

DETECCIÓN DEL *Prunus necrotic ringspot virus* EN DURAZNO (*Prunus persica* (L.) EN MÉXICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SU COMPONENTE ARN-3

DETECTION OF *Prunus necrotic ringspot virus* FROM PEACH (*Prunus persica* (L.) IN MEXICO AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ITS RNA-3 COMPONENT

Rodolfo De La Torre-Almaraz^{1*}, Jesús Sánchez-Navarro², Vicente Pallás²

¹Laboratorio de Microbiología, Unidad de Biotecnología y Prototipos, FES-IZTACALA, UNAM. Avenida de los Barrios No. 1. 04090. Los Reyes, Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. (drodolfo@servidor.unam.mx). ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC. Avenida de los Naranjos s/n, E-46022 Valencia, España.

RESUMEN

Durante recorridos realizados de 2008 a 2012 en huertas comerciales de durazno en el Estado de México, estados de Morelos y Puebla, se observaron daños foliares de moteado amarillo, anillos cloróticos, patrones lineales y mosaico. Se transmitió mecánicamente un virus de macerados de hojas de durazno con daños de moteado amarillo, a plántulas de varias especies de tabaco causando manchas blanquecinas. En diagnósticos serológicos (DAS-ELISA) y de hibridación tipo dot-bot, utilizando ribosondas marcadas con digoxigenina, para la detección de seis virus que infectan al durazno, se detectó sólo al virus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV. Ilarvirus) en las muestras recolectadas con síntomas. El análisis electroforético de ARN-dc de origen viral, obtenido de follaje con síntomas, mostró tres bandas de 3.6, 2.5 y 1.8 Kbp de peso molecular, correspondientes al genoma del PNRSV. En todas las localidades se verificaron infecciones por PNRSV en plantas de durazno por secuenciación directa de productos de la RT-PCR, utilizando como moldes extractos de ARN-dc viral y oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento del gen de la proteína de la cápside de 455 pb de este virus. La identidad del PNRSV se confirmó mediante la clonación y determinación de la estructura primaria del ARN-3 del virus, que contiene los marcos de lectura abierta correspondientes a la proteína de movimiento (MP) y de la cápside (CP). La comparación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes al ARN-3 del PNRSV, con secuencias disponibles en la base de datos, mostró una identidad

ABSTRACT

During field observations from 2008 to 2012 in commercial peach orchards in the Estado de Mexico, states of Morelos and Puebla, leaf damage was observed in the form of yellow mottle, chlorotic rings, linear patterns and mosaic. A virus was transmitted mechanically with affected macerated peach leaves exhibiting yellow mottle to seedlings of several species of tobacco, resulting in whitish spots. In serological diagnoses (DAS-ELISA) and dot-bot type hybridization using riboprobes marked with digoxigenin for detection of six different viruses that infect peach, only the virus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV. Ilarvirus) was detected in the collected samples with symptoms. The electrophoretic analysis of viral ds-RNA obtained from foliage with symptoms showed three bands of 3.6, 2.5 and 1.8 Kbp, molecular weight corresponding to the PNRSV genome. In all of the localities infections by PNRSV were verified in peach plants by direct sequencing of RT-PCR final point products, using extracts of viral ds-RNA as molds and specific oligonucleotides that amplify a 455 pb fragment of the capsid protein gene of this virus. Identity of PNRSV was confirmed by cloning and determining the primary structure of the viral RNA-3 component, which contains the open reading frames corresponding to the movement protein (MP) and the capsid protein (CP). Comparison of nucleotide sequences and the corresponding sequences in amino acids with PNRSV sequences available in the Genbank database, showed 98 % and 100 %, similarity, respectively. Phylogenetic analyses grouped the three characterized isolates into groups PE5-III and PV32-I. Together, the data presented indicate that the variants of PNRSV in Mexico do not differ from other isolates previously reported, suggesting a probable common origin.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2013. Aprobado: agosto, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 583-598. 2014.

Key words: Yellow mottle, Ilarvirus, RT-PCR, diagnosis.

del 98 % y 100 %, respectivamente. Análisis filogenéticos agruparon los tres aislados caracterizados dentro de los grupos PE5-III y PV32-I. En conjunto, los datos presentados indican que las variantes de PNRSV caracterizadas en México, no difieren del resto de aislados previamente conocidos, señalando un probable origen común.

Palabras clave: Moteado amarillo, Ilarvirus, RT-PCR, diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

Desde 2005 se ha observado la presencia, incremento y distribución de daños foliares en plantas de durazno en diferentes localidades de el Estado de México, estados de Morelos y Puebla. Estos daños se caracterizan por moteados y mosaico de color amarillo en las hojas (Figura 1 A y B). Los moteados al crecer forman mosaicos y patrones lineales (Figura 1 C) o anillos irregulares (Figura 1 D). Los tejidos dañados se desprenden dejando perforaciones irregulares con márgenes necróticos. El follaje de las plantas afectadas adquiere una tonalidad amarillenta o clorosis y causa una defoliación severa. Los frutos pueden presentar manchas tenues anilladas de color rojizo y reducción del tamaño y color del fruto, así como un retraso en su madurez (observación personal del primer autor).

La causa de esos daños se desconoce y la revisión en el laboratorio con un microscopio estereoscópico del material vegetativo con síntomas recolectado en campo, no mostró la presencia de hongos, bacterias u otro tipo de organismo, por lo que se concluyó que estos pudieran ser causados por alguno de los múltiples virus y viroides que infectan al durazno en todo el mundo y que causan varios de los síntomas descritos (Cambra *et al.*, 2008). Por tanto, los objetivos de la presente contribución fueron la caracterización biológica y molecular de virus y viroides en durazno cultivado en el Estado de México, estados de Morelos y Puebla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Cien muestras (10 en cada localidad) de flores, hojas y ramas jóvenes de durazno, todas con síntomas de moteado amarillo, se recolectaron en huertas comerciales ubicadas en Coyutla de

INTRODUCTION

Since 2005, growing presence and distribution of leaf damage on peach trees in different localities of the Estado de Mexico, states of Morelos and Puebla has been observed. This damage is characterized by yellow mottle and mosaic on leaves (Figures 1A and 1B). When the mottles grow, they form mosaics and lined patterns (Figure 1) or irregular rings (Figure 1D). Damaged tissues detach and leave irregular perforations with necrotic edges. The foliage of the affected plants shows a yellowish tone, or chlorosis, and severe defoliation occurs. The fruits may have faint reddish rings, are smaller and their color diminished; ripening is also delayed (personal observation of the first author).

The cause of those damages is unknown and observation in the laboratory with a stereoscopic microscope of the plant material with symptoms collected in the field did not reveal the presence of fungi, bacteria or other type of organism, and therefore, it was concluded that the damage could be caused by one of the multiple viruses and viroids that infect peach worldwide and cause several of the symptoms described (Cambra *et al.*, 2008). Therefore, the objective of this contribution was to characterize, biologically and molecularly, the viruses and viroids in peach cultivated in the Estado de Mexico, states of Morelos and Puebla.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

One hundred samples (10 in each locality) of flowers, leaves and young branches, all with symptoms of yellow mottle, were collected from commercial peach orchards located in Coyutla de Benítez and Texcoco in the Estado de Mexico; Ocuítuco, Tetela del Volcán and San Miguel Tlacotepec in the state of Morelos; Domingo Arenas, Tepetzala, Tepetlaxco, San Pedro Coronango and San Martín Texmelucan in the state of Puebla. These areas are outstanding for their area, volume and quality of peach production. The samples, with maximum damage severity, were collected in August each year from 2008 to 2012, before harvest. The average summer temperatures in these areas vary from 24-28 °C (high) to 11-15 °C (low), and the days are rainy.



Figura 1. Síntomas de probable origen viral en hojas de durazno cultivado en México. A) Moteado amarillo; B) moteado y mosaico; C) mosaico y patrones; D) Anillos irregulares y moteados.
Figure 1. Symptoms of probable viral origin on peach leaves in orchards cultivated in Mexico. A) Yellow mottle; B) mottle and mosaic; C) mosaic and patterns; D) irregular mottled rings.

Benitez y Texcoco en el Estado de México; Ocuituco, Tétela del Volcán y San Miguel Tlacotepec ubicadas en el estado de Morelos; Domingo Arenas, Tepetzala, Tepetlaxco, San Pedro Coronango y San Martín Texmelucan en el estado de Puebla. Las zonas destacan por la superficie sembrada, volumen y calidad de la producción. Las muestras fueron recolectadas en agosto de cada año, desde 2008 a 2012, previo a la cosecha y con la máxima severidad de daños. Las temperaturas promedio en estas zonas durante el verano varían de 24 a 28 °C máximo y mínimas de 11 a 15 °C y días lluviosos.

Transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras

Para determinar la presencia de virus en las muestras de durazno se realizaron pruebas de transmisión mecánica a plantas indicadoras, macerando 1 g de corteza de ramas y hojas jóvenes en 10 mL de solución amortiguadora (NaPO_4 0.02 M, pH 7-DIECA) de cuatro muestras de la huerta Las Dalias, en San Pedro Coronango, Puebla, que mostraron la mayor severidad de síntomas de moteado amarillo. El macerado de cada muestra fue frotado, en forma independiente, en hojas de plántulas sanas de 11 especies indicadoras, previamente espolvoreadas con carborundum, usando un hisopo de algodón. Las hojas inoculadas fueron lavadas con agua para eliminar residuos del macerado y del carborundum. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero entre 25 y 35 °C, 70 % HR y 12 h luz/oscuridad esto hasta la aparición de síntomas. Las plántulas de las especies indicadoras inoculadas fueron tabaco (*Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyii* y *N. tabacum* var *Xanthi*), toloache (*Datura stramonium*), quelites (*Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*), gonfrena (*Gomphrena globosa*), chile (*Capsicum annuum* L.) y tomate (*Solanum esculentum* M.). La transmisión de virus se repitió tres veces, usando en cada ocasión muestras nuevas con síntomas de la misma parcela. Macerados de hojas de las plantas que mostraron síntomas

Mechanical transmission of the virus to indicator plants

To determine the presence of viruses in the peach samples, mechanical transmission tests to indicator plants were carried out. Four samples from Las Dalias in San Pedro Coronango, Puebla, exhibiting the greatest severity of yellow mottle were used. One gram of young branch bark and leaves of each sample was macerated in 10 mL of buffer solution (0.02 M NaPO_4 , pH 7-DIECA). With a cotton swab, macerate of each sample independently was rubbed onto leaves of healthy seedlings of 11 indicator plant species, which had been previously dusted with carborundum. The inoculated leaves were rinsed with water to eliminate residues of the macerate and carborundum. The inoculated plants were kept in a greenhouse (25-35 °C, 70 % RH and 12 h light/darkness) until symptoms appeared. The inoculated seedlings were of the following indicator species: tobacco (*Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. clevelandii*, *N. debneyii* and *N. tabacum* var *Xanthi*), jimson weed (*Datura stramonium*), lambsquarters (*Chenopodium amaranticolor* and *Ch. quinoa*), globe amaranth (*Gomphrena globosa*), chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Solanum esculentum* M.). Virus transmission was repeated three times, on each occasion using new samples from the same orchard. Macerates of plant leaves that showed symptoms were used to retransmit the virus by inoculating three series of healthy indicator seedlings, which were kept in the greenhouse under the same conditions until symptoms appeared (Dijkstra and De Jager, 1998).

Serological (DAS-ELISA) detection of viral protein

Detection of viral protein was accomplished with macerates of young branch bark and leaves (1 g 10 mL⁻¹ extraction buffer) of the 100 samples collected from all of the localities, using the technique solid phase double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), to be developed in 2 d with

se usaron para retransmitir virus, inoculando tres series de plántulas indicadoras sanas y conservadas en el invernadero bajo las mismas condiciones, hasta la aparición de síntomas (Dijkstra y De Jager, 1998).

Detección de proteína viral por serología (DAS-ELISA)

La detección de proteína viral se realizó con macerados de corteza de ramas y hojas jóvenes ($1 \text{ g } 10 \text{ mL}^{-1}$ de amortiguador de extracción) de las 100 muestras recolectadas de todas las localidades, utilizando la técnica de inmunoabsorción enzimática en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA), para desarrollarse en 2 d con antisueros policlonales comerciales específicos y siguiendo las instrucciones del fabricante (Agdia, Inc., Elkhart, IN) para *Apple mosaic virus* (ApMV. Bromoviridae), *Prunus dwarf virus* (PDV. Bromoviridae), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV. Bromoviridae), *Plum pox virus* (PPV. Potyviridae) y *Strawberry leaf ringspot virus* (SLRSV. Sadwavirus), algunos de los virus más comunes que afectan al durazno en el mundo (Brunt *et al.*, 1996). Las reacciones fueron consideradas positivas por observación visual directa de la intensidad en el cambio de color amarillo de los pocillos y por comparación con los testigos positivos incluidos en las mismas placas. No se utilizó ningún lector de absorbancia (Clark y Adams, 1977).

Análisis de ARN de doble cadena (ARN-dc) de origen viral

Para determinar la presencia de virus y sus componentes genómicos se realizó la extracción y análisis del ARN-dc viral de hojas de durazno de 10 muestras con síntomas de moteado amarillo y positivas para alguno de los antisueros probados. El ARN-dc se analizó por electroforesis en geles de poliácridamida al 6 %, usando un mini gel ($1.75 \text{ mm} \times 7 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$) montado en una cámara Biorad doble. El volumen del extracto de ARN-dc viral de las muestras fue $30 \mu\text{L}$ por carril y $20 \mu\text{L}$ de solución amortiguadora de carga. Las condiciones de electroforesis fueron 100 V por 2:30 h a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos con solución de bromuro de etidio y después con solución de nitrato de plata 0.011 M (Valverde *et al.*, 1990).

Hibridación molecular no radiactiva con ribosondas marcadas con digoxigenina

Para detectar infecciones por virus o viroides comunes en durazno, se realizaron pruebas de hibridación molecular del tipo dot-blot no radiactivo, con 10 muestras con síntomas de moteado amarillo y positivas para alguna de las pruebas serológicas,

specific commercial polyclonal antisera for *Apple mosaic virus* (ApMV. Bromoviridae), *Prunus dwarf virus* (PDV. Bromoviridae), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV. Bromoviridae), *Plum pox virus* (PPV. Potyviridae) and *Strawberry leaf ringspot virus* (SLRSV. Sadwavirus), following the instructions of the manufacturer (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA). Some of these are among the most common viruses that affect peach worldwide (Brunt *et al.*, 1996). The reactions were considered positive when intensity of change in the yellow color of the wells was detected by direct visual observation and by comparison with the positive controls included in the same plates. No absorbance reading was used (Clark and Adams, 1977).

Analysis of viral double chain RNA (ds-RNA)

To determine the presence of a virus and its genomic components, viral ds-RNA was extracted and analyzed using 10 samples of peach leaves exhibiting yellow mottle symptoms and testing positive for one of the assayed antisera. The ds-RNA was analyzed by electrophoresis in 6 % polyacrylamide gels using a mini gel ($1.75 \text{ mm} \times 7 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$) mounted on a double Biorad camera. Volume of the viral ds-RNA extract from the samples was $30 \mu\text{L}$ per track and $20 \mu\text{L}$ of load buffer solution. The electrophoretic conditions were 100 V for 2:30 h at room temperature. The gels were dyed with a solution of ethidium bromide and then with a solution of silver nitrate (0.011 M) (Valverde *et al.*, 1990).

Nonradioactive molecular hybridization with riboprobes marked with digoxigenin

To detect virus or viroid infections common in peach, nonradioactive dot-blot type molecular hybridization assays were performed with 10 samples exhibiting yellow mottle symptoms and testing positive for one of the serological assays, using riboprobes marked with digoxigenin (Roche), specific for detection of the peach viruses *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV. Closteroviridae), APLPV (*American plum line pattern virus*. Bromoviridae), PPV (*Plum pox virus*. Potyviridae) and PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*. Bromoviridae), and of the viroids HSVd (*Hop stunt viroid*. Pospiviroidae) and PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*. Asunviroidae) (Herranz *et al.*, 2005).

For the dot-blot assay, $10 \mu\text{L}$ ds-RNA per sample were denaturalized in a mixture with $6 \mu\text{L}$ SSC buffer (20x) and $4 \mu\text{L}$ formaldehyde (37 %) for 10 min at 65°C and cooled; $2 \mu\text{L}$ of the cooled mixture was transferred onto $2 \times 2 \text{ cm}$ squares marked on Hybond Nylon (+). As positive controls, $0.5 \mu\text{L}$ of the cloned product of the virus or viroid to be detected were added. Nucleic

utilizando ribosondas marcadas con digoxigenina (Roche), específicas para la detección de los virus o viroides de durazno: *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV, Closteroviridae), APLPV (*American plum line pattern virus*, Bromoviridae), PPV (*Plum pox virus*, Potyviridae), PNRSV (*Prunus necrotic ringspot virus*, Bromoviridae), HSVd (*Hop stunt viroid*, Pospiviroidae) y PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*, Asunviroidae) (Herranz *et al.*, 2005).

