de Acceso EF456771) y Las Dalias (s/No) del estado de Puebla. Estas secuencias son parciales ya que se obtuvieron de un fragmento del gen de la proteína de la cápside y constan de 455 pb (Figura 11). Estas secuencias provenientes de la RT-PCR directamente confirmaron la identidad de PNRSV y fueron la base que nos indicó la presencia del virus. Sin embargo, las secuencias que se obtuvieron no son completas y contenían inconsistencias (N's) por lo que no se utilizaron para hacer dendrogramas y análisis filogenéticos.

```
CTATANGNNGNTNTNACNATNNATNTTNNNTANTANCNTGTNNCATCNNACAANATTN  
CATAAANATNGGAGGNAGGGATNAAAATTGGNCAACCCTCTTCGAGNTNGGGTCCCTNTT  
TAAATACCCCTNTCCTTCGNACAGGGTCNATATCGGNACCATCTGAGGNGGATCCACCTT  
ATAAGTCCTCCNCCAATCCAATCCAACCATTCGAACTCATGGAGTTCATTTCGGTCTGAT  
AACAGTCAACAAAGTCAAATTTTGACCCATTAAGTGGGAAAAGTGGTCGTGAAGTCAAT  
GCTGATATACTTCACTACTTCTGTCTGTCGNACCTCCCGGTGACTATGCGCAACNAACCC  
TTTTGGAATTCTGGGCGGCACATTTCGGACCTCCTCACGGTCCAAGTAGTCTTCACGACTG  
GTTGCGGTCGGACCG
```

Figura 11. Secuencia nucleotídica parcial del gen de la proteína de la cápside del PNRSV de un fragmento de 435 pb a partir de una muestra de durazno con síntomas de moteado amarillo de Las Dalias (5), Puebla.

Clonación y secuenciación del componente RNA3 del PNRSV

El componente RNA3 de tres aislados del PNRSV fueron clonados y sus secuencias fueron depositadas en el Genbank (NCBI). Los aislados fueron denominados Las Dalias 5 (No de acceso FJ546090), Las Dalias 11 (No de acceso FJ546091) y Tepetlaxco 5 (No de acceso FJ546092) (Figura 12) todas del estado de Puebla.

