



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETECCIÓN E INCIDENCIA DE VIRUS Y VIROIDES EN DURAZNO DE
LA REGIÓN DE COATEPEC, HARINAS ESTADO DE MÉXICO DURANTE
EL AÑO 2014

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A

LUZ DEL CARMEN AVILA VASQUEZ

DIRECTOR DE TESIS :

DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA DE BAZ, ESTADO DE MÉXICO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz por su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas en la realización de este trabajo.

Al M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes por sus comentarios a este trabajo así como el apoyo en el análisis molecular.

A la Dra. Martha Martínez García por las opiniones otorgadas.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por los comentarios dados.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) a través del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo económico otorgado para realizar la investigación

A MI MADRE, PADRE Y HERMANOS

INDICE

TITULO	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
Características generales de los virus.....	6
Características generales de los viroides.....	9
Métodos de diagnóstico de virus.....	12
Principales virus que infectan al durazno.....	14
Principales viroides que infectan al durazno.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO.....	22
Objetivos particulares.....	22
MATERIAL Y MÉTODO.....	23
Detección de virus por Transcripción Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) punto final.....	23
Secuenciación directa de productos de la RT-PCR punto final.....	25
Análisis de las secuencias.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Transcripción Inversa ligada a la Reacción de Cadena de la Polimerasa.....	26
Secuenciación de los productos de RT-PCR de PNRSV, PcMV y PLMVd.....	30
Análisis de las secuencias.....	32
Incidencia viral y viroidal en diferentes períodos de tiempo.....	36
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

TITULO	PAGINA
Cuadro 1. Producción en toneladas y valor económico del cultivo de durazno en México durante el 2008.....	3
Cuadro 2. Municipios que ocupan el mayor porcentaje de siembra de durazno en el Estado de México.....	4
Cuadro 3. Listado de cebadores empleados para la detección de virus y viroides en durazno de Coatepec Harinas, Estado de México durante el estudio.....	24
Figura 1. Clasificación taxonómica del durazno.....	2
Figura 2. Representación gráfica de los estados líderes en la producción del cultivo de Durazno en México.....	4
Figura 3. Estructura de los viroides. Tomado de Flores, 2011.....	6
Figura 4. Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA propuesto para la replicación viroidal.....	7
Figura 5. Representación esquemática de un virus animal con envoltura.....	8
Figura 6. Clasificación de Baltimore.....	8
Figura 7. Estructura de los viroides	10
Figura 8. Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA propuesto para la replicación viroidal	11
Figura 9. Estructura y composición genómica de <i>Ilarvirus</i>	15
Figura 10. Virión y estructura genómica de <i>Trichovirus</i>	18
Figura 11. Virión y genoma de <i>Nepovirus</i>	19
Figura 12. Conformación secundaria del PLMVd.....	20
Figura 13. Estructura secundaria del HSVd.....	21
Figura 14 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. de productos de la RT-PCR del PNRSV.....	27
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la RT-PCR del PcMV.....	28

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la RT-PCR del PLMVd.....	29
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de la RT-PCR del Tricomex.....	30
Figura 18. Alineamiento por CLUSTAL W de la secuencia obtenida del PLMVd en durazno de Coatepec Harinas, Estado de México.....	32
Figura 19. Árbol filogenético de la secuencia obtenida del PNRSV de Coatepec Harinas , Estado de México.....	33
Figura 20. Árbol filogenético de la secuencia obtenida del PcMV de Coatepec Harinas, Estado de México.....	33
Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia obtenida del PLMVd de Coatepec Harinas Estado de México.....	34
Figura 22. Porcentaje de incidencia viral y viroidal durante los 5 períodos de colecta.....	35

RESUMEN

Fue detectada y evaluada la presencia e incidencia del *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Peach mosaic virus* (PcMV), un agente viral desconocido y el viroide *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) durante Enero, Mayo, Junio, Agosto y Noviembre del 2014 en una huerta comercial de durazno con daños foliares de mosaicos, anillos cloróticos, moteado amarillo y patrones lineales, ubicada en la región de Coatepec Harinas, Estado de México. La detección fue llevada a cabo mediante ensayos de Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando distintos juegos de cebadores específicos para cada virus y viroide, la identidad se confirmó a través de secuenciación directa de los fragmentos esperados empleando el analizador Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer con el kit BIG DYE V. 3.1 y electroforesis capilar con pop 7. La incidencia para cada virus y viroide fue calculada como el número de árboles infectados divididos entre el número total de árboles muestreados. La incidencia viral varío a través del tiempo (de Enero a Noviembre). El PNRSV y PcMV tuvieron un comportamiento similar, con un incremento desde Enero (16.66% y 28.33% respectivamente), a Marzo donde se observaron los mayores porcentajes de incidencia (48.33% y 36.66%), seguido de una reducción gradual a partir de Junio (36.66% y 30%), Agosto (31.66% y 5%) y presencia nula en Noviembre. Por otro lado el virus desconocido (Tricomex) y el PLMVd presentaron posibles periodos de latencia, detectando únicamente al primero en Noviembre (11.66%), mientras que el segundo se detectó mayormente en Enero (10%) seguido por un decaimiento hasta Noviembre (3.33%) sugiriendo que la fluctuación es posiblemente debida a cuestiones ambientales y concentración viral.

PALABRAS CLAVE: Detección, incidencia, RT-PCR, secuenciación

INTRODUCCIÓN

La fruticultura es una de las actividades más redituables del sector agropecuario, la superficie cosechada con frutales representa 6.44% del total nacional y el valor de producción 20.67% del total de México (Schwentesi y Sangerman, 2014).

En la producción total de frutales en México, sobresalen la manzana (*Malus domestica*) con 55 000 ha., tuna (*Opuntia* spp) con 45 974 ha., uva (*Vitis vinifera*) con 26 547 ha., ciruela (*Prunus domestica*) y durazno (*Prunus persica*) con 14 436 y 40 252 ha. respectivamente (Villegas y Mora, 2011).

El durazno pertenece a la familia *Rosacea* (Figura 1), es de tamaño medio (3-5m de altura), la extensión de sus ramas alcanzan alrededor de 15 m², su copa generalmente es redonda. La raíz no es muy profunda, las hojas son lanceoladas, alternas y ligeramente aserradas. Las flores son hermafroditas, completas y consisten de 5 pétalos y 5 sépalos. El fruto es una drupa.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: *Prunus*

Especie: *Prunus persicae*

Figura 1. Clasificación taxonómica del durazno

En México, 25 estados se dedican al cultivo del durazno (Cuadro 1), sin embargo, ocho son los que ocupan mayor relevancia: Sonora, Chihuahua, Zacatecas, Aguascalientes, Estado de México, Tlaxcala y Puebla (Figura 2).

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (hectáreas)	PRODUCCIÓN (toneladas)	VALOR DE LA PRODUCCIÓN (miles de pesos)
AGUASCALIENTES	343.00	3,761.00	34,398.58
BAJA CALIFORNIA	2.00	7.00	35.10
CHIAPAS	1,904.00	6,828.05	52,588.43
CHIHUAHUA	1,928.00	19,065.56	87,053.84
COLIMA	4.00	12.00	51.20
DISTRITO FEDERAL	30.60	146.00	953.82
DURANGO	831.65	1,810.80	9,911.08
GUANAJUATO	84.00	471.35	1,963.70
GUERRERO	1,517.55	8,959.23	33,302.68
HIDALGO	765.50	4,507.50	51,837.00
JALISCO	719.00	3,127.10	21,302.32
MÉXICO	3,296	34,102.05	184,534.74
MICHOACÁN	6,766.25	37,020.00	194,768.18
MORELOS	2,059.00	19,080.00	177,309.10
NAYARIT	282.00	1,975.30	5,911.34
NUEVO LEÓN	1,189.50	231.99	2,158.14
OAXACA	775.50	2,148.37	10,726.86
PUEBLA	3,280.45	17,057.10	76,885.81
QUERÉTARO	88.50	325.00	2,463.00
SAN LUIS POTOSÍ	170.50	403.00	3,208.00
SINALOA	33.00	60.00	240.00
SONORA	404.00	4,973.78	76,237.97
TLAXCALA	1,096.00	7,921.50	62,343.00
VERACRUZ	255.75	1,860.51	10,495.04
ZACATECAS	17,591.54	14,834.55	81,406.70

Cuadro 1. Producción en toneladas y valor económico del cultivo de durazno en México durante el 2008. SENASICA, 2010.

El Estado de México ocupa el segundo lugar a nivel nacional en la producción de durazno en las variedades criollo y diamante. En la cuadro 2 se pueden observar los municipios del mismo que contribuyen a este gran porcentaje.



Figura 2. Representación gráfica de los estados líderes en la producción del cultivo de Durazno en México. SENASICA, 2014

ESTADO	MUNICIPIOS
Estado de México	Atlacomulco, Coatepec Harinas, Jilotepec, Tejupilco, Valle de Bravo, Zumpango, Texcoco, Toluca, Sultepec, Almoloya de Alquisiras, Zacualpan

Cuadro 2. Municipios que ocupan el mayor porcentaje de siembra de durazno en el Estado de México. Tomado de SENASICA 2010.

El municipio de Coatepec Harinas destaca por sus altos rendimientos y volúmenes de producción. Sin embargo, los productores se enfrentan a problemas técnicos como: tamaño de la huerta, inserción de su producto en el mercado y falta de calidad del fruto (Larque *et al.*, 2009).

El municipio de Coatepec Harinas encabeza la lista de producción de *Prunus persica* con una superficie sembrada de 1988 ha., un rendimiento promedio de 14.8 t ha¹., y un volumen de producción de 29350 t. (Larque *et al.*, 2009).

Coatepec Harinas se localiza al sur del Estado de México, colinda al norte con el municipio de Toluca, Tenango del Valle y Zinacantepec, al sur con Almoloya de Alquisirias, Zacualpan e Ixtapan de la Sal, al este con Villa Guerrero y al oeste con Temascaltepec y Texcaltitlán (IGECEM, 2011). Su clima se divide en templado subhúmedo (mayor parte del territorio) y el semicálido tropical lluvioso (sur del municipio). La temperatura media oscila entre 8 y 24 °C (INEGI, 2000).

Existen registros de trabajos realizados desde 2008 a 2012 en la localidad de Temascaltepec, Estado de México de la detección del PNRSV y PLMVd y su asociación con daños foliares de mosaico, anillos cloróticos, moteado amarillo y patrones lineales presentes en huertas comerciales de durazno (De la Torre, 2010). Durante recorridos realizados en huertas comerciales de la región de Coatepec Harinas, Estado de México, región cercana a la zona anteriormente estudiada, se observaron síntomas parecidos a los reportados (Figura 3) los cuales, por distintos periodos de tiempo eran más marcados o no se presentaban, aunque no se tiene el registro de la causa de esta sintomatología, se reconoce que ocasiona la reducción del tamaño, de la maduración y de la vida productiva del *Prunus persica* en Coatepec Harinas, Estado de México, sugiriendo la posible presencia de virus y viroides.



Figura 3. Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno cultivado en Coatepec Harinas, Estado de México. A) Moteado amarillo; B) moteado y mosaico, C) mosaico y patrones; D) Anillos irregulares y moteados.

Características generales de los virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados, con tamaños que van desde 18 nm (*Tymovirus*, *Geminivirus*) hasta 2000 nm (*Closterovirus*), dependen de la célula huésped. Tienen un genoma de ácido nucleico (DNA o RNA) protegido por una cubierta proteica o cápside que le da al virus su estructura sólida y resistencia a condiciones ambientales, constituida por capsómeros. La cápside y el genoma asociado constituyen la nucleocápside, muchos virus codifican y transportan sus propias polimerasas (Figura 4). Los virus animales pueden tener una membrana lipídica alrededor de la cápside de la partícula viral, llamada envoltura y espículas, las cuales intervienen en el reconocimiento entre el virus y la célula huésped. Los virus que carecen de envoltura se llaman virus desnudos (Cann, 2005).

Mientras que los organismos celulares poseen un genoma compuesto por DNA o RNA bicatenario, los virus, como se mencionó anteriormente, son el único grupo taxonómico que presenta un genoma de DNA o RNA, que se puede presentar en las combinaciones de doble cadena (cd) o cadena sencilla (cs), de polaridad positiva (+) o negativa (-) según la clasificación de Baltimore (Figura 5) (Viral zone, 2014). Las características de la composición química y estructural de los ácidos nucleicos son determinantes en el diagnóstico y clasificación viral. El genoma de los virus está constituido de uno, dos, tres o más componentes a los que se denomina monopartita, bipartita, tripartita o

multipartita respectivamente (De La Torre, 2012). A nivel detallado, existen muchas diferencias en los procesos de replicación de diferentes virus, que son impuestas por la biología de la célula hospedera y naturaleza del genoma viral. Es posible extraer una visión general de ocho pasos sobre la replicación viral (Figura 6), incluyendo sus etapas comunes (iniciación de la infección, replicación y expresión del genoma, liberación de los viriones), las cuales de una forma u otra, son seguidas por todos los virus (Cann, 2005).

