

Incidencia de Infecciones Virales Mezcladas en un Área de Producción de Fresa en Guanajuato, México

Incidence of Mixed Viral Infections in a Strawberry Producing Area in Guanajuato, Mexico

Carlos Alberto Contreras Paredes, Laura Silva Rosales, Violana Gallegos, M. Lucila Ortiz Castellanos, Alba Estela Jofre Garfias*, Departamento de Ingeniería Genética at Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato (Cinvestav Irapuato). Km 9.6, Libram. Nte. Irapuato, Guanajuato. CP 36821, México; Pedro Antonio Dávalos González, Centro de Investigación Regional Centro, Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel Allende, Celaya, Guanajuato. CP 38110, México. *Corresponding author: ajofre@ira.cinvestav.mx

(Recibido: Abril 10, 2014 Aceptado: Agosto 14, 2014)

Contreras Paredes CA, Silva Rosales L, Gallegos V, Ortiz Castellanos ML, Jofre Garfias AE y Dávalos González PA. 2014. Incidencia de infecciones virales mezcladas en un área de producción de fresa en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 32: 12-25.

Resumen. Irapuato, en el estado de Guanajuato, fue el principal productor de fresa a nivel nacional. La pérdida de ese estatus fue debida a infecciones virales, entre otras causas. El virus del moteado de la fresa (SMoV), el del arrugamiento de la fresa (SCV) y el virus latente del anillo necrótico de la fresa (SLRSV) fueron encontrados previamente en Irapuato; sin embargo, la diversidad viral es aún desconocida. Este estudio se realizó en los municipios de Irapuato y Abasolo, en donde se había reportado su presencia. Detectamos siete especies virales en 57 muestras colectadas: SCV, SMoV, el virus críptico de *Fragaria chiloensis* (FCICV), el latente de *Fragaria chiloensis* (FCICLV), el asociado a la palidosis de la fresa (SPaV), el del choque necrótico de la fresa (SNSV) y el amarillamiento marginal tenue de la fresa (SMYEV). Éstos se encontraron en infecciones sencillas y en 24 mezclas, conformando el complejo viral local de fresa (LSVC). Los más abundantes fueron: SMoV, FCICV, SNSV y SMYEV. Se compararon las secuencias de nucleótidos de los aislamientos virales mexicanos con los de EE. UU.

Palabras clave adicionales: virus de fresa, infecciones virales mixtas.

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una fruta pequeña de gran importancia en todo el mundo. México ha sido un importante productor de fresa durante muchos años (FAOSTAT, 2011). Aunque, existen 12 estados diferentes productores de fresa, sólo tres estados -Michoacán (Mich.),

Abstract. Irapuato county, in Guanajuato state in central Mexico, was the main strawberry producer at national level, where viral infections was one of the causes for the decrease in the amount of acres cultivated with this crop. *Strawberry mottle virus* (SMoV), *Strawberry crinkle virus* (SCV), and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) were previously found affecting strawberry production in Irapuato; however, the viral diversity present in strawberry fields of Mexico is unknown. This survey was carried in a small area of Irapuato and Abasolo counties, in Guanajuato state, where the highest viral diversity associated to strawberry has been reported. We detected seven different viral species in 57 samples collected: SCV, SMoV, *Fragaria chiloensis* cryptic virus (FCICV), *Fragaria chiloensis* latent virus (FCILV), *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV), *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV), and *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV). All in single and in 24 different mixed infections, conforming the Irapuato's Local Strawberry Virus Complex (LSVC). The most abundant viruses were SMoV, FCICV, SNSV, and SMYEV. We compared nucleotide sequences of strawberry Mexican viral isolates with those that affect strawberry in the USA, finding deletions, silent and non-silent mutations in the Mexican isolates.

Additional keywords: strawberry viruses, mixed viral infections.