Para la prueba dot-blot se desnaturalizaron 10 µL ARN-dc, por muestra, en mezcla con 6 µL de amortiguador SSC (20x) y 4 µL de formaldehído (37 %) por 10 min a 65 °C. Se transfirieron 2 µL de la mezcla ya fría a cuadros de 1×1 cm marcados en membranas de Hybond Nylon (+) y como testigos positivos se adicionaron 0.5 µL de producto clonado del virus o viroide por detectar, fijando los ácidos nucleicos con luz ultravioleta por 3 min. Las membranas, una para cada virus o viroide, fueron pre-hibridadas e hibridadas a 68 °C usando la ribosonda Dig-UTP-T7. La reacción de hibridación se detectó por autorradiografía, utilizando películas X Ray (Kodak, USA) (Pallás *et al.*, 1998).

Detección de virus por pruebas de transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) punto final

Para verificar la presencia e identidad de los virus o viroides comunes que infectan al durazno, se realizaron pruebas de RT-PCR (siglas en inglés) punto final en cuatro muestras por localidad, en un solo paso (Super Scrip III One Step High-Fidelity, Invitro Gene, USA), usando como templado el ARN-dc obtenido de plantas con los daños de moteado amarillo en durazno. Los oligonucleótidos y condiciones de reacción específicos usados fueron para los virus PNRSV, PBNSPaV, APLPV, PPV, ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*), ApMV (*Apple mosaic virus*, Bromoviridae), PDV (*Prunus Dwarf virus*), PMV (*Peach Mosaic Virus*), TRSV (*Tomato ringspot virus*, Secoviridae), CMLV (*Cherry mottle leaf virus*, Betaflexiviridae), HSVd (*Hop stunt viroid*) y PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*) (Mackenzie *et al.*, 1997; Delano y Upton, 1999; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005).

Los productos de la RT-PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, en solución amortiguadora TBE 1x. Las condiciones de electroforesis fueron a 100 V por 20 min a temperatura de laboratorio. 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 (Invitro Gene) incluido en el mismo gel. Las muestras positivas se seleccionaron para futuras pruebas de confirmación de la identidad de los virus detectados.

acids were fixed with ultraviolet light for 3 min. The membranes, one for each virus or viroid, were pre-hybridized and hybridized at 68 °C using the riboprobe Dig-UTP-T7. The hybridization reaction was detected by autoradiography using X Ray film (Kodak, USA) (Pallás *et al.*, 1998).

Detection of viruses by reverse transcriptase linked to polymerase chain reaction (RT-PCR) final point

To verify the presence and identity of the viruses or viroids that commonly infect peach, final point RT-PCR single-step assays (Super Scrip III One Step High-Fidelity, Invitro Gene, USA) were conducted in four samples per locality, using ds-RNA obtained from peach plants with yellow mottle damage as template. The oligonucleotides and specific reaction conditions used were for the viruses PNRSV, PBNSPaV, APLPV, PPV, ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*), ApMV (*Apple mosaic virus*, Bromoviridae), PDV (*Prunus Dwarf virus*), PMV (*Peach Mosaic Virus*), TRSV (*Tomato ringspot virus*, Secoviridae), CMLV (*Cherry mottle leaf virus*, Betaflexiviridae), HSVd (*Hop stunt viroid*) and PLMVd (*Peach latent mosaic viroid*) (Mackenzie *et al.*, 1997; Delano and Upton, 1999; Sanchez-Navarro *et al.*, 2005).

The RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gels in TBE 1x buffer solution. The electrophoresis conditions were 100 V for 20 min at laboratory temperature. The gels were dyed with 0.5 % ethidium bromide and molecular weight was calculated by comparison with the molecular weight marker 1 Kb plus (Invitro Gene) included with the gel. The positive samples were selected for further assays to confirm identity of the detected viruses.

Direct nucleotide sequencing of RT-PCR products of a fragment of the PNRSV capsid protein

The evidence obtained with the serological assays (DAS-ELISA) and molecular hybridization indicated the presence of only PNRSV in the peach samples analyzed. For this reason, RT-PCR product sequencing assays were carried out specifically for this virus. Ten peach samples per locality, with yellow mottle symptoms, were analyzed for RT-PCR, using the oligonucleotides PNRSVF-C537 (5'-ACG CGC AAA AGT GTC GAA ATC TAA A-3') and PNRSVR-H83 (5'-TGG TCC CAC TCA GAG CTC AAC AAA G-3') (Mackenzie *et al.*, 1997), which amplified a well-preserved 455 pb region located in the open reading frame (ORF) of the PNRSV capsid protein (CP), sufficient to confirm high probability of the presence of this virus in the analyzed samples (Scott *et al.*, 1998; Untiveros *et al.*, 2010).

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

La evidencia obtenida con los ensayos serológicos (DAS-ELISA) e hibridación molecular indicó únicamente la presencia del PNRSV en las muestras de durazno analizadas, por lo que se realizaron pruebas de secuenciación de productos de RT-PCR específicos para este virus. Se analizaron por RT-PCR 10 muestras de durazno, por localidad, con síntomas de moteado amarillo, usando los oligonucleótidos PNRSVF-C537 (5'-ACG CGC AAA AGT GTC GAA ATC TAA A-3') y PNRSVR-H83 (5'-TGG TCC CAC TCA GAG CTC AAC AAA G-3') (MacKenzie *et al.*, 1997), que amplifican una región de 455 pb muy conservada y ubicada en el marco de lectura abierto (ORF; siglas en inglés) de la proteína de la cápside (CP) del PNRSV, suficiente para confirmar con una alta probabilidad, la presencia de este virus en las muestras analizadas (Scott *et al.*, 1998; Untiveros *et al.*, 2010).

Los productos de la RT-PCR del tamaño esperado fueron purificados del gel de agarosa (Wizar PCR, Promega, USA) y analizados directamente en un secuenciador Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon y compararon para su identificación con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el método Clustal W (DNA Star software, Madison, WI) y se depositaron en el GenBank para obtener su número de acceso (NCBI, 2012).

Caracterización del componente viral RNA-3 del PNRSV por clonación y secuenciación nucleotídica

Con el fin de confirmar la identidad del PNRSV se clonó y secuenció el componente ARN-3 completo de tres muestras, utilizando los productos de la RT-PCR obtenidos con la mezcla de los oligonucleótidos en sentido positivo (s) VP 970s 5'-CAC AAA GCT TGT TTT TAT ATG CCA GAA ATC GTA AC-3', VP 969s (5'-CAC AAA GCT TGT TGT TTT TAC CAA AAT GAA ATC GTA AC-3'), VP 968s 5'-CAC AAA GCT TGT TTT TAC AAT CGA AAT CGT AAC-3') y con el oligonucleótido en antisentido (as) VP 313as 5'-CAC ACT GCA GCT TCC CTA ACG GGG C-3', que permiten la amplificación completa del ARN-3. Los oligonucleótidos VP968, VP969 y VP970, se diseñaron para cubrir las variantes de secuencia observadas en el extremo 5' terminal del ARN-3.

Los productos de la RT-PCR de 1800 pb fueron purificados del gel de agarosa (Wizar PCR, Promega, USA), clonados en el vector pTZ57R (InsT/Aclone PCR, Fermentas) y secuenciados,

The RT-PCR products of the expected size were purified from the agarose gel (Wizar PCR, Promega, USA) and analyzed directly in a sequencer, Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer. The nucleotide sequences obtained were aligned, compared with sequences available in the GenBank database using the method Clustal W (DNA Star software, Madison, WI, USA) and deposited in the GenBank to obtain the access number (NCBI, 2012).

Characterization of the viral RNA-3 component of PNRSV by cloning and nucleotide sequencing

To confirm identity of PNRSV, the complete RNA-3 component of three samples were cloned and sequenced using the RT-PCR products obtained with the mixture of positive sense (s) oligonucleotides VP 970s 5'-CAC AAA GCT TGT TTT TAT ATG CCA GAA ATC GTA AC-3', VP 969s (5'-CAC AAA GCT TGT TGT TTT TAC CAA AAT GAA ATC GTA AC-3'), VP 968s 5'-CAC AAA GCT TGT TTT TAC AAT CGA AAT CGT AAC-3'), and with the antisense (as) oligonucleotide VP 313as 5'-CAC ACT GCA GCT TCC CTA ACG GGG C-3', which permit complete amplification of RNA-3. The oligonucleotides VP968, VP969 and VP970 were designed to cover the observed sequence variants at the 5' end point of the RNA-3.