Secuencia nucleotídica del Componente RNA3 del PNRSV

5' - GTTTTTACAATCGAAATCGTAACATCCATTAATTGGTTGGTTTCTCTTTTACTTGACTAG 60
 GTACCATTGAAACGAATTA AAAAGTCCTATTTCTCTAGTAACATCCCTTTTGTGGGTTTAG 120
 AGATTGTTGGTTGTCTATTCGTAATTCCTACTAGTTGGTTGAATAGTGTTCAGTatggcc 180
M A 2
 ggtgtcagtaaaaaccctccaccagtgatttttcagtggtggagtgttctatggacgaa 240
 G V S K N P S T S D F S V V E C S M D E 22
 atgagccagatatacagaggatttgcataaacttatgctgtccgatgagatgagggcgta 300
 M S Q I S E D L H K L M L S D E M R A L 42
 ccaacgaaaggttgatcatatcctgcatttggttaatctcccgaaatccaataactgaga 360
 P T K G C H I L H L V N L P K S N I L R 62
 ttagcagtaaggagcagaaaggtttctctcgcgacaggccgataaagtaaagaagaaa 420
 L A S K E Q K G F L S R Q A D K V K K K 82
 atttacagatgttaggccgagtattcctcgtttatgtaccgatcattcaggcgacgact 480
 I Y R C V G R V F L V Y V P I I Q A T T 102
 ttgggtttgataacccttaagttgcaaaactccgatacaggagagatttcagacgtcgtg 540
 L G L I T L K L Q N S D T G E I S D V V 122
 acagacgtcgaagccaaccgcgcctttgttataatggacagatggggaagatccctggtg 600
 T D V E A N R A F V I M D R W G R S L V 142
 gaatcagcagatttaaatctggttattccatttcatgtccggacgtccgacctggagcc 660
 E S A D L N L L Y S I S C P D V R P G A 162
 agagtgggagagatgatggctttttgggacgagaggatgtcaaggcagcagacttacttg 720
 R V G E M M A F W D E R M S R Q Q T Y L 182
 gagaaagggaaatcccattttattcccgattgccgagacaaaaccttcgaaatatcttaat 780
 E K G N P I L F P I A E T K P S K Y L N 202
 gataagaaggtgttgatgtctatggtccgaagtaggatattggcaggtacagaaggggtgc 840
 D K K V L M S M V R S R I L A G T E G C 222
 gatatagctcccgagactatagaagtcaaacgattaggggataataggaaggttttgact 900
 D I A P E T I E V K R L G D N R K V L T 242
 attcaaccgaaagccccgatcgtagaggaaattaaggacgatgttgaaccgttaggttcg 960
 I Q P K A P I V E E I K D D V E P L G S 262
 aatggtgaaaatcatatggaagagaagaccgtgaccggttaaggtcggtagttctggaagt 1020
 N G E N H M E E K T V T V K V G S S G S 282
 gcttgaGTGACTATGTCACGAGCGTGCCTTTGCGGAGCGTTTTTCTTTCTTTCTTCC 1080
 A - 283
 GAACATCTCTTTCATTTGATAatggtttgccgaatttgcaatcatacccacgctggtgga 1140
M V C R I C N H T H A G G 13
 tgccgttcttgcaagaagtgccatccgaatgatgctctgggtcccactcagggctcaacaa 1200
 C R S C K K C H P N D A L V P L R A Q Q 33
 agggctgcgaataacccgaataggaataggaacccgaatagggtttcgagcggatagga 1260
 R A A N N P N R N R N P N R V S S G I G 53
 cccgcggtccgaccgcaaccggtcgtgaagaccacttggaccgtgaggggtccgaatgtg 1320
 P A V R P Q P V V K T T W T V R G P N V 73
 cctccccgaattccaagggttatgtagcacataatcaccgagaggtgacgacgacagag 1380
 P P R I P K G Y V A H N H R E V T T T E 93
 gcagtgaagtacttgagcattgacttcacgaccactctccctcagttgatgggtcagaat 1440
 A V K Y L S I D F T T T L P Q L M G Q N 113
 ttgaccttattaactgtcatagtcgcaatgaactctatgagttcgaatgggttgattggg 1500
 L T L L T V I V R M N S M S S N G W I G 133
 atgggtggaggactataaggtggatcaacctaatgggtccgaatgccctgtctaggaagggg 1560
 M V E D Y K V D Q P N G P N A L S R K G 153
 ttcttgaagaccaaccgagaggttggcagttcgaacctccctccgatttagatttcgac 1620
 F L K D Q P R G W Q F E P P S D L D F D 173

acttttgcgagtacgcatcgtgctcgtcatcgaattcaagaccgatgtgcccgctggggcc	1680
T F A S T H R V V I E F K T D V P A G A	193
aaggcttggtagggatttgtacgtagtggttaagtgacttaccacgagtgcaaattccg	1740
K V L V R D L Y V V V S D L P R V Q I P	213
actgatgtccttgctggtcgatgaagacctgcttgagatctagAGTGAGATAAGCACACTC	1800
T D V L L V D E D L L E I -	226
GAATTTCTCCGAATGGAAAGTTCGCACCACCGGTAGTGGATATTGCGAAATAGATTTCTG	1860
AAAGTCGCTTCCCGCTTTCATGCTTGGAAATCTTACCTGCGTTAGCAGATGCCACAAC	1920
GTGAAGTTGTGGATGCCCGTTAGGGAAGC-3'	1950

Figura 12. Secuencia nucleotídica del componente RNA3 del PNRSV que comprende de la MP (175-1026) y el gen de la CP (1102-1782) junto con su conversión a aminoácidos a partir de un aislado de durazno con síntomas de moteado amarillo. Los números de derecha a izquierda muestran los nucleótidos y aminoácidos respectivamente.