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a small fruit crop of great importance throughout the world. Mexico has been an important strawberry producer for many years (FAOSTAT, 2011). Although, there are 12 different states producing strawberries, only three states Michoacan (Mich.), Baja California (B.C.) and Guanajuato (Gto.), generate more than 90% of the national production. Within

Baja California (BC) y Guanajuato (Gto.)- generan más del 90% de la producción nacional. Dentro de estos tres estados, las ciudades de Zamora en Mich., Ensenada en BC e Irapuato en Gto., son las más importantes. En la década de los 70's, Irapuato fue el principal productor, y ha sido históricamente una zona de producción de fresa en los últimos 100 años. Recientemente, la introducción de cultivos hortícolas nuevos y más rentables, tales como el brócoli y la coliflor, en la zona agrícola de Irapuato, han desplazado el cultivo de la fresa. Además, los problemas fitopatológicos, incluyendo las enfermedades virales, podrían haber desempeñado un papel importante influyendo en el desplazamiento de este cultivo.

En 1989 la incidencia de los virus dentro de los viveros de Irapuato varió del 10% - 67%. En los campos de producción, la incidencia fue aún mayor en las localidades (93% y 25%, respectivamente), según lo reportado por Teliz-Ortiz y Trejo-Reyes, (1989). En ese reporte, con el uso de injertos de plantas indicadoras se observaron dos virus en infecciones simples y mixtas: el virus del moteado (SMoV) y el del enrollamiento (SCV) de la fresa (Teliz-Ortiz y Trejo-Reyes, 1989). En otro estudio realizado en el 2004 en Irapuato, se detectó el virus de la mancha anular latente (SLRSV) mediante ELISA (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). Nuestro grupo ha reportado infecciones virales de la fresa con hasta seis especies diferentes en una muestra de una pequeña área de producción en el centro de México (Silva-Rosales *et al.*, 2013). Por último, existen reportes de infecciones virales mixtas en plantas de fresa en los EE.UU. (Martin y Tzanetakis, 2006) y en Europa (Fránová-Honetslegrová *et al.*, 1999). En este estudio, se realizó una investigación en Irapuato utilizando 11 diferentes pares de cebadores (primers) diseñados para detectar varios virus encontrados en los EE.UU.: SLRSV (Postman *et al.*, 2004), el del choque necrótico (SNSV) (Tzanetakis *et al.*, 2001), el clorótico moteado de la fresa (SCFaV) (Tzanetakis and Martin, 2007), el virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV) (Tzanetakis *et al.*, 2003), el latente de *Fragaria chiloensis* (FCILV) (Tzanetakis and Martin, 2005b), el de la palidosis asociada a la fresa (SPaV) (Tzanetakis *et al.*, 2004), el críptico de *Fragaria chiloensis* (FCICV) (Tzanetakis and Martin, 2005a), SMoV (Martin *et al.*, 2009), el virus de la rizadura (SVBV), SCV y el del amarillamiento marginal tenue (SMYEV) (Thompson *et al.*, 2003). Algunos de estos virus fueron detectados en infecciones simples o mixtas conformando el "complejo local viral de la fresa en Irapuato" (LSVC). Con el fin de tener una valoración inicial de la diversidad viral y la variabilidad del LSVC en Irapuato, México, las secuencias de algunos segmentos virales amplificadas fueron obtenidas y se compararon con los reportados en EE.UU.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se recolectaron un total de 57 muestras de fresas de las variedades "Camino Real", "Festival" y "Sweet Charlie", así como algunos clones resultantes de un programa local de mejoramiento desarrollado entre el INIFAP y el CIVESTAP-Irapuato. Todas las muestras se recolectaron en un área de 851

these federal states, Zamora in Mich., Ensenada in BC and Irapuato in Gto., are the most important. In the 1970s, Irapuato was the main producer, and has historically been a strawberry producing area for the last 100 years. Lately, the introduction of new and more profitable horticultural crops, such as broccoli and cauliflower, to the agricultural zone of Irapuato, has displaced the strawberry cultivation. Furthermore, phytopathological problems, including viral diseases, might have played an important role affecting strawberry cultivation.