La forma y el tamaño de la cápside permiten clasificar a los virus en icosaédricos, de varilla rígida o hélice y de estructura compleja. La cápside es importante en el diagnóstico de enfermedades de origen viral, ya que la forma y tamaño son características distintivas de los virus.

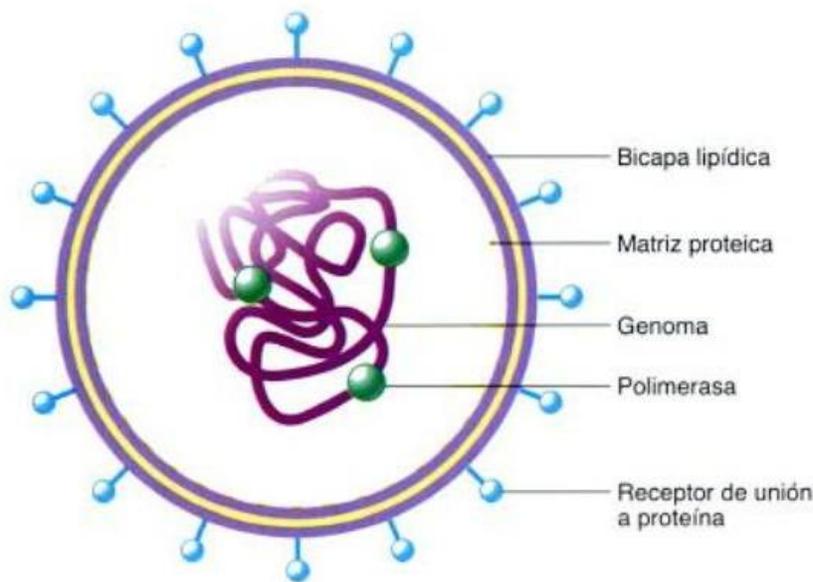


Figura 4. Representación esquemática de un virus animal con envoltura. Los componentes básicos de un virus son proteínas estructurales, que forman a la partícula viral y proteínas no estructurales como enzimas. La cápside constituida por capsómeros, la envoltura lipídica cuyo origen es la misma membrana plasmática de la célula hospedera. Los virus envueltos pueden tener proteínas de matriz dentro de la envoltura, que dan rigidez a la partícula viral. Tomado de Astier *et al.*, 2001

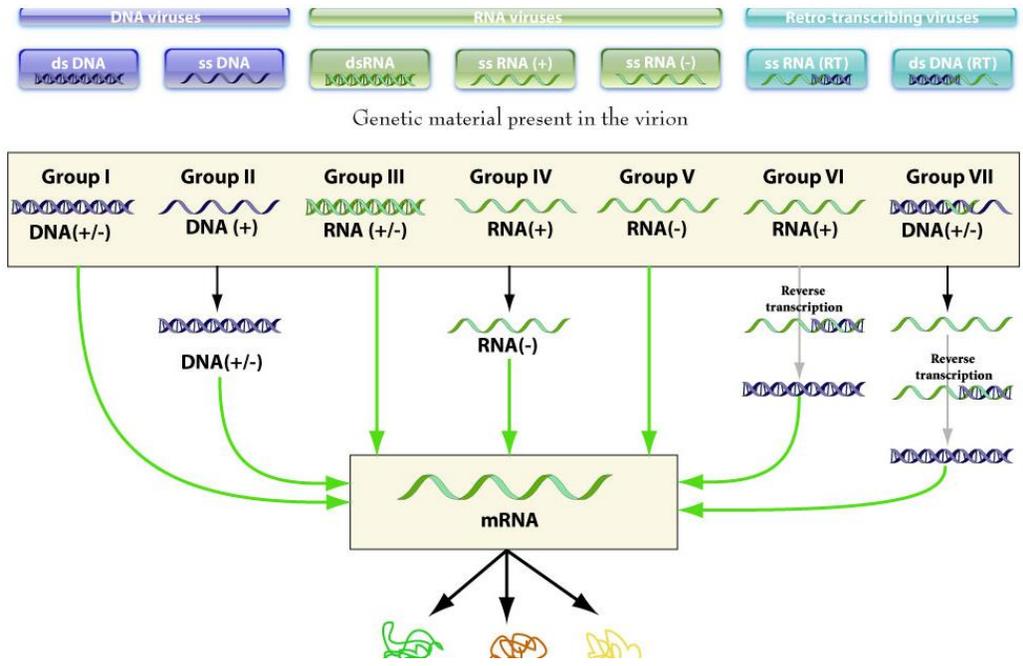


Figura 5. Clasificación de Baltimore. Clasificación en función del tipo de genoma viral, obteniendo siete familias. Tomado de ViralZone, 2015.

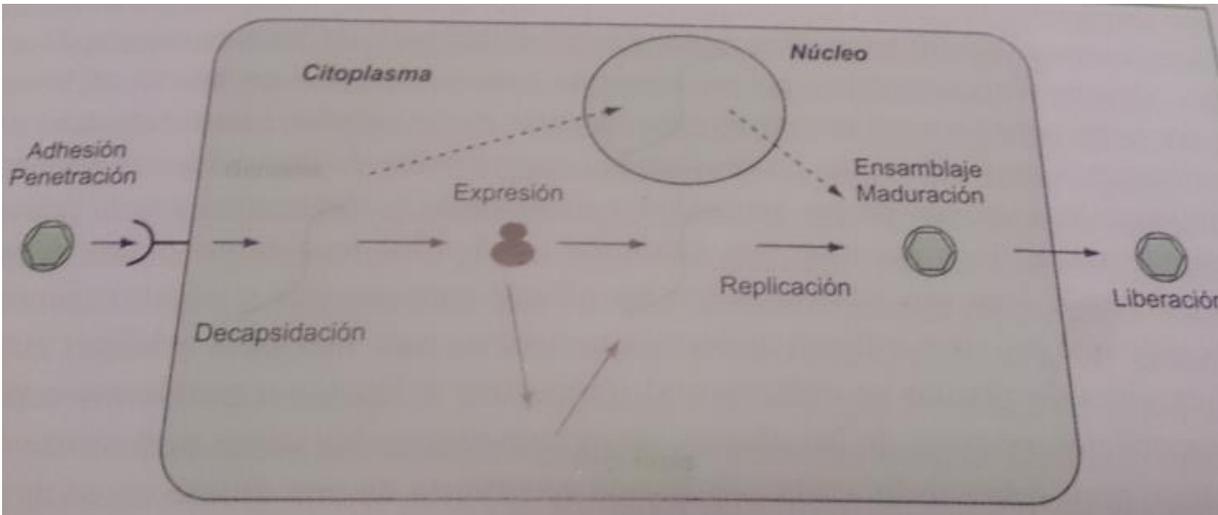


Figura 6. Esquema general de replicación vírica. Tomado de Cann, 2005.

Los virus pueden infectar a bacterias, todos los tipos celulares animales y vegetales. En el caso de enfermedades de origen viral en plantas, el 80% son por virus csRNA y afectan a las plantas produciendo diversos síntomas 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 de fruto, reducen la cantidad de semillas, provocan esterilidad, reducen viabilidad de las semillas, marchitez y muerte de la planta (Astier *et al.*, 2001).

Características generales de los viroides

Los viroides fueron descubiertos por Diener en 1971 (Astier *et al.*, 2001), son RNAs circulares pequeños (246-400 nt) con un elevado contenido en estructura secundaria. Infectan plantas causándoles diversas enfermedades. A diferencia de los virus, no codifican ninguna proteína, son completamente dependientes del hospedador.

Se han caracterizado y clasificado unas treinta especies de viroides en dos grandes familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*. Las especies de la familia *Pospiviroidae* son estables formando una estructura en forma de varilla, poseen tres motivos conservados: la región central conservada (CCR), la región terminal conservada (TCR) y la horquilla terminal conservada (TCH), cinco dominios: el dominio central (C) rodeado por los dominios patogénico (P) y variable (V), y los dominios terminales derecho e izquierdo (TR y TL) (Figura 7). La CCR está localizada en el dominio C, y la TCR y TCH en el dominio TL, el dominio C contiene el sitio donde los RNAs viroidales multiméricos de polaridad (+) son cortados y ligados. El dominio P es asociado con los efectos patogénicos, el dominio TR parece estar implicado en procesos de recombinación mientras que el dominio TL modula la misma, todos los miembros se replican en el núcleo y carecen de ribozimas de cabeza de martillo. Dentro de la familia *Avsunviroidae*, la mayoría de las especies adoptan estructuras secundarias en forma de cuasi-varilla, como el *Avocado sunblotch viroid* (ASVd) sin embargo, el *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) y *Chrysanthemum chlorotic mottled viroid* (CChMVd),

presentan una conformación ramificada, carecen de motivos y dominios conservados, se auto cortan por medio de ribozimas de cabeza de martillo, compuesta por 13 nt conservados distribuidos en cuatro segmentos que forman el centro catalítico de la ribozima (GAAAC)(GU)(AGUC)(AG) para el ASVd y (GUUC)(UC)(UCAG)(AC) (Figura 3) para el PLMVd. La zona de replicación se encuentra en el cloroplasto (Flores, 2011).

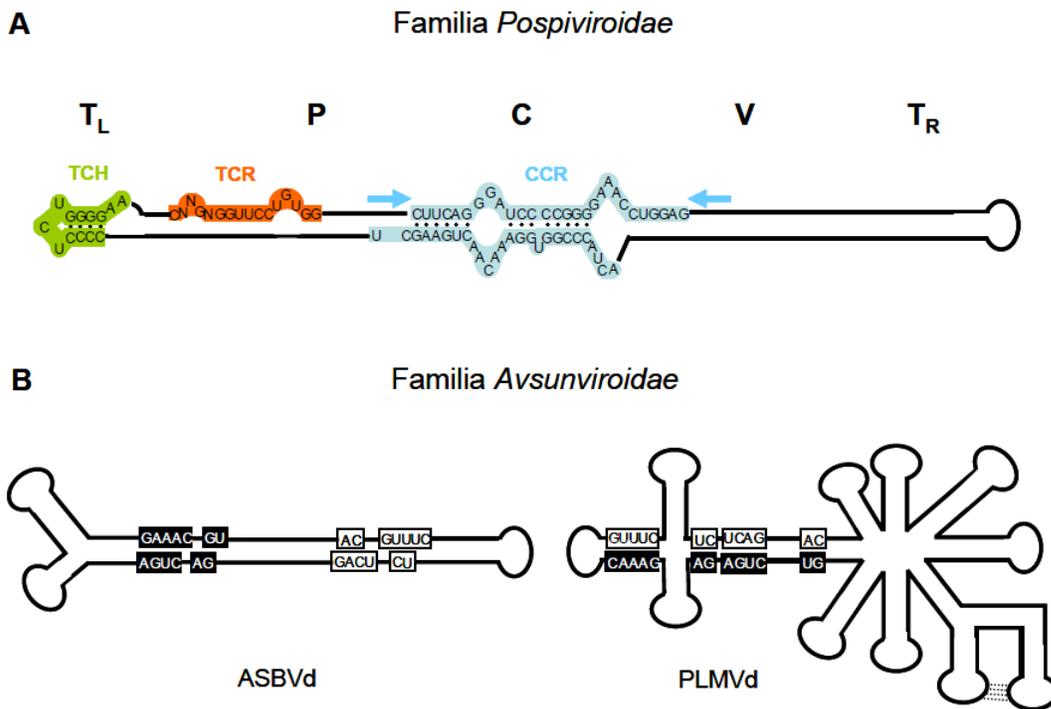


Figura 7. Estructura de los viroides. Tomado de Flores, 2011. (A) Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para los miembros de la familia *Pospiviroidae*. La localización de los cinco dominios se indica en la parte superior de la figura: C (central), P (patogénico), V (variable), y TL y TR (terminal izquierdo y derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman las regiones conservadas CCR, TCR y TCH están representados por los colores azul, naranja y verde, respectivamente. N indica cualquier nucleótido. (B) Representación esquemática de las estructuras secundarias de tipo cuasi-varilla y ramificada de la familia *Avsunviroidae*. Los nucleótidos conservados en ambas polaridades en las ribozimas de cabeza de martillo están sombreados en color negro y blanco, así como los sitios de auto escisión.

La forma de replicación conocida como “Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA” consiste en dos variantes denominadas simétrica y asimétrica. El RNA circular monomérico más abundante (polaridad positiva) es reconocido por una RNA polimerasa, dando lugar a cadenas de polaridad complementaria que pueden seguir dos caminos distintos (Figura 8). En la variante asimétrica estas cadenas sirven a su vez de molde para la síntesis de otras cadenas con polaridad positiva, que son cortadas posteriormente a fragmentos lineales y ligadas a las correspondientes moléculas circulares maduras. En la variante simétrica, las cadenas de polaridad negativa son cortadas y ligadas dando lugar a moléculas circulares de la misma polaridad, que sirven como molde en un segundo círculo rodante que es simétrico del primero, por lo tanto, la presencia de la forma circular monomérica de polaridad negativa indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo (Hadidi *et al.*, 2003).