El componente RNA3 del PNRSV consiste de 1950 nt y contiene dos ORF's de 852 y 681 nt separados por una región intergenética de 75 nt. El ORF próximo al extremo 5' codifica un polipeptido de 283 aa y es semejante a otros miembros de la familia *Bromoviridae* y corresponde a la MP (Sánchez-Navarro y Pállas, 1997). El ORF próximo al extremo 3' codifica para la CP un polipeptido de 226 aa correspondiente a la proteína de la cápside.

Las secuencias del RNA3 obtenidas por clonación fueron comparadas con las disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank (NCBI, 2008) mostrando una identidad del 98% con otras variantes del PNRSV distribuidos en otras partes del mundo, confirmando con esto que el virus aislado de durazno con síntomas de moteado amarillo y cultivado en los estados de Morelos y Puebla es el PNRSV.

El análisis filogenético no mostró diferencias significativas entre las secuencias de nucleótidos del componente RNA3 pero se observó que el aislado de Tepatlaxco se agrupa de manera diferencial con respecto a los dos aislados de Las Dalias a pesar de ser del mismo estado de Puebla (Figura 13). Por lo que se hizo la conversión a aminoácidos para así compararon por separado las secuencias de tanto de la CP como de la MP indicando que tienen una similitud del 100% con otras secuencias disponibles en el GenBank.

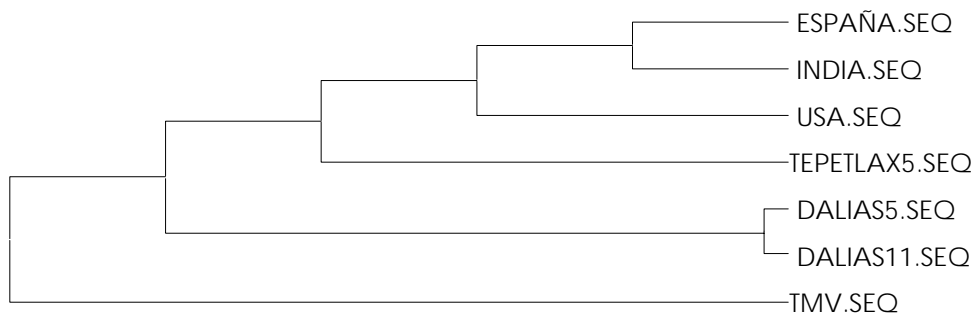


Figura 13. Dendrograma basado en la comparación de secuencias del componente RNA3 del PNRSV de aislados de durazno con síntomas de moteado amarillo. La secuencia fue alineada usando el algoritmo del programa MegAlign, DNASTar.

Las pruebas de transmisión mecánica a hospedantes diferenciales, las serológicas de DAS-ELISA, el análisis electroforético del RNA-dc viral, la RT-PCR, la clonación y secuenciación del componente RNA3 confirmaron la presencia, identidad y relación del PNRSV (Iarvirus de la familia *Bromoviridae*) con los síntomas de moteado amarillo en el durazno cultivado en Morelos y Puebla, México.

El *Prunus necrotic ringspot virus* pertenece al género Iarvirus el cual junto a *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* y *Oleavirus* constituyen la familia *Bromoviridae*. Los virus pertenecientes a ésta familia presentan un genoma tripartita de RNA de cadena simple (RNA 1, RNA 2 y RNA 3) (Figura 14). El RNA 1 y 2 codifican las proteínas de la replicasa P1 y P2 respectivamente que conforman el complejo de la RNA polimerasa viral. El RNA 3 tiene dos marcos de lectura abierta (ORFs) que codifican una proteína implicada en el movimiento célula a célula (MP) y la proteína de la cápside (CP) (Sánchez-Navarro y Pallás, 1997).