The 1800 pb RT-PCR products were purified from the agarose gel (Wizar PCR, Promega, USA), cloned in the vector pTZ57R (InsT/Aclone PCR, Fermentas) and sequenced in both directions in an Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer. The nucleotide sequences obtained were assembled, reconstructing the complete RNA-3 component. The RNA-3 sequences of PNRSV of the different samples were used for alignment and comparison with similar PNRSV sequences available in the GenBank database, using the method Clustal W ver. 2.1 and to construct the respective dendrograms (DNA Star software, Madison, WI). The PNRSV consensus sequences of each sample were deposited in the GenBank to obtain access numbers.

RESULTS AND DISCUSSION

Mechanical transmission of virus to indicator plants

Transmission of a virus from the macerates of peach leaves with yellow mottle symptoms to several indicator plants was achieved. The virus related to peach yellow mottle caused large irregular whitish spots only on the inoculated leaves of the tobacco species (*Nicotiana tabacum* var *Xanthi*, *N. clevelandii*,

en ambas direcciones, en un equipo Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se ensamblaron, reconstruyendo el componente ARN-3 completo. Las secuencias del ARN-3 del PNRSV de las diferentes muestras, se utilizaron para su alineamiento y comparación con secuencias similares de PNRSV disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el método Clustal W ver. 2.1 y para construir los dendrogramas respectivos (DNA Star software, Madison, WI). Las secuencias consenso del PNRSV de cada muestra fueron depositadas en el GenBank para obtener su número de acceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras

Se logró transmitir un virus de los macerados de hojas de durazno con síntomas de moteado amarillo a varias plantas indicadoras. El virus relacionado con el moteado amarillo del durazno causó grandes manchas irregulares blanquecinas en las hojas inoculadas sólo en las especies de tabaco (*Nicotiana tabacum* var *Xanthi*, *N. clevelandii*, *N. benthamiana* y *N. debneyii*). En las plantas de chile y tomate, inoculadas con extractos de hojas de durazno con síntomas, se observaron manchas irregulares blanquecinas en las hojas inoculadas. Esto sugiere que no hay movimiento sistémico del virus. En las hojas inoculadas de *Gomphrena globosa* se observaron pequeñas lesiones locales necróticas, sin movimiento sistémico. En las demás plantas indicadoras no hubo síntomas o daños. El virus transmitido mecánicamente de hojas de durazno, con síntomas de moteado amarillo, tuvo un reducido rango de hospedantes y los síntomas observados desaparecieron rápidamente, por lo que fue difícil incrementar el virus para realizar pruebas biológicas adicionales, como pruebas de patogenicidad (postulados de Koch) o para su purificación o para su observación con el microscopio electrónico. No se realizaron pruebas de transmisión por injerto, ya que las plantas (portainjertos) producidas desde semillas en viveros comerciales, son injertadas con ramas de plantas con síntomas de mosaico amarillo, que impidió garantizar que las posibles plantas estuvieran libre de virus para realizar estas pruebas. Por tanto, es necesario considerar en futuras investigaciones otras plantas indicadoras, que permitan una infección sistémica

N. benthamiana and *N. debneyii*). On the leaves of chili and tomato plants inoculated with extracts of peach leaves with symptoms, irregular whitish spots were observed on the inoculated leaves. This suggests that there is no systemic movement of the virus. On the inoculated *Gomphrena globosa* leaves small localized necrotic lesions were observed with no systemic movement. In the rest of the indicator plants there were no symptoms or damages. The virus transmitted mechanically from yellow mottled peach leaves had a small range of hosts and the symptoms observed disappeared rapidly. For this reason, it was difficult to increase the virus to conduct additional biological assays, such as pathogenicity tests (Koch postulates) or to purify it or observe it with an electron microscope. Tests of transmission by grafting were not conducted since the plants (root stock) produced from seeds in commercial nurseries are grafted with branches of plants with yellow mottle symptoms; thus it is not possible to guarantee that the resulting plants would be free of the virus. Therefore, it is necessary to consider other indicator plants that would permit systemic infection to obtain purifications of the virus that infects peach in Mexico (Salem *et al.*, 2004).

Serological (DAS-ELISA) detection of viral protein

Only *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) was detected by serology in 80 % of the collected peach samples from all of the localities of the states of Mexico, Morelos and Puebla. Detection of PNRSV by DAS-ELISA was possible only when bark tissue from young branches and from leaves was used. When complete flowers and sepals or mature parts of leaves and branches were used, the DAS-ELISA results were negative. It was common to observe that the macerates of floral structures were quite viscous; this property may have affected serological detection of the virus. Another option for detection of this virus would be the use of pollen (Cole *et al.*, 1982), seeds or seedlings, when they are available, in which PNRSV has been shown to be present. Its presence in these structures explains its dispersion and wide geographic distribution (Mink and Aichele, 1984; Yuyemoto *et al.*, 2003; Pallás *et al.*, 2012). Moreover, it is likely that the differential distribution of the virus in different plant tissues alters the concentration

y obtener purificaciones del virus que infecta al durazno en México (Salem *et al.*, 2004).

Detección de proteína viral por serología (DAS-ELISA)

Solamente *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) fue detectado por serología en el 80 % de las muestras recolectadas de durazno de todas las localidades del Estado de México, estados de Morelos y Puebla. La detección de PNRSV por DAS-ELISA sólo fue posible cuando se usaron los tejidos de brotes jóvenes de corteza de ramas y hojas. Los resultados de DAS-ELISA fueron negativos cuando se usaron flores, sépalos o pétalos completos y partes maduras de hojas y ramas. Fue común observar que los macerados de estructuras florales eran demasiado viscosos, lo cual probablemente afectó la detección serológica del virus. Una alternativa para la detección de este virus sería usar polen (Cole *et al.*, 1982), semillas o plántulas, cuando estén disponibles, en los cuales se ha mostrado que el PNRSV está presente, lo que explica la dispersión y su amplia distribución geográfica (Mink y Aichele, 1984; Yuyemoto *et al.*, 2003; Pallás *et al.*, 2012). Además, es probable que la distribución diferencial del virus en los tejidos de la planta, altere la concentración de la proteína de la cápside en los tejidos utilizados, reduciendo la eficiencia de las pruebas de detección serológica. El PNRSV tiene diferente distribución en la planta según su estado fenológico, correlacionado con las condiciones ambientales (Dal Zotto *et al.*, 1999; Matic *et al.*, 2008), principalmente por las temperaturas durante el año, aspecto que se debe verificar en las localidades del Estado de México, estados de Puebla y Morelos, ya que las muestras usadas en el presente estudio fueron recolectadas en agosto, en plena madurez de frutos y previo a la cosecha.

Es necesario considerar que el 20 % de las muestras negativas para la presencia del PNRSV, mostraron moteado amarillo por lo cual es factible que el material recolectado se encuentre infectado por virus o viroides desconocidos, aún no descritos en México, comunes en durazno en otras regiones del mundo (Brunt *et al.*, 1996).

Análisis de ARN de doble cadena (ARN-dc) de origen viral

El análisis electroforético en geles de poliácridamida de ARN-dc de origen viral obtenido por

of the capsid protein in the tissue used and thereby reduces the efficiency of the serological assays. PNRSV is distributed differentially in the plant, depending on the plant's phenological stage, and correlated with environmental conditions (Dal Zotto *et al.*, 1999; Matic *et al.*, 2008), mainly temperatures that occur during the year. This aspect should be confirmed in the localities in the Estado de Mexico, states of Puebla and Morelos since the samples used in our study were collected in August just before the harvest when the fruits were fully ripe.

Moreover, 20 % of the samples that were negative for PNRSV exhibited yellow mottle. It is therefore possible that the materials collected are infected by an unknown virus or viroid that has not yet been described in Mexico but is common in peach in other regions of the world (Brunt *et al.*, 1996).