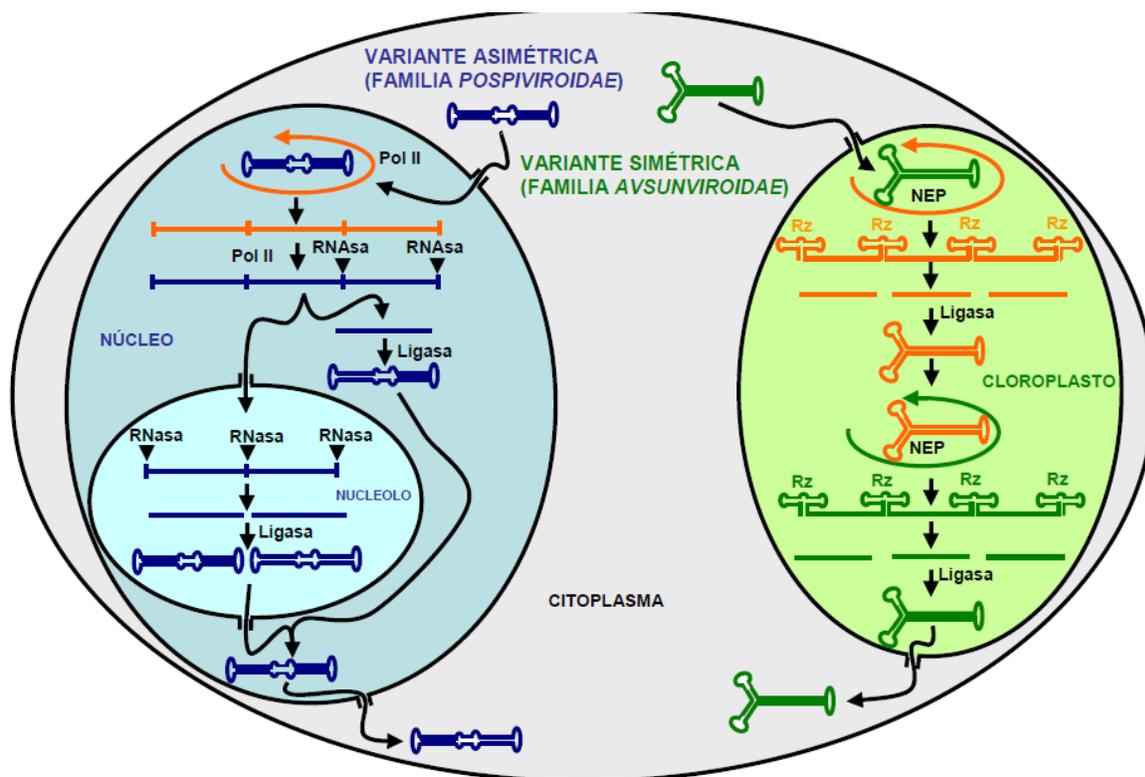


Figura 8. Mecanismo de círculo rodante con intermediarios de RNA propuesto para la replicación viroidal. Tomado de Carbonell, 2008. En la parte izquierda se representa la forma asimétrica con un único círculo rodante correspondiente a la familia *Pospiviroidae*, localizada en el núcleo, donde una RNasa y una RNA

ligasa del hospedero median el corte de los intermediarios y la ligación de los resultantes respectivamente. Del lado derecho se encuentra la forma simétrica, con dos círculos rodantes correspondiente a la familia *Avsunviroidae*, llevada a cabo en el cloroplasto, donde los oligómeros viroidales se autocortan mediante ribozimas (Rz) generando RNAs lineales de longitud completa con extremos 5'OH y 2',3'-fosfodiéster que posiblemente son ligados por una RNA ligasa del hospedero o auto catalíticamente. Pol II y NEP representan a la RNA polimerasa II nuclear y a la RNA polimerasa cloroplástica, respectivamente.

Debido a que carecen de una cápside protectora cabría esperar que su material genético es muy susceptible a la degradación en el ambiente, sin embargo, su pequeño tamaño y estructura secundaria los protege, persistiendo en el ambiente durante el tiempo suficiente para ser transferidos a un nuevo hospedero la mayoría de los viroides son transmitidos por propagación vegetativa por parte de tejido infectado a plantas sanas y otros por insectos vectores (Cann, 2005).

Los síntomas de las plantas infectadas por viroides son similares a los ocasionados por virus. Las alteraciones más frecuentes incluyen: enanismo de la planta, clorosis, rugosidad y necrosis de las hojas y frutos, agrietamientos del tallo y de la corteza (Astier *et al.*, 2001).

Métodos de diagnóstico de virus y viroides

Para la detección de los virus, se toman en cuenta diversos criterios, prevaleciendo el de los síntomas observados en campo, sin embargo, resultan insuficientes ya que éstos pueden ser el resultado de la presencia de más de un virus que causen síntomas similares en el mismo cultivo (Chapman, 1991). Por lo que se han desarrollado diversas técnicas para el diagnóstico de un gran número de agentes virales.

Algunos métodos tienen ventajas inmediatas por lo rápido que permiten obtener resultados, sin embargo, existen otros que aunque resultan de gran utilidad biológica por facilitar el conocimiento de algunas de las propiedades de los virus, tienen grandes desventajas por el tiempo que toma obtener resultados. Algunos métodos son: transmisión mecánica (biobalística), transmisión por biovectores, microscopía

electrónica, para observar partículas virales o células del tejido infectadas, métodos serológicos como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (De la Torre *et al.*, 2003). La correcta identificación de un virus como agente causal en la planta, constituye un punto de partida importante para adoptar medidas adecuadas de control de virus (Conti *et al.*, 2001).

Entre las técnicas estándares para la detección de virus fitopatógenos, se encuentra el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (DAS-ELISA), el cual consiste en que el antígeno o el primer anticuerpo son fijados en un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente marcado con una enzima (conjugado). Se lava el exceso de conjugado y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato. El grado de transformación de un sustrato incoloro a un producto coloreado se determina por medio de un espectrofotómetro. Este método es relativamente barato, y muy sensible, además de que puede detectar bajas concentraciones de proteína viral (cápside viral) y es reproducible en un amplio rango de condiciones, sin embargo, la prueba tiene sus limitaciones, ya que es específica para el virus que se quiere detectar y pueden darse reacciones inespecíficas en función a la relación entre dos virus y no es factible para el caso de los viroides debido a la falta de proteínas.

El análisis molecular incluye técnicas que tienen la ventaja de ser pruebas sumamente precisas y sensibles para detectar virus y otros patógenos que se encuentran infectando plantas en bajas concentraciones (Dimmock *et al.*, 2007). Algunas de las técnicas utilizadas comúnmente para el diagnóstico de virus son: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Transcripción inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) (Cann, 2005), ya que permiten la amplificación de regiones específicas y altamente conservadas del genoma del virus de interés. Estos métodos pueden complementarse con la secuenciación del fragmento amplificado del virus y confirmar su identidad por comparación con secuencias similares disponibles en bases de datos como el GenBank, cabe destacar que este método es específico y muy sensible (De la Torre, 2003). Actualmente, el proceso de secuenciación es llevado a cabo con equipo automático especializado.

Para que la PCR y RT-PCR sean exitosas y se disminuya al máximo la posibilidad de detectar falsos negativos, es necesario contar con extractos de ácidos nucleicos (RNA, DNA) de buena calidad y cantidad. Para la extracción de RNA/DNA a partir de muestras de plantas infectadas, se pueden utilizar diferentes métodos, entre los que se encuentran Kits comerciales (Qiagen, MoBio, Sigma, Promega, entre otros) que son rápidos pero costosos, cuando se requiere hacer el diagnóstico de un alto número de muestras otros métodos podrían ser más económicos y eficientes para diagnosticar un virus, por ejemplo el método fenol/cloroformo (Hernández y Guzmán, 2013).

Se ha demostrado que el comportamiento viral y viroidal varía a través del tiempo, detectando a un virus en un cultivar en una temporada, sin embargo, su ausencia total o reducida en otra, aún se desconocen con exactitud los mecanismos que actúan en estos casos, algunos países han recurrido a la detección oportuna junto con estudios de incidencia de agentes virales a través de diferentes períodos de tiempo, que muestran el comportamiento de los patógenos en diferentes períodos de tiempo y pueden ser una herramienta eficaz para la creación de métodos de control fitosanitario (Wang *et al.*, 2008).

Principales virus que infectan al durazno

Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)

Pertenece a la familia *Bromoviridae*, género *Ilarvirus* y su genoma consiste en RNA de cadena simple de sentido positivo, tripartita, el RNA 1 y 2 codifican para proteasas, mientras que el RNA 3 codifica para la proteína del movimiento y de la cápside (Figura. 9).

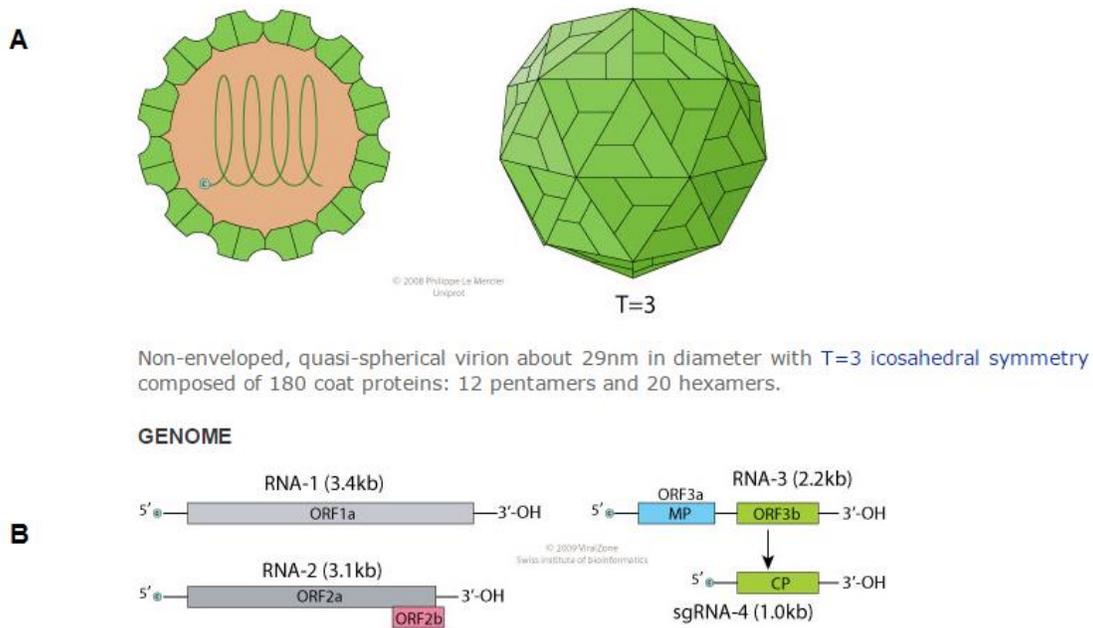


Figura 9. Estructura y composición genómica de *Iarvirus*. Virión no envuelto de simetría icosaédrica, su genoma es tripartita, el RNA 1 y 2 codifican para proteínas involucradas en la replicación, mientras que el RNA 3 codifica para la MP y CP. Tomado de ViralZone, 2015.

La sintomatología consiste en anillos cloróticos en el follaje, cambios en el color del fruto, retraso en la maduración así como necrosis y punteado de la corteza; en árboles adultos puede reducir el rendimiento hasta en un 47%, en viveros, la infección por este virus se manifiesta como reducción en el desarrollo de las plántulas. El virus puede ser transmitido por medio del polen o mediante materiales vegetativos, por lo que es importante un control en su detección (Velásquez, 2012). Conformar a uno de los virus de mayor distribución mundial que afecta al durazno, su presencia ha sido registrada en Canada, Estados Unidos, España, Chile, Uruguay, Brazil (Fiore *et al.*, 2008).

En México, fue detectada la presencia del PNRSV en muestras de huertas comerciales de durazno de los Estados de México, Morelos y Puebla (De la Torre *et al.*, 2014) mediante análisis electroforéticos de RNA-dc de origen viral obtenido del follaje con síntomas y RT-PCR utilizando cebadores específicos que amplifican un fragmento del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP) de 455 pb de este virus.

American plum line pattern virus (APLPV)

Género *Illavirus*, familia *Bromoviridae*. Fue reportado por primera vez en Norteamérica donde infectó cultivos de ciruela, durazno, cereza. Los síntomas que ocasiona son líneas cloróticas, mosaico y bandas en las hojas principalmente. Ha sido reportado en Canada y Estados Unidos. Como todos los *Illavirus*, posee conformación icosaédrica, con tres componentes genómicos de RNA (Figura 9) (Al Rwahnih *et al.*, 2004)

Peach mosaic virus (PcMV)

La enfermedad del mosaico del durazno fue observada por primera vez en Colorado y Texas en 1931 y el agente fue identificado como PcMV, clasificado dentro de los *Trichovirus*, el cual posee forma de varilla, con un tamaño que oscila entre 88 nm de longitud, 9.25 nm de ancho y con estriaciones de 3.47 nm (Figura 10). Su genoma consiste en RNA, con cuatro componentes. El RNA1 representa a la región replicativa del genoma, el RNA2 es asociado a la PM, el RNA3 codifica el gen de la CP. PcMV es serológicamente similar a *Cherry mottle leaf virus (CMLV)*, son los únicos integrantes de los *Trichovirus* que poseen un RNA extra, el RNA4. En publicaciones anteriores se han encargado de diseñar cebadores que codifican un fragmento del gen que codifica para la CP, para diferenciar entre CMLV y PcMV obteniendo un producto de 650 nt (James *et al.*, 2005), es transmitido por *Eriophyes insidiosus*. Los síntomas de esta enfermedad consisten en retardo de la foliación y crecimiento de la planta, moteado y deformidad de hojas y fruto (James, 1998).