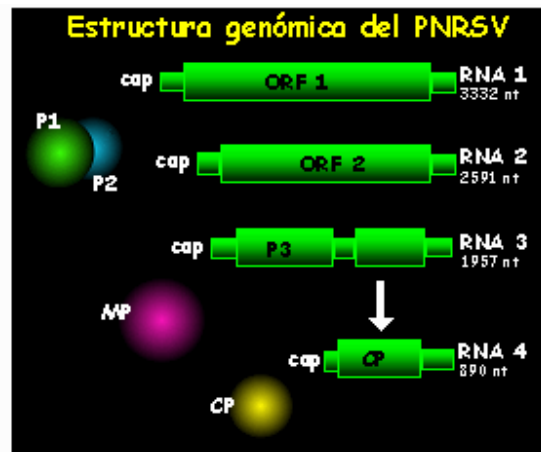


Figura 14. Estructura genómica del PNRSV.

Es uno de los patógenos más frecuentes en el mundo donde se cultiva durazno y otras especies de Rosáceas. Así, hay numerosas variantes de este virus (Aparicio *et al.*, 1999; Hammond y Crosslin, 1998) las cuales pueden afectar severamente el crecimiento, productividad y longevidad de las plantas infectadas (Pusey y Yadava, 1991). Su dispersión es principalmente por polen, semilla o propagación vegetativa (injerto) (Moury *et al.*, 2000). No se conocen insectos vectores que diseminen a este virus, pero puede ser transmitido artificialmente mediante transmisión mecánica a plantas de las familias Cucurbitáceas y Quenopodáceas. No existe contagio por contacto entre plantas (Fulton, 1985).

El PNRSV ataca a una gran diversidad de plantas de la familia de las rosáceas, incluyendo cerezo, almendro, durazno, chabacano y ciruelo. La severidad del daño depende de la especie, cultivar y condiciones ambientales; en áreas de E.U. donde crecen duraznos se observan síntomas asociados con infección por éste virus, el daño por la infección del PNRSV puede manifestarse con anillos cloróticos foliares, manchas necróticas o deformación y corteza necrosada

(Nyland *et al.*, 1974) además de muerte de las yemas y raíces, reduce también el crecimiento en árboles jóvenes y número de frutos (Mink, 1991). En general, se manifiesta con clorosis, necrosis, deformaciones y cierto grado de enanismo; los síntomas se expresan 1 ó 2 años después de la infección, en los siguientes años la planta puede o no mostrar la sintomatología. El PNRSV puede ser distribuido por material infectado (Cole *et al.*, 1982, Kyotani *et al.*, 1983, Nyland *et al.*, 1974). Algunas veces se ha encontrado en combinación con otros virus de frutales, particularmente con (PDV) (Mink y Aichele, 1984, y Parker y Cochran, 1951), APLPV y ACLSV (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005).

Estas propiedades contribuyen a su rápida propagación y una amplia distribución mundial. La detección de PNRSV en árboles frutales es problemático porque la concentración del virus fluctúa entre estaciones y el virus está distribuido irregularmente en el árbol infectado (Scott *et al.*, 1989).

No se conoce el origen del PNRSV en las plantas de durazno cultivadas en México, pero lo más probable es que haya sido introducido en el material vegetativo de esta especie o de otras especies de Rosáceas susceptibles, que frecuentemente se movilizan dentro de nuestro país o que se importaron desde tiempos de la colonia o en épocas recientes de otras regiones del mundo (Brunt *et al.*, 1996). Se desconoce la distribución de este virus en la región y los daños que causa en el ciclo productivo de este frutal.

Estos resultados también confirman la presencia del viroide PLMVd en Puebla, México por primera vez. PLMVd pertenece a la familia Avsunviroidae y está constituido por un pequeño RNA circular de 336 a 351 nt. Antes del desarrollo de síntomas la enfermedad es latente en árboles de durazno por aproximadamente 5 ó 7 años. Los síntomas de la enfermedad incluyen necrosis de ramas, desarrollo retrasado, envejecimiento prematuro de árboles, hojas con mosaico, deformación y decoloración de frutos y en algunos casos aspecto de calicó en hojas infectadas. PLMVd se transmite por propagación de brotes infectados y en

un grado menor por herramientas infectadas, el viroide no se transmite por semilla o por polen. Está ampliamente distribuido en Europa, Asia, Norteamérica y Sudamérica y la frecuencia de infección natural es alta (Hadidi *et al.*, 1997). El TRSV solo se pudo detectar por RT-PCR pero no se confirmó su presencia por clonación o secuenciación.