Analysis of viral double chain RNA (ds-RNA)

The electrophoretic analysis in polyacrylamide gels of viral ds-RNA obtained by cellulose columns consistently showed the presence of three bands of 3.6, 2.5 and 1.8 Kpb molecular weight (Figure 2, tracks A and D), similar to the electrophoretic patterns of PNRSV (Fulton, 1985). This type of band was visible in some samples and were very faint, or were not observed, in others despite the clear symptoms of yellow mottle (Figure 2, track C). In others, additional ds-RNA bands were observed, indicating the possible presence of other viruses mixed with PNRSV (Figure 2, track B). The diagnosis by electrophoretic analysis of RNA type virus, such as PNRSV, allows confirmation, with some degree of certainty, that the infections are viral, a single virus or mixed viruses. However, a low viral concentration in plant tissues significantly reduces efficiency of the technique, which may thus underestimate the incidence of a particular virus. Additional diagnostic techniques should therefore be considered (Valverde *et al.*, 1999).

Non-radioactive molecular hybridization with riboprobes marked with digoxigenin

In the analyzed samples hybridization marks corresponding to PNRSV were obtained. In some samples the marks for PBNSV and PLMVd were weak and non-conclusive (data not shown). Considering the number of viruses that affect peach

columnas de celulosa, mostró consistentemente la presencia de tres bandas de 3.6, 2.5 y 1.8 Kpb de peso molecular (Figura 2 carriles A y D), similares a los patrones electroforéticos del PNRSV (Fulton, 1985). Este tipo de bandas fueron visibles en algunas muestras y en otras fueron muy tenues o no se observaron a pesar de mostrar síntomas claros del moteado amarillo (Figura 2 carril C). En otras se observaron bandas de ARN-dc adicionales que indicaron la posible presencia de otros virus en mezcla con el PNRSV (Figura 2. carril B). El diagnóstico por análisis electroforético de virus del tipo ARN, como el PNRSV, permite confirmar con cierto grado de certeza infecciones virales simples o en mezcla; aunque una concentración viral baja en los tejidos de la planta reduce significativamente la eficiencia de esta técnica, subestimando la incidencia de un virus en particular, por tanto es necesario considerar técnicas adicionales de diagnóstico al análisis electroforético de ARN-dc (Valverde *et al.*, 1999).

Hibridación molecular no radiactiva con ribosondas marcadas con digoxigenina

En las muestras analizadas se obtuvieron marcas de hibridación correspondientes al PNRSV y en algunas se detectaron marcas débiles y no concluyentes para PBNSVaV y PLMVd (datos no mostrados). Al considerar el número de virus que afectan al durazno en el mundo es muy probable que en los materiales mexicanos existan otros virus o incluso viroides, que no fue posible de confirmar con esta técnica. Sin embargo, es necesario continuar con la detección de virus en durazno en diferentes épocas del año y con un mayor número de muestras, y usando diferentes tipos de tejidos o técnicas alternativas que permitan una mejor detección.

Detección de virus por pruebas de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) punto final

La presencia del PNRSV por RT-PCR se determinó en 90 % de las muestras recolectadas con los síntomas de moteado amarillo, obteniendo un producto de 455 pb (Figura 3, carriles C a F). En algunas muestras se obtuvieron señales tenues de los productos de la RT-PCR o bien fueron negativas, aún con síntomas de moteado amarillo (Figura 3,

worldwide, it is likely that in Mexican materials other viruses, or even viroids, are present, a possibility that cannot be confirmed with this technique. However, it is necessary to continue virus detection in peach at different times of the year with a larger number of samples and using different types of tissue, or alternative techniques that would enable better detection.

Detection of viruses by reverse transcription linked to polymerase chain reaction (RT-PCR) final point

Presence of PNRSV by RT-PCR was determined in 90 % of the collected samples with yellow mottle symptoms, obtaining a product of 455 pb (Figure 3, tracks C to F). In some samples the RT-PCR product signals were faint, or negative, even when the yellow mottle symptoms were present (Figure 3, tracks G and H, respectively). This indicates that the PNRSV RNA concentration may have differed in the collected samples (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998; Dal Zotto *et al.*, 1999; Yuyemoto *et al.*, 2003).

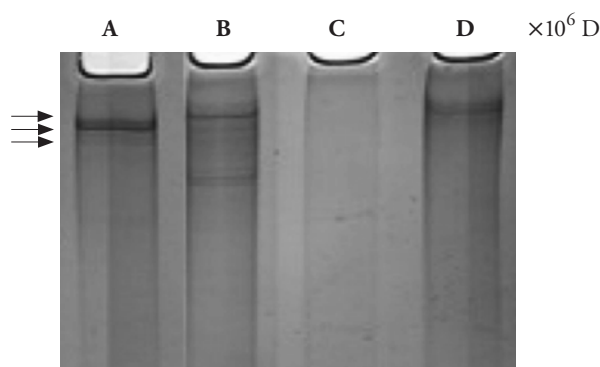


Figura 2. ARN-dc de origen viral obtenidos de plantas de durazno con síntomas de moteado y mosaico amarillo (electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % 2:30 hrs; 80 V; tinción con nitrato de plata). Carriles A y D) patrón electroforético de PNRSV. Carril B) PNRSV en mezcla con virus no identificados. Carril C) ARN-dc de hojas de durazno con síntomas virales, probablemente infectadas con virus en bajas concentraciones.

Figure 2. Viral ds-RNA obtained from peach trees with yellow mottle and mosaic symptoms (electrophoresis in 6 % polyacrylamide gels, 2:30 h; 80 V; dyed with silver nitrate). Tracks A and D) electrophoretic pattern of PNRSV. Track B) PNRSV mixed with unidentified viruses. Track C) RNA from peach leaves with viral symptoms, probably infected by virus in low concentrations.

carriles G y H, respectivamente), que indica que la concentración del ARN de PNRSV pudo ser diferente entre las muestras recolectadas (Sánchez-Navarro *et al.*, 1998; Dal Zotto *et al.*, 1999; Yuyemoto *et al.*, 2003).

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

Secuencias parciales directas y sus números de acceso se obtuvieron de los productos de la RT-PCR de PNRSV, el único virus detectado de muestras procedentes de las localidades de Ocuituco (Número de Acceso en el Genbank EF456764, EF456765, EF456766) y Tétela del Volcán (Número de Acceso en el Genbank EF456767, EF456768, EF456769, EF456770) del estado de Morelos; Domingo Arenas (Número de Acceso en el Genbank DQ979004), Tepetzala (Número de Acceso en el Genbank DQ979005), San Martín Texmelucan (Número de

Direct nucleotide sequencing of RT-PCR products of a fragment of the PNRSV capsid protein

Direct partial sequences and their access numbers were obtained from the RT-PCR products of PNRSV, the only virus detected in samples from the localities of Ocuituco (GenBank access number EF456764, EF456765, EF456766) and Tétela del Volcán (GenBank access number EF456767, EF456768, EF456769, EF456770) in the state of Morelos; Domingo Arenas (GenBank access number DQ979004), Tepetzala (GenBank access number DQ979005), San Martín Texmelucan (GenBank access number EF456771) and San Pedro Coronango (Las Dalias) in the state of Puebla. Comparison of the sequences obtained from the PNRSV isolates from peach cultivated in these regions of Mexico with those available in the GenBank confirmed the identity of this virus, showing a 94 % to 100 % similarity to isolates of the same virus present in other regions of the world, at least to the compared CP region, showing a possible common origin (Sánchez and Pallas, 1997; Scott *et al.*, 1998).

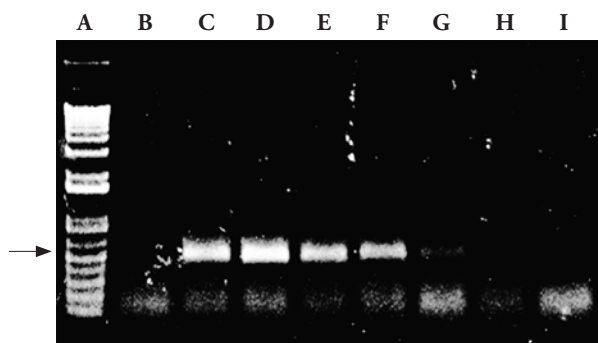


Figura 3. Productos de la RT-PCR obtenidos con los oligonucleótidos PNRSVF-C537 y PNRSVR-H83, que amplifican una región conservada del ORF de la proteína de la cápside del PNRSV (455 pb), infectando muestras de plantas de durazno cultivadas en Ocuituco y Tetela del Volcán, Morelos. Carril A) marcador PM 1 Kb. Carril B) muestra negativa. Carriles C a G) muestras positivas para PNRSV. Carril H) muestra negativa. I) testigo negativo (agua). (Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %).