Ha sido reportado en Arizona, Oklahoma, Utah y México, en el cual fue detectado en árboles de durazno, almendra y ciruela con síntomas desde el norte de Chihuahua, al sur de Michoacán y Puebla. Con las muestras infectadas se prepararon extractos que posteriormente se utilizaron para pruebas biológicas con el vector *Eriophyes insidiosus* y la corroboración de la infección por PcMV mediante Western-blot (Osorio y Rodríguez, 1995).

Cherry mottle leaf virus (CMLV)

Género *Trichovirus*, familia *Betaflexiviridae*. Posee cuatro componentes genómicos de RNA, tiene conformación de varilla con un tamaño que oscila entre 92 nm de longitud 9.89 de ancho (Figura 10). Es serológicamente similar al PcMV. Sin embargo difiere con el PcMV en la sintomatología. Infecta severamente a *Prunus* spp. Puede ser transmitido por *Eriophyes inaequalis*. Ha sido reportado en Oregon y Washington (Mekuria *et al.*, 2013).

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

Afecta principalmente a muchas especies de *Prunus*, y *Rosaceas*. ACLSV generalmente no induce síntomas en cultivos de manzana, sin embargo en cultivos sensibles ocasiona la malformación y reducción de la hoja, anillos cloróticos o patrones lineales. ACLSV pertenece al género *Trichovirus*, familia *Betaflexiviridae*, orden *Tymovirales*, todos los miembros de *Trichovirus* poseen conformación filamentosa (Figura 10) usualmente entre 12-13 nm y diámetro de 640-890 nm, su material genómico consiste en RNA de sentido positivo, cadena simple y linear (Keshavars y Shams, 2014).

Porcentajes elevados del ACLSV fueron reportados en cultivos de Inglaterra, Moldova, Estados Unidos, República Checa, Turquía y Tunisia.

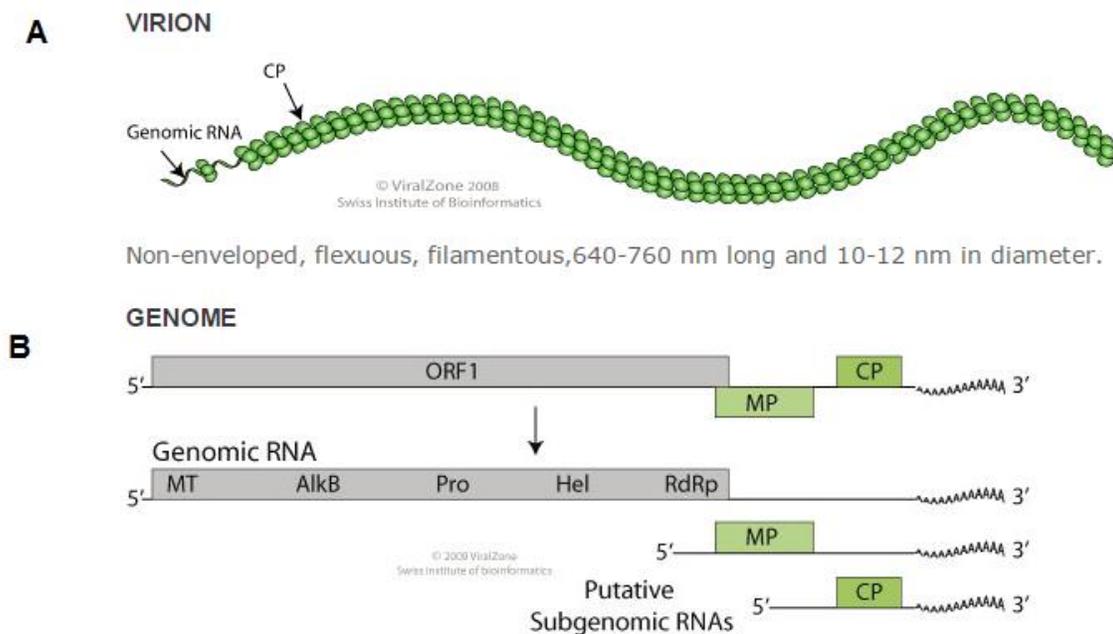


Figura 10. Virión y estructura genómica de *Trichovirus*. A) Virión de *Trichovirus*, no envuelto, filamentosos, oscila entre 640-760 nm de longitud y 10-12 nm de diámetro. B) Genoma de *Trichovirus*. Tomado de ViralZone, 2015.

Arabis mosaic virus (ArMV)

Pertenece al género *Nepovirus*, familia *Comoviridae*. Su cápside es icosaédrica con un diámetro de 28 nm (Figura 11) y su genoma es bipartita compuesto por RNA de cadena simple. Es uno de los *nepovirus* responsable de infecciones en uvas, fresas, cereza y durazno. Ha sido encontrado en Alemania, España, Estados Unidos (Abelleira *et al.*, 2010)

Peach rosette mosaic virus (PRMV)

Fue inicialmente descrito como una enfermedad del Durazno (*Prunus persica*), después se demostró que ocasionaba enfermedades en los cultivos de uva. Pertenece al género *Nepovirus* y familia *Comoviridae*. Es bipartita, de estructura icosaédrica y RNA de sentido positivo (Figura 11). Los síntomas que ocasiona son: malformación y mosaico de la hoja.

Ha sido reportado en Canadá y Estados Unidos (Dias y Cation, 2000)

Tomato ringspot virus (ToRSV)

Género *Nepovirus*, familia *Comoviridae*. Es uno de los virus económicamente más destructivos de árboles de frutales de hueso duro incluyendo durazno y almendra, también ha sido reportado en fresa, cereza, uva y plantas ornamentales, ha sido reportado en Estados Unidos, Alemania, Canadá, Turquía. De conformación icosaédrica, como todos los *Nepovirus* su genoma consiste en RNA (Figura 11).

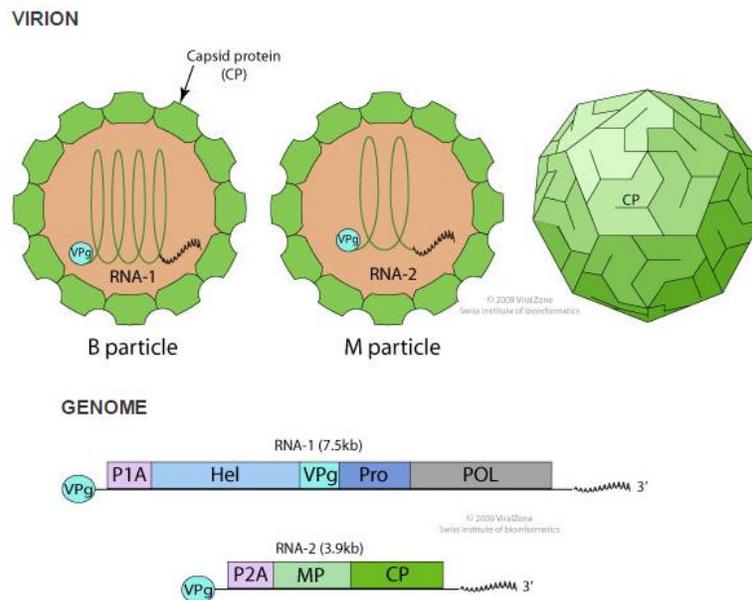


Figura 11. Virión y genoma de *Nepovirus*. Virus no envuelto, 28.20 nm de diámetro. Los RNAs genómicos son encapsidados separadamente dentro de dos tipos diferentes de partículas de tamaño similar. El genoma es bipartito, lineal, de sentido positivo. Tomado de ViralZone, 2015.

Principales viroides que infectan al durazno

Existen dos viroides que infectan árboles frutales de hueso duro, entre ellos el durazno, estos son: *Peach latent mosaic viroid (PLMVd)* y *Hop stunt viroid (HSVd)* (Hassan *et al.*, 2004).

Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVD)

Es el agente causal de la enfermedad del mosaico latente del durazno, se identificó inicialmente en Francia (Hassen *et al.*, 2005). Pertenece a la familia *Avsunviroidae* y al género *Pelamoviroid*, su genoma consiste en ssRNA de 337-400 nt adopta una estructura secundaria ramificada (Figura 12), en condiciones termodinámicamente estables, los extremos de las cadenas pueden formar estructuras en forma de cabeza de martillo (ribozimas). Su replicación es simétrica por el mecanismo de círculo rodante y es llevada a cabo en el cloroplasto (Carbonell, 2008).

Entre los síntomas que ocasiona se encuentran: retraso en la foliación, floración, maduración del fruto, deformación del fruto, necrosis, moteados, patrones lineales (Ambrós *et al.*, 1998). Es común encontrar al PLMVd en durazneros y nectarinas a nivel mundial (Jevremovic y Paunovic, 2014). Ha sido detectado en plantas de durazneros procedentes de Europa, Estados Unidos, China y Japón (Mavric y Virscek, 2012).

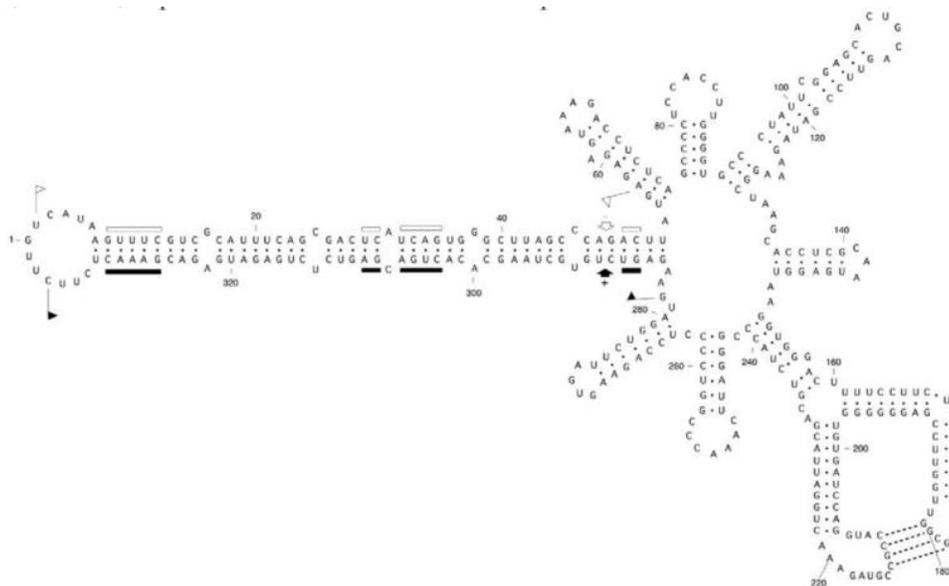


Figura 12. Conformación secundaria del PLMVd, en la cual existe el menor grado de gasto energético. Tomado de Delgado *et al.*, 2005.

Recientemente en México se obtuvo el primer registro de la presencia del PLMVd, en huertos de durazno ubicados en los estados de México, Morelos y Puebla (De la Torre, 2015), mediante análisis de hibridación molecular con ribosondas, seguido por pruebas por RT-PCR punto final para confirmar la identidad del mismo.

Hop stunt viroid (HSVD)

Pertenece a la familia *Pospiviroidae* y al género *Hostuviroid* con un tamaño de 297-300 nt (Figura 13), su forma de replicación es asimétrica y es llevada a cabo en el núcleo (Gorsane *et al.*, 2010). Es el viroide con el mayor número de huéspedes conocido hasta el momento. Se han detectado cepas de HSVd en cítricos, uvas, y pepino y frutas de hueso en Asia, América del Norte, Australia y Oriente Medio (DougDoug *et al.*, 2010). En México, existe el registro del HSVd, detectado en muestras obtenidas de municipios ubicados en Nuevo León y Tamaulipas a través de tres protocolos de RT-PCR punto final, obteniendo un total de 49% de muestras positivas (Guerrero *et al.*, 2013).

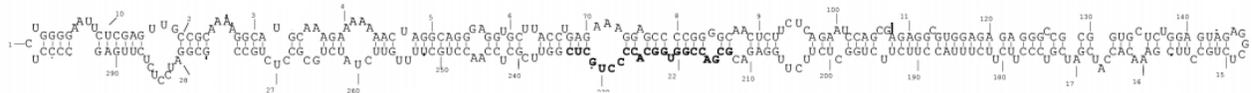


Figura 13. Estructura secundaria del HSVd, con un tamaño de 297-300 nt. Tomado de Gorsane *et al.*, 2010.

Justificación

Estado de México es uno de los principales productores de durazno en México, contribuyendo a la economía nacional. Dentro del mismo, se encuentra el municipio de Coatepec Harinas, que destaca por sus altos rendimientos y volúmenes de producción (Villegas y Mora, 2011).