En otros países se ha determinado que el durazno es susceptible a los virus *Apple chlorotic leaf spot trichovirus*, *Arabid mosaic nepovirus*, *Cherry leaf roll nepovirus*, *Cherry mottle leaf trichovirus*, *Cherry rasp leaf nepovirus*, *Myrobalan latent ringspot nepovirus*, *Peach enation nepovirus*, *Peach rosette mosaic nepovirus*, *Peach yellow leaf closterovirus*, *Plum american line pattern llarvirus*, *Plum pox potyvirus*, *Prune dwarf llarvirus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Strawberry latent ringspot nepovirus*, *Tomato ringspot nepovirus* (Brunt *et al.*, 1996) y los viroides *Peach latent mosaic viroid* (Desvignes, 1980 y Sutic, 1999). En este trabajo se reportan el virus PNRSV y el viroide PLMVd infectando al durazno en los estados de Morelos y Puebla, México. PLMVd no fue tan frecuente como el PNRSV pero se logró detectar por RT-PCR, secuenciación y clonación de algunas plantas de durazno infectadas con los síntomas de mosaico amarillo.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia e identidad del PNRSV en plantas de durazno cultivadas en algunas regiones de los estados de Morelos y Puebla con síntomas de moteado amarillo, por transmisión mecánica a hospedantes indicadoras, por ensayo serológico de DAS-ELISA específico para el PNRSV y por análisis electroforético de RNA-dc.

El análisis electroforético permitió la detección de bandas del perfil y tamaño correspondiente al PNRSV en las muestras de durazno con moteado amarillo. También fue posible detectar en algunas muestras bandas de otros posibles virus en mezcla con el PNRSV.

Se detectaron infecciones del virus PNRSV y del viroide PLMVd por medio de hibridación molecular del tipo Dot-blot utilizando una polisonda Digoxigenina-fluorescente no radiactiva, específica para 4 virus y dos viroides.

Se confirmó la presencia e identidad del PNRSV mediante la RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican parte del gen de la proteína de la cápside de las muestras de durazno de Morelos y Puebla, mostrando una alta identidad de este virus con otros aislados comunes del PNRSV distribuidos en otras partes del mundo.

También se confirmó la identidad del PNRSV por medio de la clonación y secuenciación nucleotídica del componente RNA3 completo, reafirmando su homología comparando su secuencia de aminoácidos tanto de la CP como de la MP con otros aislados de PNRSV de otras partes del mundo.

Además fue posible detectar en mezcla con el PNRSV la presencia del viroide *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) en algunas plantas de durazno con síntomas de moteado amarillo.

REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. 2^{da} ed. LIMUSA. México, D. F. 838 pp.
- Aparicio, F., A. Myrta, B. Di Terlizzi, B. y V. Pallás. 1999. Molecular variability among isolates of prunus necrotic ringspot virus from different *Prunus* spp. *Phytopathology* 89(11): 991-999.
- Blomquist, C. L. y B. C. Kirkpatrick. 2002. Identification of phytoplasmas taxa and insect vectors of peach leaf roll disease in California. *Plant Dis.* 86: 759-763.
- Bos, L. 1978. Symptoms of Virus Diseases in Plants. Research Institute for Plant Protection. Wageningen, The Netherlands. 40-151 p.
- Bovey, R. 1977. La defensa de las plantas cultivadas. Omega. Barcelona, España. 883 pp.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. y Zurcher, E. J. (eds) 1996. Known susceptibilities of Rosaceae. *In*: Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' 7 de Marzo de 2007. 'URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/>
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. y Zurcher, E. J. (eds) 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. 'URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/>
- Cann, A. J. 1997. Principles of molecular virology. 2^{da} ed. Academy Press, London. 163-166 p.
- Chase, A. 1997. Foliage plant diseases diagnosis and control. APS, Press, St. Paul, Min. 168 p.
- Clark, M. F. y M. A. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