In 1989 the virus incidence within the nurseries of Irapuato ranged from 10% to 67%. In producing fields, the incidence was even higher in both localities (93% and 25%, respectively), as reported by Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, (1989). In that report, using grafting indicator plants two viruses were found in single and mixed infections: *Strawberry mottle virus* (SMoV) and *Strawberry crinkle virus* (SCV) (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). Other study conducted in 2004 in the Irapuato county found *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) through ELISA (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). We have also previously reported strawberry viral infections with up to six different species in a sample from a small producing area in central Mexico (Silva-Rosales *et al.*, 2013). Mixed infections of virus have been reported before in strawberry plants in the USA (Martin and Tzanetakis, 2006) and Europe (Fránová-Honetslegrová *et al.*, 1999). In the present work, a survey was conducted in Irapuato using 11 different pairs of primers designed to detect several viruses reported in the USA: SLRSV (Postman *et al.*, 2004), *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV) (Tzanetakis *et al.*, 2001), *Strawberry chlorotic fleck virus* (SCFaV) (Tzanetakis and Martin, 2007), *Beet pseudo-yellow virus* (BPYV) (Tzanetakis *et al.*, 2003) *Fragaria chiloensis latent virus* (FCILV) (Tzanetakis and Martin, 2005b), *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV) (Tzanetakis *et al.*, 2004), *Fragaria chiloensis cryptic virus* (FCICV) (Tzanetakis and Martin, 2005a), SMoV (Martin *et al.*, 2009), *Strawberry vein banding virus* (SVBV), SCV and *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) (Thompson *et al.*, 2003). Some of these viruses were detected in single or mixed infections conforming the Irapuato's Local Strawberry Virus Complex (LSVC). In order to have an initial approach for the viral diversity and variability of the LSVC in Mexico, the sequences for some amplified viral segments were obtained and compared with those reported from USA.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. A total of 57 samples from the 'Camino Real', 'Festival' and 'Sweet Charlie' commercial strawberry varieties, and some advanced clones from a local breeding program between INIFAP and Cinvestav-Irapuato, were collected within an 851 sq km area of Irapuato County. Strawberry UC-4 and UC-10 were grown at the same time as indicator of virus infection in one of the locations, La Mocha. These cultivar lines have been reported to show the characteristic viral symptoms when infected with some pathogens including virus (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010). UC-4 is susceptible

kilómetros cuadrados en la ciudad de Irapuato. Los clones UC-4 y UC-10 se cultivaron al mismo tiempo como indicadoras de las infecciones virales en una de las locaciones llamada “La Mocha”. Se ha reportado previamente que estas líneas de cultivares mostraron los síntomas virales característicos cuando se infectaron con algunos patógenos, incluyendo algunos virus (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010). La UC-4 es susceptible a SCV, SMYEV y SMoV, y la UC-10 es susceptible a SPaV (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010).

Muestreo. Se recolectaron hojas de plantas con síntomas virales en plantaciones experimentales y comerciales de 13 lugares diferentes en áreas de Irapuato y Abasolo, en el estado de Guanajuato, durante las temporadas de cosecha 2007-2008, 2008-2009 y 2012-2013 (abril y diciembre de 2007, julio y diciembre de 2008 y julio del 2013), conformando cinco conjuntos diferentes de muestras (Cuadro 1). El número de áfidos (vectores de transmisión de virus) se registró en cada lugar de acuerdo con Holman *et al.*, (1991), junto con una escala hedónica de vigor de la planta, con valores asignados de la 5, donde 1 corresponde al más débil y 5 al más fuerte.