Un estudio hecho en Coatepec Harinas, sobre la caracterización del productor de durazno reveló que se enfrentan a problemas técnicos como manejo agronómico,

tamaño de la huerta, falta de sitios para comercializar su producto y presencia de plantas enfermas que perjudican la calidad de las mismas (Larqué *et al.*, 2009).

Para garantizar un estado sanitario adecuado, son necesarias medidas fitosanitarias para el control de patógenos en plantas como *Prunus persica*, tales como la detección de patógenos a través de pruebas muy sensibles y específicas con uso muy frecuente como la RT-PCR, además de análisis estacionales para conocer el comportamiento de cada patógeno a través del tiempo en cultivos de durazno, ya que por su alta demanda y producción en el Estado de México, representa una fuerte pérdida económica para los productores.

HIPÓTESIS

Los daños observados en plantas de *Prunus persica* tales como: deformación de hojas, clorosis, patrones líneales, masaicismo y reducción del crecimiento de la planta están relacionados con la presencia de virus o viroides y la incidencia de los mismos fluctúa a través del tiempo.

OBJETIVO

Realizar la detección molecular y evaluar la incidencia de virus y viroides que infectan al durazno (*Prunus persica*) a través del tiempo en el municipio de Coatepec Harinas, Estado de México.

Objetivos particulares

- Detección de agentes virales y viroidales a través de RT-PCR.
- Identificación molecular de virus y viroides a partir de la secuenciación de productos de la RT-PCR y análisis comparativo de las mismas.
- Determinar la incidencia de virus y viroides durante los meses de Enero, Marzo, Junio, Agosto y Noviembre del 2014.

MATERIAL Y MÉTODO

Fueron realizados cinco recorridos a campo en huertas productoras de árboles de durazno localizadas en el municipio de Coatepec Harinas, Estado de México, durante los meses de Enero, Marzo, Junio, Agosto y Noviembre del año 2014. El número total de árboles muestreados fue de sesenta y fueron evaluados los mismos durante los cinco períodos de colecta.

Debido a que el durazno es un árbol caducifolio, los primeros cuatro muestreos consistieron en coleccionar las hojas de las plantas afectadas, que consistían de una tonalidad amarillenta o clorosis y defoliación (Figura 3), mientras que en Noviembre, debido a la falta de follaje, las muestras consistieron en la corteza de la planta.

Las muestras obtenidas fueron colocadas en bolsas de plástico, cerradas y almacenadas en el laboratorio de Microbiología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos localizada en la FES Iztacala, donde permanecieron a -20°C.

La extracción de ácidos nucleicos fue realizada mediante el método de extracción fenol-cloroformo (Guzmán y Guzmán, 2013) a partir de muestras con síntomas visibles.

Detección de virus por Transcripción Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) punto final

La RT-PCR fue efectuada en un solo paso, mediante el kit One-step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase usando RNA-dc de origen viral obtenido de plantas con síntomas descritos previamente, utilizando distintos pares de cebadores específicos para los principales virus y viroides que infectan al durazno (cuadro 3), que amplifican un fragmento conservado del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP) del PNRSV (Scott *et al.*, 1997), PcMV (James *et al.*, 2005) y todo el genoma en el caso del PLMVd y HSVd (Peiró *et al.*, 2012).

En experimentos previos realizados de 2008 al 2010 en el laboratorio de Fitopatología de la FES-I se indicó la posible presencia de un nuevo virus designado como “Tricomex” (posiblemente *Trichovirus*) relacionado con síntomas de moteado amarillo en hojas y ramas tiernas de durazno con en las localidades del Estado de México, Morelos y Puebla, para lo cual diseñaron cebadores (VP25/VP26) que amplifican un fragmento de la región NBP (Nuclear Binding Protein) y la UTR 3’ consiguiendo un amplicón de 509 nt (datos no publicados). En este trabajo, se le dio continuidad a esta información empleando el mismo conjunto de cebadores.

Cebador	Secuencia (5’-3’)	Longitud del fragmento (PB)
PNRSV C-537 PNRSV H83	ACGCGCAAAAGTGTGCAAATCTAAA TGGTCCCACTCAGAGCTCAACAAAG	455
PcMV F PcMV R	GGTTTTGCAATCATGAGA CATCAACCTCAGACTTTG	650
NBP 2025 NBP 2026	CACTCCCACTGGTTAGTT GGGCTTTGACCTGGCAGA	509
PLMVd F-1174 PLMVd R-1180	CACACTCGAGCAGGTACCGCCGTAGAA CACAGTCGTCGACCCCTCGGAACCA	340
HSVd dc HSVd dH	TCGGAAGAGCCAGAAGG TGAGACGCGACCGGTGG	250
TRSV F TRSVR	CTTGCGGCCCAAATCTATAA ACTTGTGCCAGGAGAGCTA	350
PM16 AFF CML-26R	CAAACATGGCTTTACCTTCTGCA AGATCCTCTTTCCCTTCTAAAATG	705
ArMV F ArMVR	GCTTCCTTTAGGGGGCATC CAACGTAGGAAGTTCACAG	517
APLPVF APLPVR	TCACCTTCTGCAGATACGAAGTA GCTGTTCTTCACAAAGAATCTA	383

Cuadro 3. Listado de cebadores empleados para la detección de virus y viroides en durazno de Coatepec Harinas, Estado de México durante el estudio.

Las reacciones para la RT-PCR fueron realizadas con un volumen total de reacción de 10 µl, adicionando en un tubo para PCR: 2.5 µl de H₂O libre de nucleasas, 2.5 µl de buffer de reacción 2X, 1 µl de la mezcla de oligonucleótidos específicos para PNRSV, PcMV, NBP, PLMVd y HSVd, 1 µl de PVP (40) 10%, 0.05 µl de inhibidor de RNasas, 0.3 µl de RT/Platinum Taq Mix y 0.5 µl de RNA muestra. Las condiciones de amplificación

para cada patógeno fueron las siguientes: para el PNRSV la temperatura de desnaturalización fue de 95°C, la temperatura de alineamiento de 53°C y la de elongación de 68°C, para el PcMV la temperatura de desnaturalización fue de 95°C, de alineamiento 55°C, la de elongación con 68°C, para el caso del Tricomex con 95°C, 54°C y 68°C, mientras que para el PLMVd y HSVD con 92°C, 52°C y 68°C respectivamente.

Los productos de la RT-PCR fueron analizados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% a 100 volts durante 35 min. a temperatura ambiente, usando buffer TBE, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y su peso molecular fue calculado por comparación con el marcador de peso molecular 1 Kb plus (GIBCO BRL) incluido en el mismo gel.

Secuenciación directa de productos de la RT-PCR punto final

Para la corroboración de que los fragmentos analizados por electroforesis en geles de agarosa eran los correspondientes a los fragmentos esperados, se empleó la secuenciación directa. Para la cual, las bandas obtenidas fueron cortadas del gel y limpiadas con el kit de Wizard (Wizard SV Gel y PCR clean-up System, PROMEGA). Los productos fueron analizados en un secuenciador Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer con el kit BIG DYE V. 3.1 y electroforesis capilar con pop 7 en el laboratorio de Bioquímica Molecular ubicado en la UBIPRO, FES-I, UNAM.

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las disponibles en el Gen Bank NCBI para los distintos virus y viroides del presente trabajo (PNRSV, PcMV, PLMVd), utilizando el programa Clustal ver. 2.2.

Se realizaron árboles filogenéticos empleando las secuencias parciales de la región de la CP de los aislados obtenidos y de los aislados de diferentes partes del mundo

presentes en el GenBank así como el alineamiento del genoma completo del viroide mediante el Programa Mega 6.

La tasa de incidencia para los distintos virus y el viroide fue calculada como el número de árboles infectados divididos entre el número total de árboles muestreados (Hassen et al., 2005)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se determinó la presencia del PNRSV por medio de la RT-PCR en 48 de 60 árboles muestreados, obteniendo un producto esperado de 455 pb (Figura 14 A y B) con los cebadores PNRSVC-537 y PNRSV-H83 (De la Torre, 2014) que corresponden a una región muy conservada y ubicada en el marco de lectura abierto de la CP del PNRSV, suficiente para confirmar con una alta probabilidad la presencia de este virus en las muestras analizadas (Untiveros *et al.*, 2010).

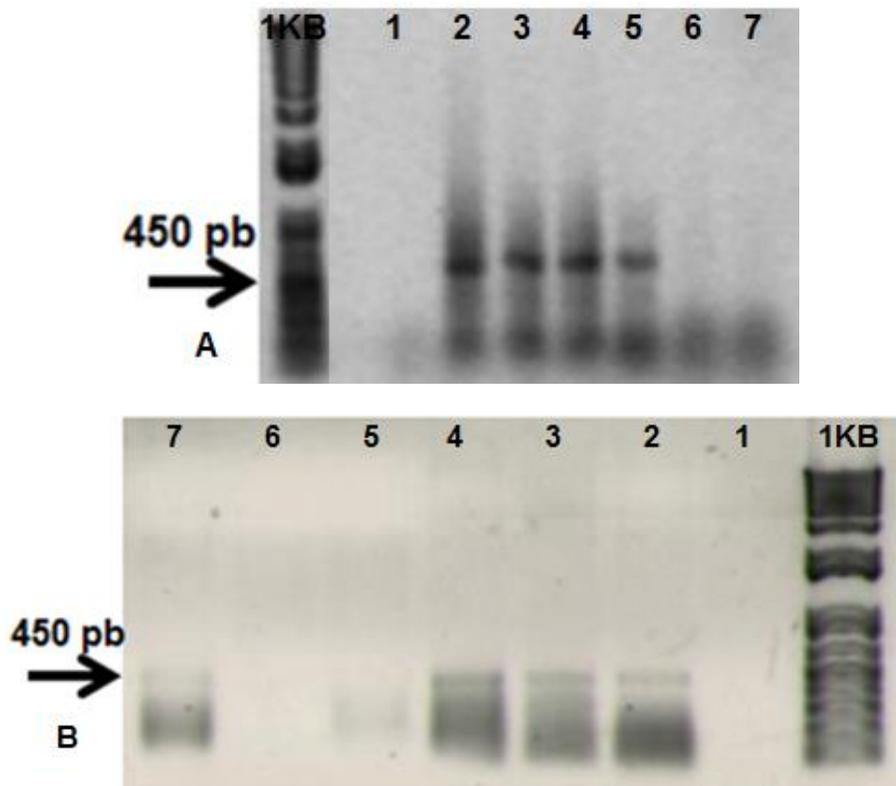


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de la RT-PCR obtenidos con los cebadores PNRV-H83 y PNRSV-C537, que amplifican un fragmento del gen que codifica para la CP, rindiendo un producto de 455 pb, infectando muestras de plantas de durazno cultivadas en Coatepec Harinas, Estado de México. No se aprecian en las dos imágenes patrones inespecíficos. 1KB (marcador de peso molecular usado como referencia) carriles 2, 3, 4 y 5 (Fig. A), carriles 2, 3 y 4 (Fig. B) muestras positivas para el PNRSV.

En el caso del PcMV, las reacciones por RT-PCR detectaron 38 árboles de 60 posiblemente infectados empleando los cebadores PcMV-F y PcMV-R que abarcan un fragmento del gen que codifica para la CP y el cual sirve para diferenciar entre el PcMV y CMLV, integrantes del género *Trichovirus* serológicamente similares, amplificando un producto muy marcado de 650 pb (Figura 15 A y B) (James *et al.*, 2005).