- Cole, A., G. I. Mink y S. Regev. 1982. Location of *Prunus necrotic ringspot virus* on pollen grains from infected almond and cherry trees. *Phytopathology* 72: 1542-1545.
- Dacis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. y Ginsberg, H. S. 1984. Tratado de microbiología. 3ra edición. Salvat. 695-720 pp.
- Dal Zotto, A., S. F. Nome, J. A. Di Rienzo, y D. M. Docampo. 1999. Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. *Plant Dis.* 83: 1055-1057.
- De La Torre, R. 1992. Incidencia, distribución y evaluación de daños causados por enfermedades en durazno en el Valle de Puebla. *Rev. Mex. De Fitopat.* 10: 139-152.
- Desvignes, J. C. 1980. Different symptoms of *Peach latent Mosaic*. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 15: 183-190.
- Dickinson, C. H. y J. A. Lucas. 1987. Patología vegetal y patógenos de plantas. LIMUSA. México, D. F. Pp 311.
- Dijkstra, J., y P. C. De Jager. 1998. Practical plant virology. Protocols and Exercises. Springer, Berlin. Pp 459.
- Fulton, W. R. 1985. *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*. In: Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher. (eds.) (1996 onwards). "Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20th August 1996". URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Guo, D., Maiss, E., Adam, G. y R. Casper. 1995. *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*: nucleotide sequence of RNA3 and the relationship to other ilarvirus based on coat protein comparison. *Journal General of Virology.* 76: 1073-1079.
- Hadidi, A., L. Giunchendi, A. M. Shamloul, C. Poggi-Pollini, y M. A. Amer. 1997. Occurrence of Peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Dis.* 81: 154-158.
- Hammond, R. W. y J. M. Crosslin. 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. *Journal of General Virology* 79: 1815-1823.

- Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A., Aparicio, F. y Pallás, V. 2005. Simultaneous detection of six Stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or "polyprobe". *Journal of Virological Methods* 124: 49-55.
- Herrera, M. G. y M. Madariaga. 2002. Incidencia de Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Prune dwarf virus (PDV), Tomoto ringspot virus (ToRSV) y Plum pox virus (PPV) en viveros de frutales de Carozo de la zona central de Chile. *Agríc. Téc.* v. 62 n. 1.
- James, D., y W. E. Howell. 1998. Insolation and partial characterization of a filamentous virus associated with peach mosaic disease. *Plan. Dis.* 82: 909-913.
- James, D., y C. Upton. 1999. Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of peach mosaic virus and cherry mottle leaf virus. *J. of Virological Methods.* 83: 103-111.
- James, D., S. E. Godkin, F. R. Rickson, D. A. Thompson, K. C. Eastwell, y A. J. Hansen, 1999. Electron microscopic detection of novel, coiled virus like particles associated with graft-inoculation of Prunus species. *Plant Dis.* 83: 949-953.
- Kyotani, H., M. Yoshida y M. Yamaguchi. 1983. Infection of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) in stone fruits. I. Influence of PNRSV on peach culture. Pages 17-26 in: *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Ser. A*, no. 10.
- Kurstak, E. 1981. *Handbook of plant virus infections. Comparative diagnosis.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 935 pp.
- Mackenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji y M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81(2): 222-226.
- Marbot, S., M. Salmon, M. Vendrame, A. Huwaert, J. Kummert, O. Dutrecq, y P. Lepoivre. 2003. Development of real-time RT-PCR assay for detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in fruit trees. *Plant Dis.* 87:1344-1348.