Figure 3. RT-PCR products obtained with PNRSVF-C537 and PNRSVR-H83 oligonucleotides that amplify a preserved capsid protein ORF region (455 pb) of PNRSV infecting peach plants cultivated in Ocuituco and Tetela del Volcán, Morelos. Track A) PM 1 Kb marker. Track B) negative sample. Tracks C to G) samples positive for PNRSV. Track H) negative sample. I) negative control (water). (Electrophoresis in 1.0 % agarose gel).

Characterization of the viral RNA-3 component of PNRSV by cloning and nucleotide sequencing

The complete sequences of the RT-PCR product of 1800 pb were obtained. Sequenced in both directions and reconstructed, the sequences practically included the complete RNA-3 component of the three isolates from the state of Puebla: Las Dalias 5 (GenBank access number FJ546090), Las Dalias 11 (GenBank access number FJ546091) and Tepetlaxco 5 (GenBank access number FJ546092) (Figure 4. Panel B; tracks B, C and D).

The RNA-3 component of the Mexican PNRSV isolates, now reconstructed, consists of 1950 nucleotides (nt) and contains two *ORFs* separated by an non-coding inter-gene region (RI) of 75 nt. The *ORF* next to the 5' end of nt 852 codes a polypeptide of 283 amino acids (aa) that corresponds to the *ORF* of the movement protein (MP). The *ORF* next to the 3' end of nt 681 codes a 226 aa polypeptide corresponding to the capsid protein (CP) (Figure 4, panel A).

Acceso en el Genbank EF456771) y San Pedro Coronango (Las Dalias) del estado de Puebla. La comparación de las secuencias obtenidas de los aislados de PNRSV de durazno cultivado en estas regiones de México, con las disponibles en el GenBank, confirmaron la identidad de este virus por mostrar una similitud del 94 % al 100 % con aislados del mismo virus presentes en otras regiones del mundo, al menos con la región de la CP comparada y mostrando quizá un origen común (Sánchez y Pallas, 1997; Scott *et al.*, 1998).

Caracterización del componente viral ARN-3 del PNRSV por clonación y secuenciación nucleotídica

Se obtuvieron las secuencias completas del producto de la RT-PCR de 1800 pb, que secuenciado en ambos sentidos y reconstruido, prácticamente incluye el componente ARN-3 completo, de los tres aislados provenientes del estado de Puebla: Las Dalias 5 (Número de Acceso en el Genbank FJ546090), Las Dalias 11 (Número de Acceso en el Genbank FJ546091) y Tepetlaxco 5 (Número de Acceso en el Genbank FJ546092) todas del estado de Puebla (Figura 4. Panel B; carriles B, C y D).

El componente ARN-3 del PNRSV de los aislados Mexicanos, ya reconstruidos, consiste de 1950 nucleótidos (nt) y contiene dos *ORF*'s separados por una región intergenica (RI) de 75 nt no codificante. El *ORF* próximo al extremo 5' de 852 nt, codifica un polipeptido de 283 aminoácidos (aa) que corresponde al *ORF* de la proteína del movimiento (MP). El *ORF* próximo al extremo 3' de 681 nt, codifica un polipeptido de 226 aa correspondiente a la proteína de la cápside (CP) (Figura 4. Panel A).

Las secuencias nucleotídicas (nt) del ARN-3 de las muestras seleccionadas y sus productos de traducción (aa) fueron comparadas con secuencias similares disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank (NCBI, 2012), señalando una identidad del 98 % y 100 %, respectivamente, con variantes del PNRSV.

El análisis filogenético, utilizando todas las secuencias de PNRSV disponibles en la base de datos disponibles en el GenBank (NCBI, 2012), reveló que los tres aislados de PNRSV caracterizados se agruparon dentro de los grupos PV32-I y PE5-III, previamente descritos, para MP (Figura 5) y la CP (Figura 6), mostrando poca variabilidad y alta similitud,

The nucleotide sequences (nt) of RNA-3 of selected samples and their translation products (aa) were compared with similar sequences available in the database of the NCBI/GenBank (NCBI, 2012); 98 % and 100 % identity, respectively, with variants of PNRSV was found.

The phylogenetic analysis, using all of the PNRSV sequences available in the database of the GenBank (NCBI, 2012), revealed that the three characterized PNRSV isolates were grouped in groups PV32-I and PE5-III, previously described for MP (Figure 5) and CP (Figure 6), showing little variability and high similarity, indicating that the PNRSV and its isolates

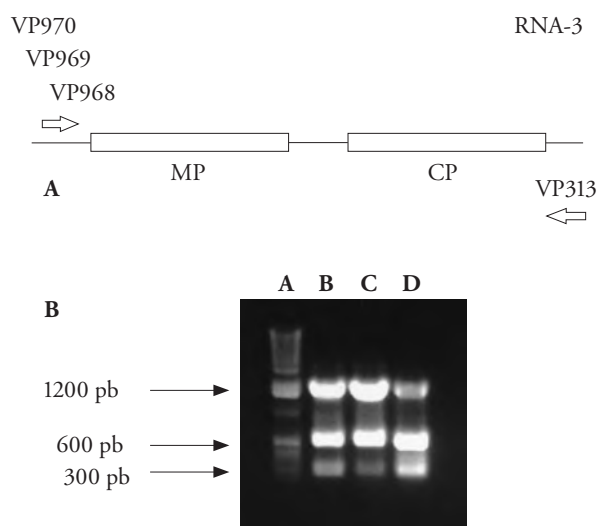


Figura 4. A) Mapa genómico del componente RNA-3 del *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) mostrando la ubicación de los genes de la proteína del movimiento (MP) y de la proteína de la cápside (CP) y la localización de los oligonucleótidos usados para la rt-PCR, clonación y secuenciación de los aislados de PNRSV. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados de las diferentes regiones del componente RNA-3 de aislados del PNRSV. Carril A) marcador PM 1 kb. Carril B) Las Dalias, aislado 5. Carril C) Las Dalias, aislado 11. Carril D) Tepetlaxco, aislado 5.

Figure 4. A) Genome map of the RNA-3 component of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) showing the location of the movement protein (MP) and capsid protein (CP) genes and the location of the oligonucleotides used for the RT-PCR, cloning and sequencing of PNRSV isolates. B) Electrophoresis in 1 % agarose gel of the products amplified in different regions of the RNA-3 component of PNRSV isolates. Track A) PM 1 kb marker. Track B) Las Dalias, isolate 5. Track C) Las Dalias, isolate 11. Track D) Tepetlaxco, isolate 5.

indicando que el PNRSV y sus aislados encontrados en las regiones del Estado de México, estados de Puebla y Morelos, podrían tener un origen geográfico común (Sánchez y Pallás, 1997; Scott *et al.*, 1998; Sala y Paduch, 2013).

El *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) pertenece al género *Ilarvirus* el cual junto a *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* y *Oleavirus* constituyen

found in the Estado de Mexico, states of Puebla and Morelos, may have a common geographic origin (Sánchez and Pallás, 1997; Scott *et al.*, 1998; Sala and Paduch, 2013).

Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) belongs to the genus *Ilarvirus*, which, together with *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* and *Oleavirus*, constitute the *Bromoviridae* family (Fulton, 1985; Brunt *et*