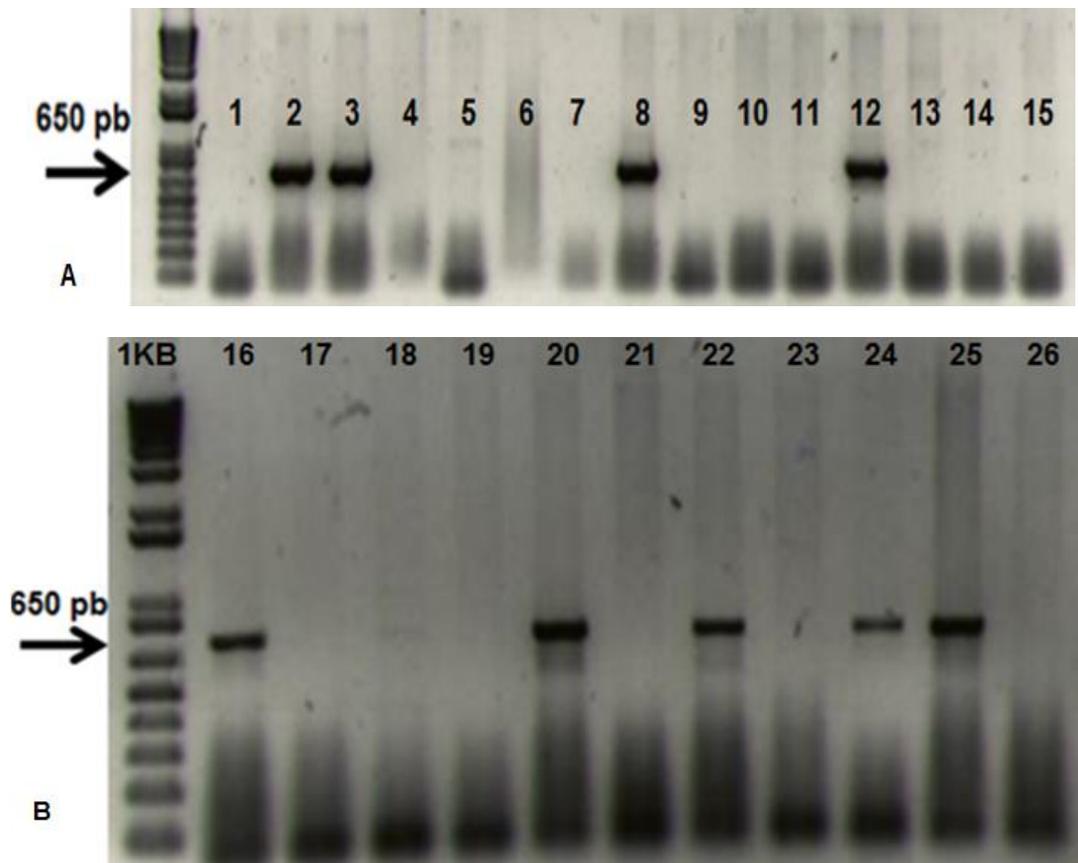


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de la RT-PCR obtenidos con los cebadores PcMV-F y PcMV-R, que amplifican un fragmento del gen que codifica para la CP, rindiendo un producto de 650 pb, infectando muestras de plantas de durazno cultivadas en Coatepec Harinas, Estado de México. No se aprecian en las dos imágenes patrones inespecíficos. 1KB (marcador de peso molecular usado como referencia) carriles 2, 3, 8, y 12 (Fig. A), carriles 16, 20, 22, 24 y 25 (Fig. B) muestras positivas para el PcMV.

A nivel mundial, es frecuente la presencia del PLMVd en durazno (Hadidi *et al.*, 2003), en el estudio fue detectado en 8 muestras de un total de 60 mediante los cebadores PLMVd F y R, amplificando el genoma completo de 3400 nt (Figura 16), además del fragmento esperado, se obtuvieron bandas inespecíficas especialmente con el tamaño de 600 pb, que podrían ser la forma dimérica del viroide (Delgado *et al.*, 2005).

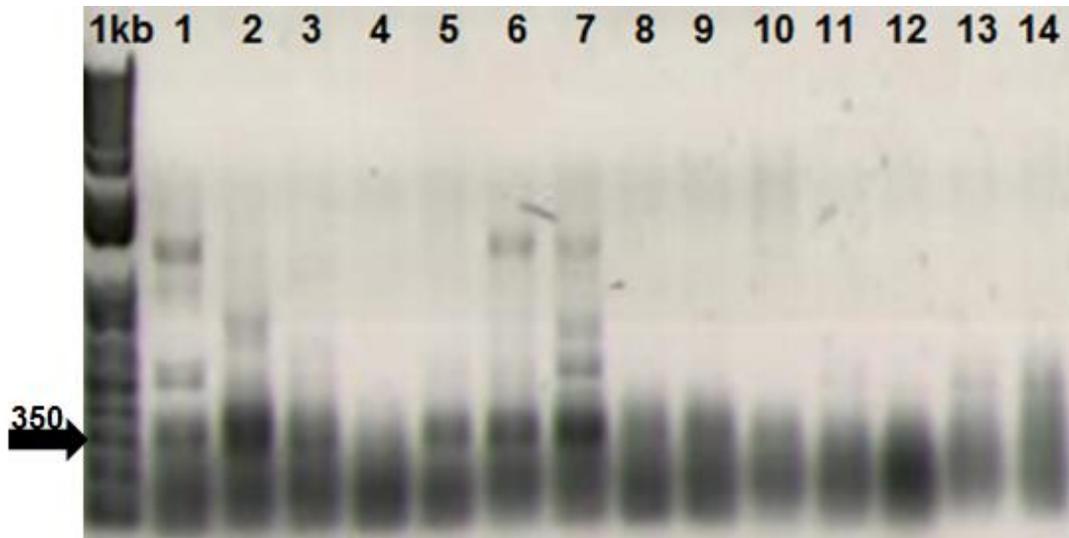


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de la RT-PCR obtenidos con los cebadores PLMVd-F y PLMVd-R, que amplifican el genoma completo obteniendo un amplicón de 337 nt, infectando muestras de plantas de durazno cultivadas en Coatepec Harinas, Estado de México. Se observan patrones inespecíficos. 1KB (marcador de peso molecular usado como referencia) carriles 1, 2, 3, 5, 6 y 7 muestras positivas para el PLMVd.

En la detección de algunas muestras del PNRSV y PLMVd, se observaron bandas muy tenues, (Figura 14 B y 16) lo cual podría señalar que hay diferentes concentraciones en la carga viral, siendo más bajas en varias muestras a comparación de otras, esto sugiere realizar un control de carga para corroborar lo anterior, otra posible explicación es la falta o elevada especificidad de los cebadores, tal es el caso de PMV-F y PMVR, empleados en estudios anteriores para la diferenciación entre PcmV y CLMV (Jamés *et al.*, 2005), obteniendo productos esperados muy marcados durante el estudio (Figura 15).

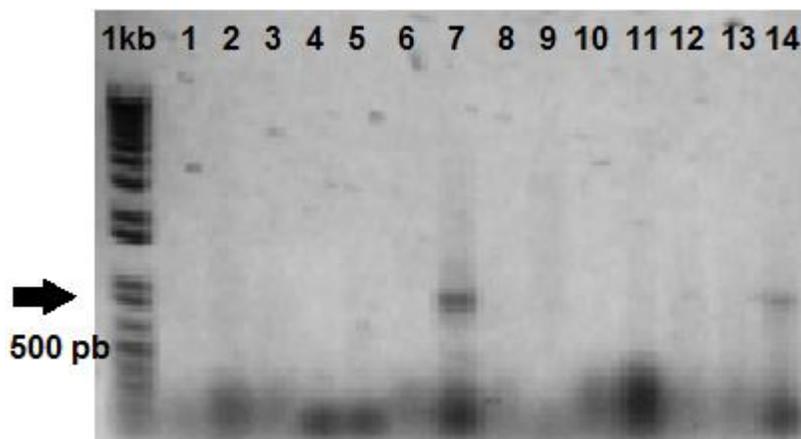


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de la RT-PCR obtenidos con los cebadores VP2025/VP2060, que amplifican un fragmento de la región NBP (Nuclear Binding Protein) y la UTR 3' rindiendo un amplicón de 509 nt infectando muestras de plantas de durazno cultivadas en Coatepec Harinas, Estado de México. 1KB (marcador de peso molecular usado como referencia) carriles 7 y 14 muestras positivas para el Tricomex.

En el caso del Tricomex, los cebadores empleados en los estudios previos, amplificaron productos de 509 nt que corresponden a un fragmento de la región NBP (Nuclear Binding Protein) y la UTR 3' en 7 de 60 muestras, lo que sugiere la posible presencia de este agente viral en los cultivos de Coatepec Harinas, Estado de México (Figura 17).

Secuenciación de los productos de RT-PCR de PNRSV, PcMV y PLMVd

Se obtuvieron secuencias parciales de los productos de la RT-PCR de aislados de PNRSV, PcMV y el viroide PLMVd sin embargo no fue el mismo caso para el Tricomex.

Las secuencias parciales obtenidas que corresponden a un fragmento del gen que codifica para la CP del PNRSV y PcMV confirmaron la identidad de los mismos al ser comparadas con secuencias del mismo fragmento de otros aislados disponibles en el GENBank/NCBI, indicando una homología del 99% para los aislados del PNRSV obtenidos Canada (83DQ983498.1) seguido de Polonia (DQ003584.2), Estados Unidos (AF465229.1), Nueva Zelanda (EF375717.1) y nuevamente Polonia (DQ983497.1).

En el caso del PcMV, los porcentajes de homología fueron del 84% con un aislado obtenido de Canadá (DQ117579.1), mientras que los restantes tuvieron menor porcentaje (79 y 78%), perteneciendo al CMLV (*Cherry mottle leaf virus*) registradas como AF170028.1, KC207480.1 y ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*) (78%) con los registros JN634760.1 y JN634761.1.

Mientras que el alineamiento de la secuencia del genoma completo del PLMVd arrojó porcentajes de homología desde 100-98% con aislados pertenecientes a Montenegro, Siberia, China y España, por el tamaño reducido del genoma completo del viroide, se realizó un análisis más profundo sobre su estructura primaria, mediante el programa Mega 6 con el alineamiento por Clustal W, donde resalta la longitud del genoma del PLMVd de Coatepec con 337 nt al compararla con otros aislados, el tamaño varío, lo que probablemente indica que la conservación del tamaño no es una característica específica de éste según se ha encontrado para otros viroides como el *Avocado Sunblotch viroid* (Kofalvi *et al.*, 1997), *Potato spindle tuber viroid* (Herold *et al.*, 1992). En el alineamiento se muestran las regiones conservadas implicadas en la formación de estructuras en forma de cabeza de martillo (caja roja y azul), así como los sitios de autoescisión presentes en todos los aislados (flecha) (Figura 18), es probable que la falta de variación de las mismas se deba a la relación estructura-función, implicada en el procesamiento auto catalítico, un paso clave en el mecanismo de replicación por círculo rodante (Ambrós *et al.*, 1998).

Por otra parte, la variabilidad de secuencias está restringida a una fracción relativamente pequeña en el genoma, sin embargo, no afectan a las regiones conservadas.

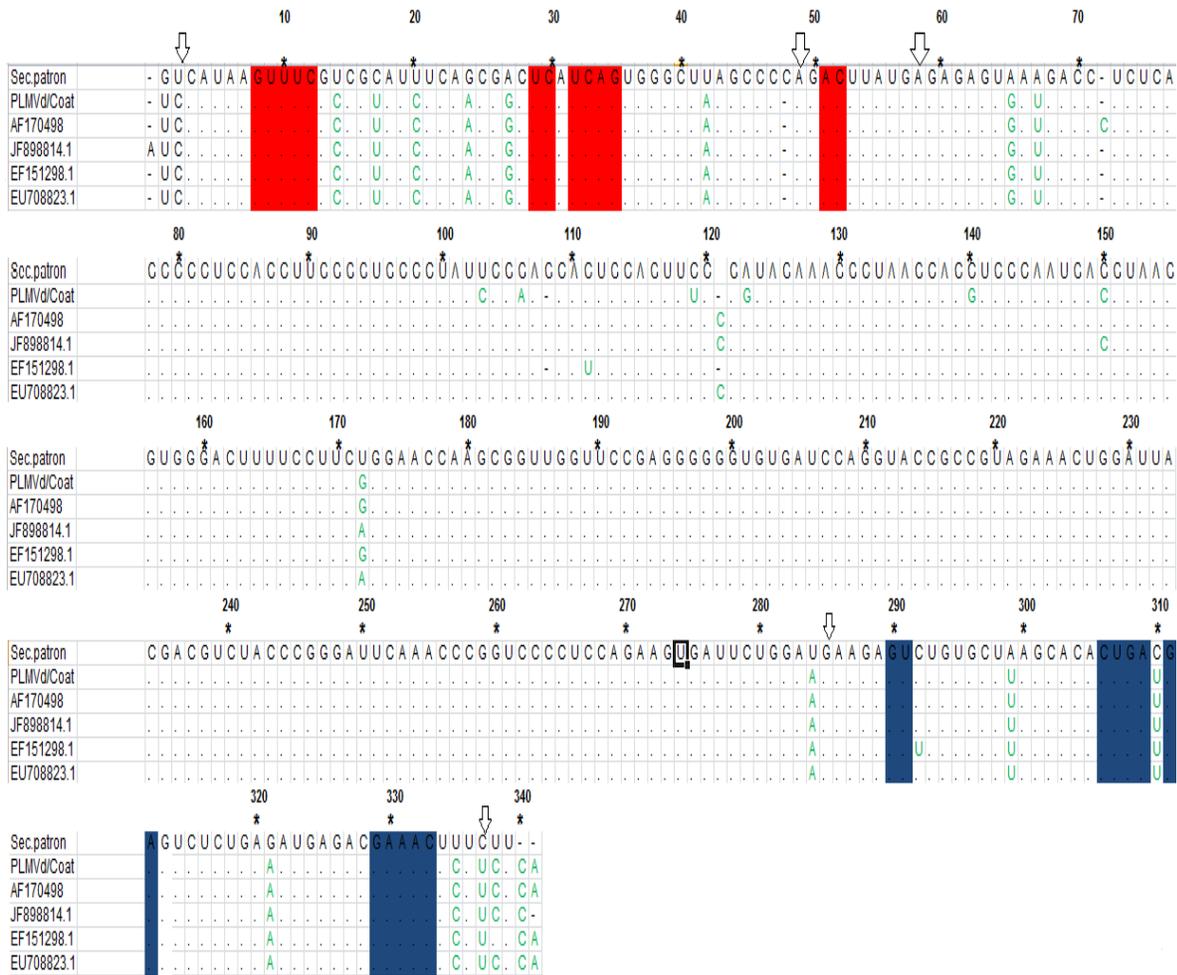


Figura 18. Alineamiento por CLUSTAL W de la secuencia obtenida del PLMVd en durazno de Coatepec Harinas, Estado de México (PLMVd/Coat) comparado con aislados procedentes de Canadá con 339 nt (AF170498), China con 339 nt (JF898814.1), Serbia con 337nt (EF151298.1), Turquía con 338 nt (EU708823.1) y la secuencia de referencia en la parte superior se incluye para fines de comparación. Los puntos indican residuos idénticos a la secuencia de referencia, los guiones denotan ausencia, los nucleótidos conservados en la formación de estructuras en forma de cabeza de martillo se encuentran sombreados de color rojo y azul, mientras que los sitios de auto escisión están representados por flechas, otras variaciones de nucleótidos presentes en los diferentes aislados están resaltados de color verde.