Aislamiento de ARN total. La extracción del ARN total se realizó de acuerdo a lo descrito por Halgren *et al.*, (2007), donde 150 mg de tejido foliar se molieron y homogeneizaron con 1 mL de amortiguador de extracción (200 mM Tris-HCl, 300 mM LiCl, 1.5% de litio-dodecil-sulfato, 10 mM EDTA, 1% de desoxicolato de sodio, 2% de polivinilpirrolidona, 1% Tergitol NP-40 y 1% de 2-mercapto-etanol) después de la centrifugación (16000 xg durante 20 min). Se recolectó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de acetato de potasio 6 M, pH 6.5. La mezcla se incubó a -20°C durante 30 min y se centrifugó a 16000 xg durante 10 min. El ARN se precipitó con alcohol isopropílico frío por centrifugación a 16000 xg durante 20 min. El sedimento se resuspendió en 500 µL de solución de lavado (Tris 10 mM, EDTA 0.5 mM, NaCl 50 mM y etanol al 50%). El sedimento final que contenía el ARN se resuspendió mediante la adición de una solución de Tris-EDTA y 25 µL de leche de sílice/vidrio. Para finalizar, se realizó una centrifugación más a 2375 xg durante 10 seg, según lo sugerido por Rott and Jelkmann (2001), y modificado por Tzanetakis *et al.*, (2005). La concentración de ARN se cuantificó por medición de absorbancia a 260 nm y su calidad se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Detección viral por PCR y su secuenciación. Se llevaron a cabo experimentos de PCR para todas las muestras de ARN extraídas utilizando primers desarrollados en el laboratorio de Bob Martin (USDA), y dirigidos contra once de los virus más importantes que afectan a las fresas en todo EE.UU. (SLRSV, SNSV, SCFaV, BPYV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SVBV, SCV y el SMYEV). El mRNA endógeno NADH deshidrogenasa se amplificó como un control interno (Cuadro 2). Se utilizó la SuperScript III (Invitrogen Corporation; California, EE.UU.) para realizar la transcripción reversa y la DreamTaq DNA Polimerasa (Fermentas) para PCR, ambos de acuerdo con las

to SCV, SMYEV, and SMoV, and UC-10 is susceptible to SPaV (Yoshikawa and Converse, 1990; Welsh-Assembly-Government, 2010).

Sampling procedure. Plant leaves with viral symptoms were collected in experimental and commercial plantations from 13 different locations in Irapuato and Abasolo areas, in the Guanajuato state, during the 2007-2008, 2008-2009 and 2012-2013 growing seasons (April and December, 2007, July and December, 2008 and July, 2013), conforming five different sampling sets (Table 1). The number of aphids (virus-transmitting vectors), were recorded at each location, according to Holman *et al.* (1991), along with an assigned plant vigor scale ranging from 1 to 5, from the weakest to the strongest for the general plant appearance.

Total RNA isolation. Total RNA extraction was performed as described by Halgren *et al.* (2007), 150 mg of leaf tissue was grinded and homogenized with 1 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, 300 mM LiCl, 1.5% lithium-dodecyl-sulfate, 10 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 2% polyvinyl-pyrrolidone, 1% Tergitol NP-40 and 1% 2-mercapto-ethanol) after centrifugation (16000 xg 20 min). Supernatant was recovered and an equal volume of 6 M potassium acetate pH 6.5 was added. The mixture was incubated at -20 °C for 30 min and centrifuged at 16000 xg for 10 min. The RNA was precipitated with cold isopropyl alcohol by centrifugation at 16000 xg for 20 min. The pellet was re-suspended in 500 µL of washing solution (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl and 50% ethanol). The pellet containing the RNA was re-suspended by adding a Tris-EDTA solution and 25 µL of silica/glass milk. Finally, a further centrifugation at 2375 xg for 10 sec was carried out as suggested by Rott and Jelkmann, 2001, and modified by Tzanetakis *et al.* (2005). The RNA concentration was quantified by measuring absorbance at 260 nm and its quality was verified by electrophoresis in a 1% agarose gel.

Viral detection by PCR and sequencing. PCRs were carried out for all extracted RNA samples using primers developed in Bob Martin's laboratory (USDA), directed against eleven of the most important viruses affecting strawberries mainly in the USA (SLRSV, SNSV, SCFaV, BPYV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SVBV, SCV, and SMYEV). The endogenous NADH dehydrogenase mRNA was amplified as an internal control (Table 2). SuperScript III (Invitrogen Corporation; California, USA) was used to perform the reverse transcription and DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas) for PCR, both according to the manufacturer instructions.

The nucleotide sequences of viral fragments were obtained after PCR amplification and cloned into pJET1.2/blunt CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). The sequences were cured and deposited in the GenBank database with the following accession numbers: FCILV (JQ629412), SCV (JQ629413), SMoV (JQ629414), SMYEV (JQ629417), SNSV (JQ629415) and SPaV (JQ629416). The fragment obtained after FCICV amplification was 152 bp in length and did not meet GenBank requirements to be included in the database (at least 200 bp).