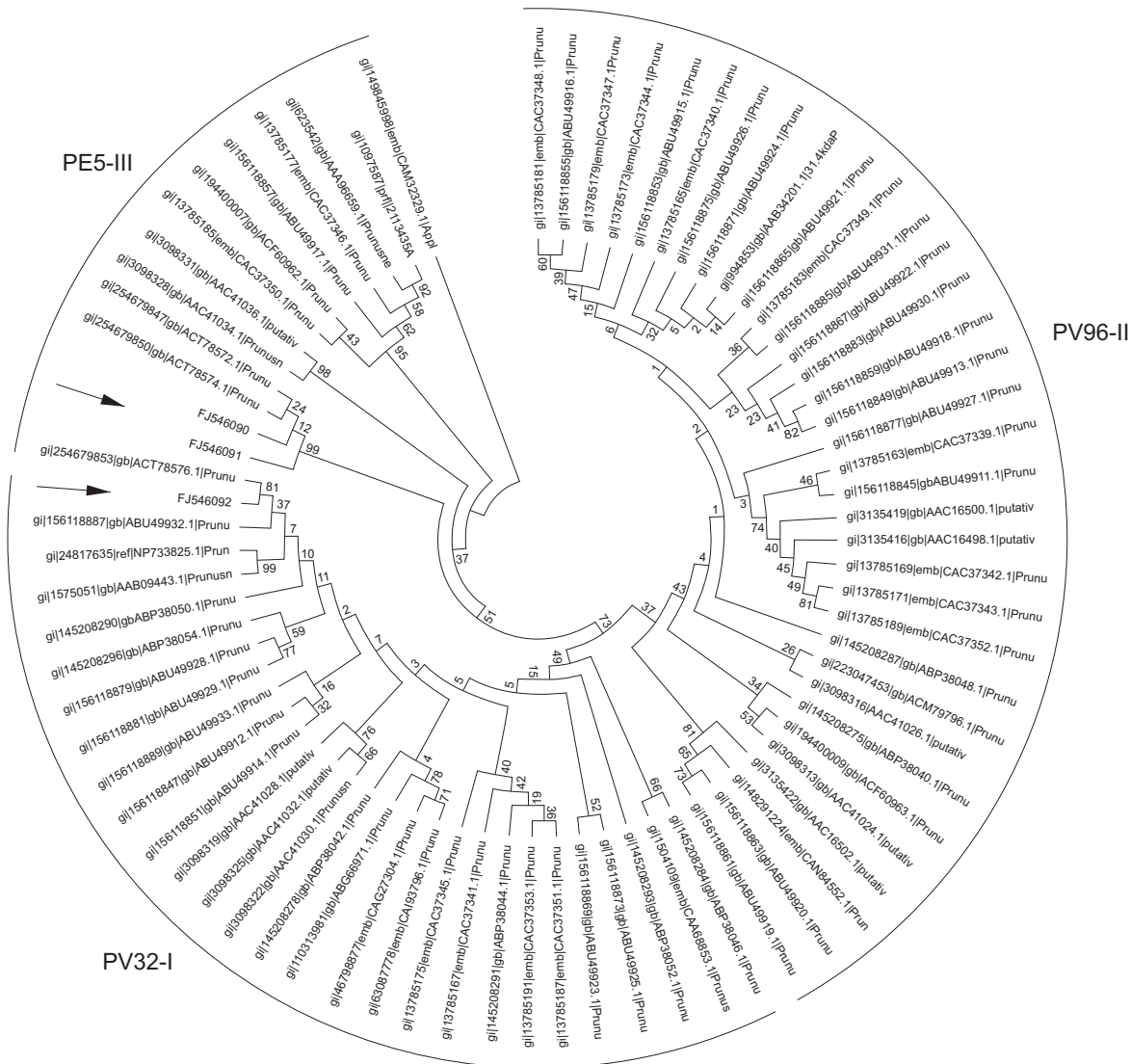


Figura 5. Dendrograma de las secuencias del ORF de la proteína del movimiento (MP) de tres aislados mexicanos de PNRSV (indicados con flecha), indica una alta similitud con secuencias del mismo virus disponibles en el Genbank (NCBI) con las que se comparó.

Figure 5. Dendrogram of the ORF sequences of the movement protein (MP) of three Mexican PNRSV isolates (indicated with arrows), revealing high similarity to sequences of the same virus available in the GenBank (NCBI) with which they were compared.

la familia Bromoviridae (Fulton, 1985; Brunt *et al.*, 1996; Pallás *et al.*, 2012) y es uno de los patógenos más frecuentes en frutales de hueso, que afecta severamente el crecimiento, productividad y longevidad de las plantas infectadas (Pusey y Yadava, 1991; Hammond y Crosslin, 1998; Cui *et al.*, 2012).

El PNRSV es transmitido principalmente por injerto de material infectado a sano, que contribuyen

al., 1996; Pallás *et al.*, 2012) and is one of the most frequent pathogens of stone fruits, severely affecting growth, productivity and longevity of the infected plants (Pusey and Yadava, 1991; Hammond and Crosslin, 1998; Cui *et al.*, 2012).

PNRSV is transmitted mainly by grafting infected material onto healthy plants, contributing to its rapid propagation and worldwide distribution,

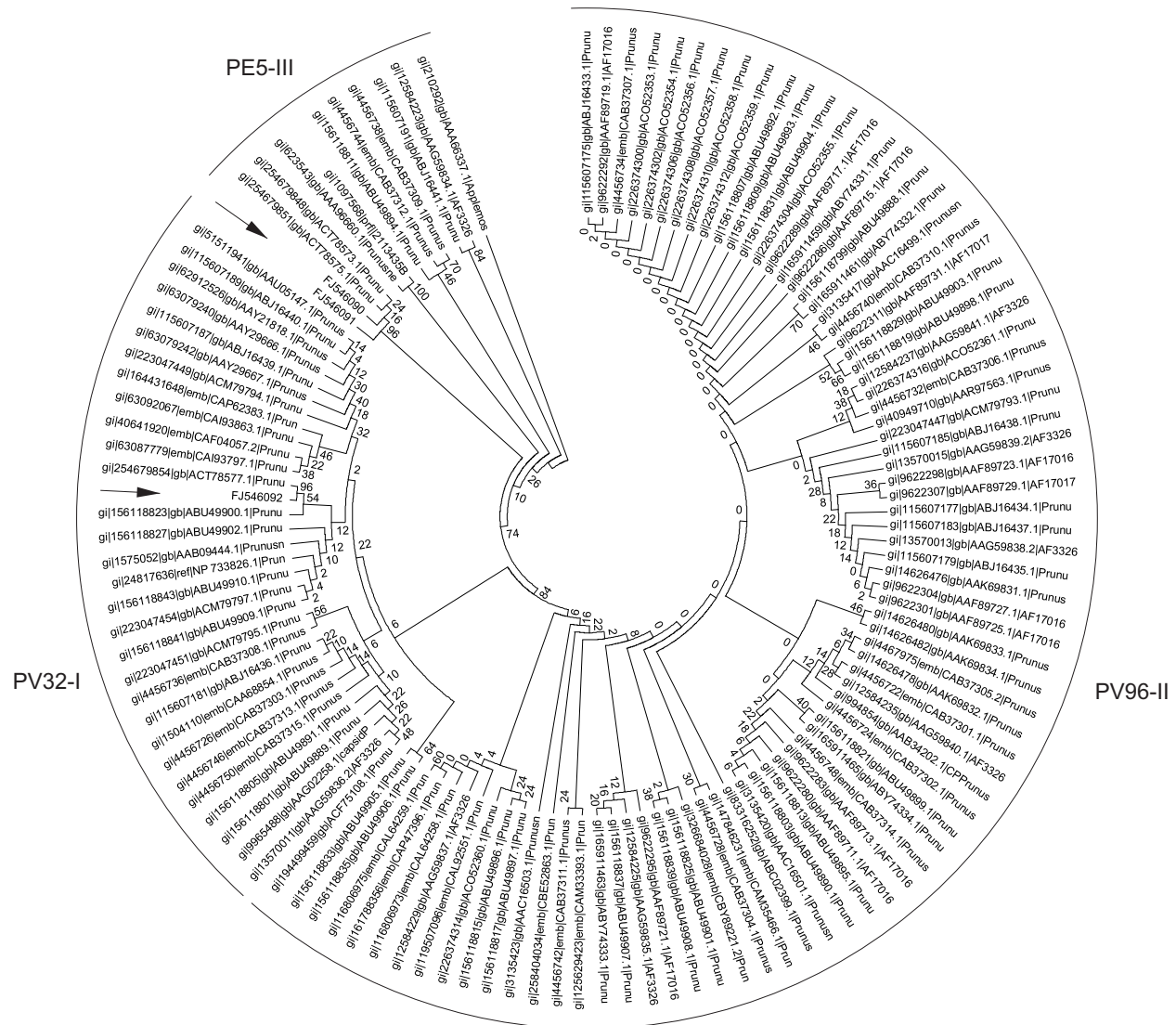


Figura 6. Dendrograma de las secuencias del *ORF* de la proteína de la cápside (CP) de tres aislados mexicanos de PNRSV (indicados con flecha), indica una alta similitud con secuencias del mismo virus disponibles en el Genbank (NCBI) con las que se comparó.

Figure 6. Dendrogram of the *ORF* sequences of the capsid protein (CP) of three Mexican PNRSV isolates (indicated with arrows), indicating high similarity to the sequences of the same virus available in the GenBank (NCBI) with which they were compared.

a su rápida propagación y amplia distribución mundial, combinado con otros virus y viroides, en frutales de hueso y otras especies de Rosaceae (Pallás *et al.*, 2012; Yuyemoto, *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

La detección de PNRSV en árboles frutales es problemática porque la concentración del virus fluctúa entre estaciones y el virus está distribuido irregularmente en el árbol infectado (Scott *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 2008). La detección del PNRSV con los métodos usados en este estudio fue más consistente con muestras recolectadas en agosto, en madurez de frutos y previo a la cosecha. Por tanto, es necesario considerar la detección de este virus a través del tiempo y determinar su efecto en la expresión de síntomas e incluso usar métodos alternativos de detección (Rosner *et al.*, 1997).