Análisis de las secuencias

El análisis filogenético mostró que la secuencia obtenida correspondiente al PNRSV-Coat, se encuentra más alejada de los otros aislados del PNRSV, a partir de esta se desglosan dos grupos, la secuencia EF375717.1 y los aislados restantes (Figura 19). En el caso de la secuencia obtenida del PcMV (PcMV-Coat) fue agrupada

con otro aislado del PcMV de Canada (DQ117579.1) y parecen estar emparentadas con aislados del ACLSV (JN634760.1 Y JN634761.1) (Figura 20). Por otra parte, el amplicón del PLMVd de Coatepec (PLMVd –Coat) no mostró diferencias significativas con otro aislado del mismo obtenido de Estados Unidos (EU888598.1) siendo agrupados y emparentados con la secuencia del aislado obtenido en Montenegro (JF927893.1) (Figura 21), en general, no se pudo determinar si los amplicones obtenidos son variantes de los virus y viroide debido a que se necesitaría realizar la clonación de los productos obtenidos y un mayor número de secuencias.

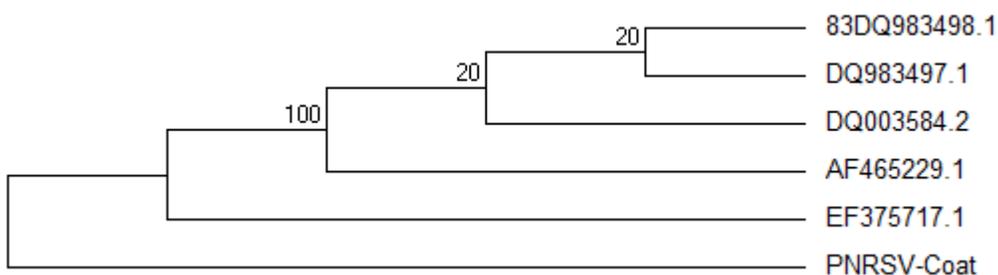


Figura 19. Árbol filogenético de la secuencia obtenida del PNRSV de Coatepec Harinas (PNRSV-Coat), Estado de México comparadas con la misma secuencia de aislados obtenidos de Polonia (DQ983498.1), (DQ983497.1), (DQ003584.2), Estados Unidos (AF465229.1), Nueva Zelanda (EF375717.1).

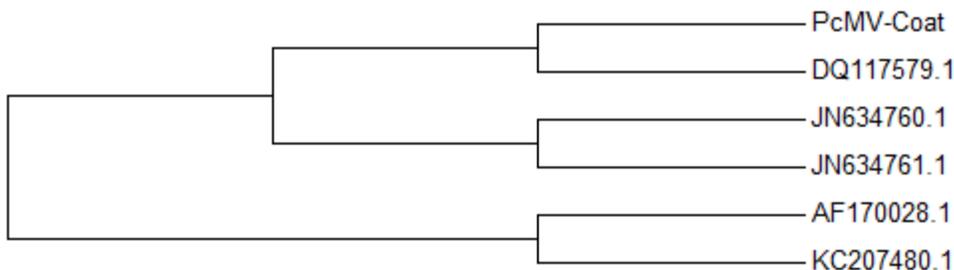


Figura 20. Árbol filogenético de la secuencia obtenida del PcMV de Coatepec Harinas (PcMV-Coat), Estado de México comparadas con el mismo fragmento de aislados del PcMV obtenidos de Canada (DQ117579.1), del CMLV obtenidos de China (AF170028.1) y de Estados Unidos (KC207480.1) y de aislados del ACLSV encontrados en China (JN634760.1) (JN634761.1).

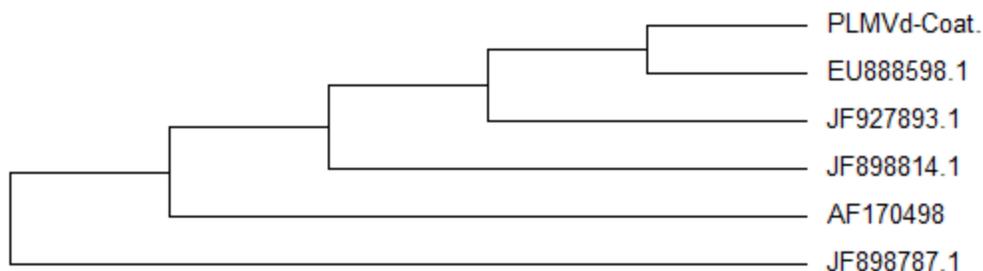


Figura 21. Árbol filogenético del genoma completo del PLMVd de Coatepec Harinas (PLMVd-Coat), Estado de México comparadas con secuencias de aislados del PLMVd obtenidos de Estados Unidos (EU888598.1), Montenegro (JF927893.1), China (JF898814.1) (JF898787.1) y Canadá (AF170498).

El PNRSV pertenece al género *Iarvirus* y el PcmV al *Trichovirus* y junto con *Potyvirus*, son los géneros que frecuentemente infectan a frutales de hueso duro como algunas especies de *Prunus* spp. (Jarosova y Kundu, 2010), afectando severamente el crecimiento, productividad y longevidad de las plantas infectadas (Cui *et al.*, 2012). El PNRSV es transmitido principalmente por injerto de material infectado a sano, contribuyendo a su rápida propagación y amplia distribución (Pallás *et al.*, 2012), el cultivo de *Prunus persica* pudo haber sido contagiado a través de transmisión mecánica por injerto. El PcMV es transmitido por su vector *Eriophyes insidiosus* y la presencia de éste ha sido reportada anteriormente en Michoacán y Estado de México (Gispert *et al.*, 1998), lo que sugiere que el cultivo de durazno pudo haberse contagiado de ésta manera. Entre los síntomas ocasionados por el PNRSV, se encuentran anillos cloróticos, moteados, líneas, mosaicismo, síntomas que pueden variar por temporadas y dependiendo del cultivo, pero también puede ser asintomático (Fiore *et al.*, 2008), el PcMV induce una variedad de síntomas durante el año como mosaicismo, retraso del follaje, clorosis sin embargo, también carecer de los mismos (Gisper *et al.*, 1998). El PLMVd, también ha demostrado que puede ser asintomático o inducir mosaicismo, bandas, necrosis (Jevremovic y Paunovic, 2014). En este trabajo, las muestras presentaron la mayoría de los síntomas anteriormente descritos, sin embargo, debido a la presencia simultánea de viral y viroidal, no se sabe con exactitud los síntomas ocasionados por cada patógeno, por lo que se recomienda realizar pruebas de patogenicidad por medio de inoculación mecánica de una planta con daños a plantas

sanas durante diferentes fechas, para poder determinar qué tipos de daños son ocasionados por el PNRSV, PcMV y PLMVd en *Prunus persicae*.

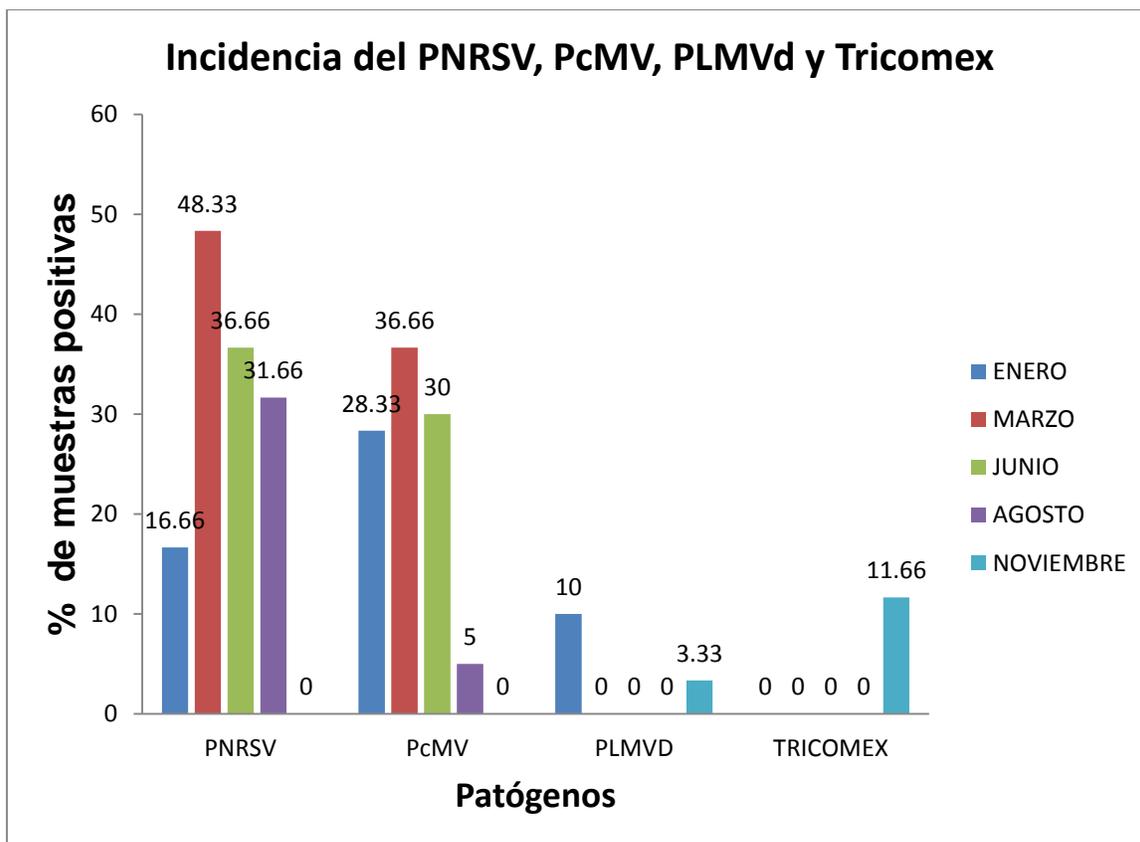


Figura 22. Porcentaje de incidencia viral y viroidal durante los 5 períodos de colecta. En el caso del PNRSV, el mayor porcentaje fue en Marzo (48.33), seguido por Junio (36.66), Agosto (31.66), Enero (16.66) y total ausencia en Noviembre. Para el PcMV, el mayor porcentaje fue en Marzo (36.66), seguido de Junio (30), posteriormente Enero (28.33), reducción en Agosto (5) y presencia nula en Noviembre. El posible agente viral sin descripción anterior (Tricomex) solo se presentó en el último período de colecta, Noviembre (11.66) y por último el PLMVd fue detectado en Enero (10) sin detectarse hasta el mes de Noviembre (3.33).

Incidencia viral y viroidal en diferentes períodos de tiempo

El PNRSV fue detectado en Enero, Marzo, Junio, Agosto, excepto Noviembre, el mismo comportamiento sucedió en el caso del PcMV, mientras que el viroide, se presentó únicamente en Enero y Noviembre y en el caso del Tricomex, solo se registró en Noviembre (Figura 22).

En investigaciones anteriores (Torrance y Dolby, 1984) han informado que la detección de *Ilarvirus* (PNRSV) depende de la distribución del virus en la planta, ya que se detectó mayormente en hojas jóvenes que en hojas maduras, esto concuerda con el trabajo, ya que en el mes de Enero comenzó la foliación obteniendo un 16.66% de incidencia, sin embargo, en el mes de Marzo prevalecían las hojas jóvenes obteniendo el porcentaje de incidencia más alto de todo el estudio (48.33%), mientras que en Junio y Agosto prevalecían las hojas maduras y se puede observar una reducción de la incidencia (36.66% y 31.66% respectivamente), lo que sugiere que la concentración de la carga viral puede estar sujeta a diferentes partes de la planta (Dal Zotto *et al.*, 1999; Yuyemoto *et al.*, 2003). El último mes de muestreo (Noviembre) contó con un porcentaje nulo esto puede ser debido al uso de corteza por la ausencia total de hojas y su difícil homogeneización, lo que sugiere realizar un estudio de detección viral sobre las diferentes partes de la planta como raíces, hojas, flores, corteza y fruto del *Prunus persicae*.