Cuadro 1. Muestras de fresa recolectadas de los cultivares de Abasolo e Irapuato, Guanajuato, México. Los insectos vectores y sus síntomas (vigor de la planta) se asociaron a la presencia viral.

Table 1. Strawberry samples collected in cultivars from Abasolo and Irapuato counties, Guanajuato, Mexico. Insects vectors and symptoms (plant vigour) were associated to viral presence.

Sample	Locality	Cultivar	Plant origin: (L) Irapuato or (F) Abasolo	Aphid population ^f	Plant Vigour ^v	Number of viral species found
1	La Mocha	'Camino Real'	L	1	4.5	2
2	Malvas	'Camino Real'	L	2	3.5	2
3	La Garrida	'Camino Real'	L	5	2	1
4	La Calera	'Sweet Charlie'	L	5	3.5	2
5	Marquez	'Sweet Charlie'	L	5	3	1
6	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	2
7	Tomelopitos	'Sweet Charlie'	L	3	4.5	2
8	Rivera de Guadalupe	'Festival'	L	1	4.5	3
9	Guadalupe de Rivera	'Camino Real'	F	1	4.5	0
10	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	5	2
11	La Mocha	'Camino Real'	L	1	3	4
12	Malvas	'Festival'	L	1	3.5	1
13	Malvas	'Camino Real'	L	1	3.5	3
14	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	1
15	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	4	1
16	Tomelopitos	'Sweet Charlie'	L	3	2	3
17	Tomelopitos	'Festival'	L	1	3.5	1
18	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	4	0
19	Ojo de Agua	'Camino Real'	F	1	4	0
20	Tomelopitos	'Festival'	L	2	4	4
21	Malvas	'Festival'	F	2	3	5
22	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	1	3	5
23	La Mocha	'Festival'	L	1	4.5	6
24	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	1	2.5	2
25	Ojo de Agua	'Camino Real'	F	1	4.5	3
26	Noria Nueva	'Camino Real'	F	1	4	3
27	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	2
28	El Guayabo	'Camino Real'	L	1	3.5	0
29	El Copalillo	'Camino Real'	L	1	3	3
30	Serrano	'Camino Real'	F	2	4	2
31	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
32	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	4
33	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
34	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	3
35	La Mocha	'Sweet Charlie'	L	5	1	2
36	La Mocha	'Festival'	L	5	1	4
37	La Mocha	'Festival'	L	5	1	2
38	La Mocha	'Festival'	L	5	1	2
39	La Mocha	'Festival'	L	5	1	0
40	La Mocha	'Festival'	L	5	1	3
41	La Mocha	10.50	L	5	3.8	0
42	La Mocha	10.50	L	5	3.8	1
43	La Mocha	10.61	L	5	2.8	3
44	La Mocha	10.19	L	5	1.8	1
45	La Mocha	10.49	L	5	1.5	1
46	La Mocha	Nikté	L	5	2.8	0
47	La Mocha	10.51	L	5	4.0	0
48	La Mocha	10.21	L	5	1.0	2
49	La Mocha	8.508	L	5	2.3	1
50	La Mocha	8.453	L	5	4.3	1
51	La Mocha	8.453	L	5	4.3	1
52	La Mocha	7.168	L	5	2.5	2
53	La Mocha	7.168	L	5	2.5	1
54	La Mocha	8.453	L	5	4.3	0
55	La Mocha	8.453	L	5	4.3	0
56	La Mocha	8.492	L	5	3.6	1
57	La Mocha	8.492	L	5	3.6	3

Collects: A (April, 2007), B (December, 2007), C (July, 2008), D (December, 2008), E (July, 2013)

^v = Arbitrary scale where 1 means absence of aphids and 5 more than 20 aphids per plant.

^f = Arbitrary scale 1 to 5, where 1 means a meager plant, 2 poor vigorous plant, 3 medium vigorous plant, 4 vigorous plant and 5 extremely vigorous plant.

Cuadro 2. Primers utilizados para detectar los diferentes virus reportados en este trabajo y el fragmento de tamaño esperado.
 Table 2. Primers used to detect the different viruses reported in this work and the expected size fragment.