- Mink, G. I. y M. D. Aichele. 1984. Detection of Prunus necrotic ringspot and Prune dwarf viruses in Prunus seed and seedlings by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Dis.* 68: 378-381.
- Mink, G. I. 1991. Prunus necrotic ringspot virus. *Plant Disease the International Importance.* 3: 335-356.
- Moury, B., L. Cardin, J. P. Onesto, T. Candresse, y A. Poupet. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay testing of shoots grown in vitro and the use of immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction improve the detection of Prunus necrotic ringspot virus in rose. *Phytopathology* 90(5): 522-528.
- NCBI. 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Nyland, G., R. M. Gilmer y J. D. Moore. 1974. Prunus ringspot group. Pages 104-132 en: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America.* U.S. Dep. Agric. Handb. 437. U.S. Government printing office, Washington, DC.
- Ochoa, D. L. 2002. Virus en plantas ornamentales. En: *Manejo Fitosanitario de Ornamentales.* Bautista y col. (eds). Instituto de Fitosanidad, C. P., Montecillos, Texcoco, México. 237 pp.
- Oldfield, G. N., R. Creamer, C. Gispert, F. Osorio, R. Rodríguez, y T. M. Perring. 1995. Incidence and distribution of peach mosaic and its vector, *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae) in Mexico. *Plant Dis.* 79:186-189.
- Parker, K. G. y L. C. Cochran. 1951. Similarities of symptoms produced by the viruses causing ringspot of peach and necrotic ringspot of sour and sweet cherry. *Phytopathology* 41: 942.
- Powell, Ch. y R. Lindquist. 1992. *Ball Pest & Disease Manual.* Ball Publishing. Illinois, USA. 118 p.
- Pusey, P. L., y U. L. Yadava. 1991. Influence of *Prunus necrotic ringspot virus* on growth, productivity, and longevity of peach trees. *Plant Dis.* 75: 847-851.

- Sánchez-Navarro, J. A. y V. Pallás. 1997. Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA 3. Arch. Virol. 142:749-763.
- Sánchez-Navarro, J. A. y V. Pallás. 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. European Journal of Plant Pathology. 111: 77-84.
- Saade, M., F. Aparicio, J. A. Sánchez-Navarro, M. C. Herranz, A. Myrta, B. Di Terlizzi, y V. Pallás. 2000. Simultaneous detection of three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. Phytopathology 90:1331-1336.
- SAGARPA. 2008. <http://www.sagarpa.com.mx>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J., y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning a Laboratory Manual. Third Ed. Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.
- Scott, S. W., O. W. Barnett, y P. M. Burrows. 1989. Incidence of *Prunus necrotic ringspot virus* in selected peach Orchards of South Carolina. Plant Dis. 73:913-916.
- Surzycki, S. 1999. Basic techniques in molecular biology. Springer. Verlag, Berlin. 233-262 p.
- Sutic, D. D., Ford, R. E. y Tomic, M. T. 1999. Handbook of Plant virus diseases. Press LLC. 354-369 pp.
- Valverde, R. A., T. S. Nameth y L. R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Dis. 74:255-258.
- Yuyemoto, J. K., L. R. Bulluck III, S. Pethybridge, B. McCorkell y W. K. Asai. 2003. Horizontal spread of ilarviruses in young trees of several peach cultivars. Plant Dis. 87:75-77.

ANEXO 1

ANÁLISIS FITOPATOLÓGICOS PREVIOS

➤ Observación de material directamente en campo

Durante los recorridos por los huertos comerciales de durazno se observaron detenidamente las hojas, los frutos y las ramas buscando signos y síntomas que se relacionen con hongos (gomosis, cenicilla, roya, pudrición, etc.), bacterias (manchas, clorosis, mal olor o podredumbres húmedas), fitoplasmas (insectos vectores, enanismo, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas, hojas jóvenes enchinadas, etc.) y virus (mosaicos, rayados, clorosis de la hoja, deformación, puntos necróticos, coloración anormal de las hojas y apariencia del fruto, etc.)

➤ Observación de material al microscopio estereoscópico

Se analizaron hojas, frutos, tallos jóvenes, ramas y raíces.

➤ Crecimiento en medios de cultivo

Se realizaron dos medios de cultivo para el crecimiento de diferentes parásitos como PDA para hongos y medio LB para bacterias.

➤ Cortes histológicos

Se realizaron preparaciones de hojas de durazno para la observación de hongos fitopatógenos.