No se conoce el origen y la distribución del PNRSV en las plantas de durazno cultivadas en las zonas productoras de durazno en México y los daños que causa en el ciclo productivo de este frutal. Es posible que otros virus o viroides, que son comunes en otras partes del mundo, estén infectando al durazno cultivado en México, por lo cual es necesario identificarlos.

CONCLUSIONES

La presencia del *Prunus necrotic ringspot virus* se determinó parcialmente en plantas de durazno con daños de moteado, mosaico y anillos irregulares amarillentos, cultivadas en regiones del Estado de México, estados de Morelos y Puebla, utilizando transmisión mecánica a hospedantes indicadoras, prueba serológica de DAS-ELISA, hibridación Dot-blot, análisis electroforético de ARN-dc y por secuenciación directa de productos de la RT-PCR de un fragmento de 455 pb muy conservado dentro del *ORF* de la proteína de la cápside (CP) del PNRSV, que mostró una identidad de 94 % a 100 % con otros aislados del PNRSV distribuidos ampliamente en el mundo.

La identidad del PNRSV se confirmó también en tres muestras por clonación y secuenciación nucleotídica completa del componente ARN-3, que contiene los *ORF*'s de la proteína del movimiento (MP) y de la proteína de la cápside (CP) y por comparación con secuencias similares disponibles en la base de datos del Genbank. Las secuencias nucleotídicas (an) y las correspondientes con sus productos de traducción

combined with other viruses and viroids in stone fruits and other species of Rosaceae (Pallás *et al.*, 2012; Yuyemoto *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

Detecting PNRSV in fruit trees is problematic because the virus concentration fluctuates over the seasons, and is distributed irregularly in the infected tree (Scott *et al.*, 1989). Detection of PNRSV with the methods used in this study was more consistent in samples collected in August when fruits are ripe and before harvest. Therefore, it is necessary to consider detection of this virus over time to determine its effect on expression of symptoms, and even the use alternative methods of detection (Rosner *et al.*, 1997).

The origin and distribution of PNRSV in peach trees cultivated in peach-producing regions of Mexico, and the damage it causes during the fruit-producing cycle, are unknown. It is possible that other viruses or viroids, common in other parts of the world, are infecting peach trees cultivated in Mexico, and thus their identification is important.

CONCLUSIONS

The presence of *Prunus necrotic ringspot virus* in peach-growing regions of the Estado de Mexico, states of Morelos and Puebla was partially determined in peach trees that exhibited yellow mottle, mosaic and irregular rings using mechanical transmission to indicator hosts, DAS-ELISA serological assay, Dot-blot hybridization, electrophoretic analysis of ds-RNA and direct sequencing of RT-PCR products of a well-preserved 455 pb fragment in the *ORF* of the capsid protein (CP) of PNRSV, which showed 94 % to 100 % identity with other PNRSV isolates widely distributed around the world.

Identity of PNRSV was also confirmed in three samples by cloning and complete nucleotide sequencing of the RNA-3 component, which contains the *ORF*'s of the movement protein (MP) and the capsid protein (CP), and by comparison with similar sequences available in the database of the GenBank. The nucleotide sequences (an) and those corresponding to the translation products (aa) of the RNA-3 of PNRSV of Mexico were 98 % and 100 %, respectively, identical to those found in peach cultivated in other parts of the world, indicating a probable common geographic

(aa) del componente ARN-3 del PNRSV de México fueron 98 % y 100 %, respectivamente, idénticas a las encontradas en durazno cultivado en otras partes del mundo, indicando un probable origen geográfico común. El análisis filogenético, utilizando todas las secuencias de PNRSV disponibles en la base de datos, reveló que los tres aislados de PNRSV caracterizados se agruparon dentro de los grupos PV32-I y PE5-III, previamente descritos.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue apoyada económicamente por el PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT-IN203108) de la UNAM.

LITERATURA CITADA

- Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher (eds). 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>
- Cambra, M., Flores, R., Pallás, V., Gentit, P., and Candresse, T. 2008. Viruses and viroids of Peach Trees. In: Layne D. R., and D. Bassi (eds). The Peach Botany, Production and Uses. CABI, UK.
- Clark, M. F., and 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, and Régev, S. 1982. Location of *Prunus necrotic ringspot virus* on pollen grains from infected almond and cherry trees. Phytopathology 72: 1542-1545.
- Cui, H., N. Hong, G. Wang, A. Wang. 2012. Molecular characterization of two *Prunus necrotic ringspot virus* isolates from Canada. Arch. Virol. 157: 999-1001.
- Dal Zotto, A., S. F. Nome, J. A. Di Rienzo, and D. M. Docampo. 1999. Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. Plant Dis. 83: 1055-1057.
- Delano, J., and C. Upton. 1999. Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of *Peach mosaic virus* and *Cherry mottle leaf virus*. J. Virol. Methods 83: 103-111.
- Dijkstra, J., and P. C. De Jager. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Springer, Berlin. 459 p.
- 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. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>
- Hammond, R. W., and J. M. Crosslin. 1998. Virulence and molecular polymorphism of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. J. Gen. Virol. 79: 1815-1823.
- Herranz, M. C., J. A. Sánchez-Navarro, F. Aparicio, and V. Pallás. 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or 'polyprobe'. J. Virol. Methods 124: 49-55.
- Mackenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji, and 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.
- Matic, S., Sánchez-Navarro, J. A., Mandic, B., Myrta, A. & Pallas, V. 2008. Tracking three ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. J. Plant Pathol. 90: 137-141.
- Mink, G. I., and M. D. Aichele. 1984. Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* in prunus seed and seedlings by enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Dis. 68: 378-381.
- NCBI. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Consulta: diciembre, 2012).
- Pallás, V., Más, P., and J. A. Sánchez-Navarro. 1998. Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. In: Foster, G., and S. Taylor (eds). Plant Virus Protocols: From Virus Isolation to Transgenic Resistance. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 461-468.
- Pallás, V., J. A. Sánchez-Navarro, and J. Díez. 1999. *In vitro* evidence for RNA binding properties of the coat protein of *Prunus necrotic ringspot* ilarvirus and their comparison to related and unrelated viruses. Arch. Virol. 144: 797-803.
- Pallás, V., F. Aparicio, M. C. Herranz, K. Amari, M. A. Sánchez-Pina, A. Myrta, and J. A. Sánchez-Navarro. 2012. Iilarviruses of *Prunus* spp.: A continued concern for fruit trees. Phytopathology 102: 1108-1120.
- Pusey, P. L., and U. L. Yadava. 1991. Influence of *Prunus necrotic ringspot virus* on growth, productivity, and longevity of peach trees. Plant Dis. 75: 847-851.
- Rosner, A., L. Maslenin, and S. Spiegel. 1997. The use of short and long products for improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in woody plants. J. Virol. Methods 67: 135-141.
- Sala-Rejczak, K., and E. Paduch-Cichal. 2013. Molecular variability of the coat protein gene of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 12: 35-42.
- Salem, N., A. Mansour, A. Al-Musa, A. Al-Nsour, and R. Hammond. 2004. Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan. J. Plant Pathol. 96: 85-90.
- Sánchez-Navarro, J. A., and V. Pallás. 1997. Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of *Prunus necrotic ringspot virus* RNA 3. Arch. Virol. 142: 749-763.

—End of the English version—



- Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Rowhani, A. and Pallas, V. 1998. Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in herbaceous and *Prunus* hosts. *Plant Pathol.* 47: 780-786.
- Sánchez-Navarro, J. A., F. Aparicio, M. C. Herranz, A. Minafra, A. Myrta, and V. Pallás. 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 77-84.
- Scott, S. W., M. T. Zimmermann, D. X. Ge, and J. MacKenzie. 1998. The coat proteins and putative movement proteins of isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* from different host species and geographic origins are extensively conserved. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 155-161.
- Untiveros, M., Z. Pérez E., and G. Clover. 2010. PCR assays for the detection of members of the genus *Ilarvirus* and family *Bromoviridae*. *J. Virol. Methods* 83: 103-111.
- Valverde, R. A., T. S. Nameth, and 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, and W. K. Asai. 2003. Horizontal spread of *Ilarviruses* in young trees of several peach cultivars. *Plant Dis.* 87: 75-77.