También se ha demostrado que la fluctuación de la temperatura puede ser un factor sobre la acumulación y replicación viral, ocasionando un mecanismo de silenciamiento específico para el RNA viral por parte de la planta, siendo activado a altas temperaturas (25-30°C) (Padmanaban *et al.*, 2005), lo que concuerda con el mes de Junio (25°C) (SMN, 2014) teniendo una disminución en el porcentaje de incidencia de 36.66%, mientras que Dal Zotto *et al.*, 1999; Salem *et al.*, 2004, reportan que la temperatura adecuada oscila entre 20-23 °C, tal es el caso de Enero con 19.2 °C y Marzo con 23.8°C (SMN, 2014) períodos donde iniciaba la detección y el porcentaje fue el mayor.

Por otro lado es el primer estudio sobre la incidencia en diferentes períodos de tiempo del PcMV en durazno y cualquier otra planta, se ha reportado que el PNRSV generalmente se encuentra acompañado infectando árboles de durazno con los géneros *Potyvirus* y *Trichovirus* (Jarosova y Kundu, 2010), de este último destaca el CMLV serológicamente similar con el PcMV, por lo que probablemente el PcMV pueda co-infectar con el PNRSV sugiriendo que los posibles mecanismos que intervienen en la incidencia del mismo posiblemente afecten de manera similar al PcMV, por lo que se recomiendan más estudios de detección simultánea de estos dos virus en durazno de otras regiones.

En el caso del PLMVd, el mes de Enero fue el de mayor porcentaje de incidencia con 10%, seguido por Noviembre con 3.33%, y total ausencia en Marzo, Junio y Agosto. Se ha reportado que en ocasiones el PLMVd suele ser asintomático o dependiendo de la variante causar síntomas específicos, sin embargo es frecuente la presencia de periodos de latencia antes de presentar síntomas, sin embargo aún se desconocen los mecanismos que intervienen en este proceso (Jevremovic y Paunovic, 2014). Puede ser posible que durante el estudio el viroide presentó un período de latencia, registrándose únicamente en el último y primer mes de muestreo.

El tricómex solo se presentó en Noviembre con 11.66%, sin embargo debido a la falta de secuencias no se puede afirmar que sea el patógeno y que comportamiento puede tener.

CONCLUSIONES

Fueron detectados mediante RT-PCR y posteriormente confirmados mediante secuenciación directa de los productos de la misma el PNRSV, PcMV y el PLMVd, por lo que podrían ser los agentes causales de la deformación de hojas, clorosis, patrones líneales, mosaicismo y reducción del crecimiento del durazno en cultivos en la región de Coatepec Harinas, Estado de México.

El porcentaje de incidencia varió para los virus y el viroide durante cada periodo, posiblemente por la carga viral en diferentes tejidos, e igualmente por los factores ambientales, como la temperatura.

PERSPECTIVAS

Se recomienda realizar pruebas de patogenicidad por medio de inoculación mecánica de cada virus (PNRSV, PcMV) y viroide (PLMVd) para poder determinar qué tipos de daños son ocasionados por cada uno sobre *Prunus persicae*. Así como realizar un estudio sobre carga viral en las diferentes partes de la planta como raíces, hojas, flores, corteza y fruto del *Prunus persicae* para conocer su distribución en la planta

BIBLIOGRAFÍA

Abelleira A., Mansilla J., Padilla V., Hita I., Cabaleiro C., Bertolini E., Olmos A., Legorburu F. 2010. First report of Arabis mosaic virus on Grapevine in Spai. 94(5): 635.

Agrios A. 1999. Fitopatología. México. Limusa. 838.

Al Rwahnih M., Myrta A., Herranz C., Pallás V. 2004. Monitoring American plum line pattern virus in plum by Elisa and dott-blot hybridization throughout the year. Journal of Plant Pathology. 86(2): 167-169.

Ambrós S., Hernández C., Desvignes J., Flores R. 1998. Genomic Structure of Three Phenotypically Different Isolates of *Peach Latent Mosaic Viroid*: Implications of the Existence of Constraints Limiting the Heterogeneity of Viroid Quasispecies. Journal of Virology. 72(9):7397.

Astier A., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., Lecoq H. 2007. Principles of Plant Virology. Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science Publishers. London. 3-33.

Cann J. A. 2005. Principios de virología molecular. ELSEVIER. España. 250.

Carbonell A. T. 2008. Resistencia a viroides inducida por enzimas de cabeza de martillo y RNAs interferentes. Tesis de doctorado. España. Universidad Politécnica de Valencia. 6-20.

Chapman H. 1991. Applied plant virology. Walkey. London. 140-159.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2000. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15021.pdf>.

Conti M., Gatelli D., Lisa V., Lovisolo O., Martelli G., Ragozzino A., Rana G., Volvas C. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi-Prensa. 11-56.

Cui H., Hong N., Wang A. 2012. Molecular characterization of two *Prunus necrotic ringspot virus* isolates from Canada. *Archives of Virology*. 157: 999-1001.

Dal Zotto A., Nome F., Di Rienzo J., Docampo D. 1999. Fluctuations of *Prunus necrotic Ringspot Virus* (PNRSV) a Various Phenological Stages in Peach Cultivars. *Plant Disease*. 83:1055-1057.

De la Torre A. R., Salazar S. M., Valverde A. R. 2003. Etiología del Moteado Amarillo del Tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* B.) en México. *Agrociencia* 37(3): 277-289.

De La Torre A. R. 2012. Enfermedades de origen viral en plantas cultivadas en México. Plaza y Valdés Editores. México. 13.

De La Torre A. R., Sánchez J., Pallás V. 2014. Detección del *Prunus necrotic ringspot virus* en durazno (*Prunus persica* (L.) en México y caracterización molecular de su componente RNA-3. *Agrociencia*. 48(6):584-598.

De La Torre A. R., Pallás V., Sánchez A. 2015. First report of *Peach latent mosaic viroid* in Peach trees from Mexico. *The American Phytopathology Society*. 99: 899.

Delgado S., Martínez A., Hernández C., Flores R. 2005. A short double-stranded RNA motif of *Peach latent mosaic viroid* contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *Journal of Virology*. 79(20): 12934-12943.

Dias H., Cation D. 2000. The characterization of a virus responsible for peach rosette mosaic and grape decline in Michigan. 54(11): 1228-1239.

Dimmock J., Easton J., Leppard N. 2007. *Introduction to Modern Virology*. Blackwell. United States. 28.

DougDoug K., Abdelkader H., Dawoud R., Reham E. 2010. Elimination of *Hop Stunt Viroid* (HSVd) from Infected Peach and pear Plants Using Cold Therapy and Chemotherapy. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 4(1): 54-60.

Fiore N., Thor V., Prodan S., Herranz C., Aparicio F., Montealegre J., Santiago E., Pallás V., Sánchez J. 2008. Genetic diversity of the movement and coat protein genes

of South American isolates of *Prunus necrotic ringspot virus*. Archives of Virology. 153(5): 909-919.

Flores R. 2011. Descendiendo la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida: los viroides. Virología. 14:39-47.

Gispert C., Oldfield N., Perring T., Creamer R. 1998. Biology of the Transmission of Peach mosaic virus by *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae). Plant Disease. 82(12): 1371-1374.

Gorsane F., Elleuch A., Hamdi I., Salhi-Hannachi A., Fakhfakh H. 2010. Molecular detection and characterization of *Hop stunt viroid* sequence variants from naturally infected pomegranate (*Punica granatum* L.) in Tunisia. Phytopathology. 49: 152-162.

Guerrero E., Alvarado O., Gutiérrez H., González R., Álvarez G., Rodríguez M. 2013. Detección por RT-PCR Punto Final y Tiempo Real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 31(1): 1-10.

Guzmán A., Guzmán B. 2013. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. Revista Colombiana de Biotecnología. 15(1): 91-96.

Hadidi A., Giunchedi L., Shamloul M., Poggi P., Amer M. 2003. Occurrence of *Peach Latent Mosaic Viroid* in Stone Fruits and its transmission with contaminated blades. Plant Disease. 81(2): 154-158.

Hassan M., Zouhar M., Rysanek P. 2004. Development of a PCR Method of *Peach Latent Mosaic Viroid* and *Hop Stunt Viroid* Detection for Certification of Planting Material. Acta de Horticultura. 657:391.

Hassen F., Roussel S., Kummert J., Fakhfakh H., Marrakchi M., Jijakli M. 2005. Detection and epidemiological characteristic of *Peach latent mosaic viroid* in Tunisia. Appl. Biol. Sci. 70(3): 115-127.

Herold T., Haas B., Singh R., Boucher A., Sanger H. 1992. Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Molecular Biology*. 19(4): 329-33.

Hernández G., Guzmán M. 2013. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1): 71-81.

Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral (IGECEM). 2011. Estadística Básica Municipal de Coatepec Harinas, Estado de México. Disponible en:

<http://iiigecem.edomex.gob.mx/recursos/Estadistica/PRODUCTOS/AGENDAESTADISTICA/CABASICAMUNICIPAL/ARCHIVOS/Zinacantepec.pdf>.

James D. 1998. Isolation and Partial Characterization of a Filamentous Virus Associated with Peach Mosaic Disease. *Plant Disease*. 82(8): 909-913.

James D., Croft H., Thompson D., Hayes S. 2005. Molecular Characterization, Phylogenetic Relationships, and Specific Detection of *Peach mosaic virus*. *Phytopathology*. 96(2): 137-144.

Jarosova J., Kundu K. 2010. Simultaneous detection of Stone fruit tree viruses by one-step multiplex RT-PCR. *Elsevier*. 125:68-72.

Jevremovic D., Paunovic S. 2014. Low incidence of *Peach latent mosaic viroid* in peach mother blocks in Serbia. *Pestic. Phytomedicine*. 29(2): 109-114.

Keshavarz T., Shams M. 2014. Incidence and distribution of Apple chlorotic leaf spot virus in the main fruit growing areas of Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 48(4): 306-312.

Kofalvi S., Marcos M., Cañizares V., Pallás V., Candresse T. 1997. Hop stunt viroid (HSVd) isolates. *Journal of Genetic Virology*. 78:3177-3186.

Larqué S., Sangerman J., Ramírez B., Navarro A., Serrano M. 2009. Aspectos técnicos y caracterización del productor de durazno en el Estado de México. *Agricultura Técnica Mexicana*. 35(3): 306.

Mavric P., Virscek M. 2012. First Report of *Peach latent mosaic viroid* in peaches Trees in Montenegro. *Plant disease*. 96(1):150.

Mekuria T., Druffel L., Susaimuthu J., Eastwell K. 2013. Complete nucleotide sequence of a strain of *Cherry mottle leaf virus* associated with peach wart disease in peach. *Archives of Virology*. 158(10): 2201-2203.

Osorio F., Rodríguez R. 1995. Incidence and Distribution of Peach Mosaic and Its Vector, *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae) in Mexico. *Plant Disease*. 79(2): 186-189.

Padmanabhan C., Ramachandran V., Ogbe F., Fauquet M. 2005. Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA silencing in plants. *Plant Physiology*. 138: 1828-1841.

Pallás V., Aparicio M., Herranz C., Amari K., Sánchez P., Myrta A. 2012. *Ilarviruses* of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees. *Phytopathology*. 102(5): 1108-1120.

Peiró A., Pallás V., Sánchez J. 2012. Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting Stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*. 132(4): 469-475

Salem N., Mansour A., Abdullah A., Aydah A. 2003. Seasonal variation of *Prunus necrotic ringspot virus* concentration in Almond, peach and plum cultivars. *Phytopathology Mediterranean*. 42: 155-160.

Salem N., Mansour A., Al-Musa A., Hammond R. 2004. Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. *Plant Pathology*. 96(2): 85-90.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN). 2014. Disponible en: http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=112

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2010. Información Técnica de durazno fresco mexicano para exportación. Disponible en: https://www.google.com.mx/?gws_rd=ssl#q=informaci%C3%B3n+t%C3%A9cnica+de+fruto+de+durazno

Scott S., Zimmerman M., Xin D., Mackenzie D. 1997. 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.

Schwentenius R., Sangerman D. 2014. Desempeño competitivo de la fruticultura mexicana, 1980-2011. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 5(2): 1277.

Torrance L., Dolby C. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunoabsorbent assay of three *Ilarviruses* in fruit trees. Annals of Applied Biology. 104(3):267-276.

Untiveros Z., Pérez E., Clover G. 2010. PCR assays for the detection of members of the genus *Ilarvirus* and family Bromoviridae. Elsevier. 165(1): 103-111.

Velásquez R. 2012. Presencia de virus en durazno, ciruelo y chabacano de los Estados de Zacatecas y Querétaro, México. Revista de Chapingo. 11(2): 103.

Villegas A., Mora A. 2011. Avances de la fruticultura en México. Revista Brasileña de Fruticultura. 33(1): 180.

ViralZone. 2015. Disponible en: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html

Wang Q., Wilmer J., Minna R., Yukimasa H., Valkonen T. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Molecular Plant Pathology. 9(2): 236-250.

Yuyemoto J., Bulluck R., Pethybridge S., McCorkell B., Asai K. 2003. Horizontal spread of *Ilarviruses* in young trees of several peach cultivars. Plant disease. 87(4): 75-77.