Acronyms/Virus name and primers	Amplified fragment size	Reference
SLRSV Strawberry latent ringspot nepovirus		
CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	SLRSV DET F SLRSV DET R	497bp (Postman <i>et al.</i> , 2004)
SNSV Strawberry Necrotic Shock virus		
GAG TAT TTC TGT AGT GAA TTC TTG GA ATT ATT CTT AAT GTG AGG CAA CTC G	SNSV CPbeg F SNSV CPend R	800+bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2001)
SCFaV Strawberry chlorotic fleck		
CGT GGG TGA TCG CTA C ATA CGA CGC CTT CTGT	SCFV p60detF SCFV p60detR	392bp (Tzanetakis and Martin, 2007)
BPYN Beet pseudo-yellow virus		
TGA AAG ATG TCC RCT AAT GAT A TTC ATA TTA AGG ATG CGC AGA	BPY CPm R BPY CPm F	334bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2003)
FCILV Fragaria chiloensis latent virus		
ACC ACT TCA CCA CCA GAT CG CAA GCC AAC TCA CCA TGA CC	FC F FC R,	~330bp (Tzanetakis and Martin, 2005b)
SPaV Strawberry pallidosis associated virus		
GTG TCC AGT TAT GCT AGG TC, TAG CTG ACT CAT CAA TAG TG,	SP F SP R	517bp (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2004)
FCICV Fragaria chiloensis cryptic virus		
AAG TCC GTG AGC ACT GCC AT, TGA ATA CAA GTA ACG GGA ATT GA,	CRYPTIC F CRYPTIC R	151bp (Tzanetakis and Martin, 2005a)
SMoV Strawberry mottle virus		
GTA GTT TAG TGA CAA TCC AAG CGG A ACA TCT CCA/G AAC AGT TTA TA/TG TCA/G TGT/A TGG AC	SMoV1 F SMoV1 R	384bp (Thompson and Jelkmann, 2003)
SVBV Strawberry vein banding virus		
TGA ACG CAA AAA ATC CTA TC TGT TCT GAA CAG ATT GAA TC	SVBV1 SVBV2	472bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003)
SCV Strawberry crinkle virus		
CAT TGG TGG CAG ACC CAT CA TTC AGG ACC TAT TTG ATG ACA	SCD1 F SCD1 R	345bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003)
SMYEV Strawberry mild yellow edge virus		
GTG TGC TCA ATC CAG CCA G, CAT GGC ACT CAT TGG AGC TGG G	SMYEVF SMYEV R	271bp (Chang <i>et al.</i> , 2007)
Internal control NADH dehydrogenase Nd2 subunit		
GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C AGT AGA TGC TAT CAC ACA TAC AAT	NADH F NADH R	721bp (Thompson <i>et al.</i> , 2003) (Tzanetakis <i>et al.</i> , 2007)

instrucciones del fabricante.

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos virales se obtuvieron después de la amplificación PCR y se clonaron en el pJET1.2/blunt CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). Se curaron las secuencias y se depositaron en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: FCILV (JQ629412), SCV (JQ629413), SMoV (JQ629414), SMYEV (JQ629417), SNSV (JQ629415) y SPaV (JQ629416). El fragmento obtenido después de la amplificación del FCICV fue de 152 pb de longitud y no cumplió con los requisitos de GenBank para ser incluido en la base de datos (por lo menos 200 pb).

RESULTADOS

Análisis de los síntomas. Se analizaron 57 muestras de fresas provenientes de Irapuato y Abasolo. Cuarenta correspondieron a las variedades comerciales 'Camino Real', 'Festival' y 'Sweet Charlie', y doce fueron clones desarrollados dentro de un programa local de mejoramiento de fresas locales. Las fresas UC-4 y UC-10 se cultivaron al mismo tiempo, como plantas indicadoras de infecciones virales, y sirvieron como un marcador indirecto para establecer cuales virus serían parte del LSVC. Durante el verano, las plantas UC-4 generalmente desarrollaron un enrojecimiento prematuro visible en los bordes de las hojas, el cual se extendió a lo largo de toda la hoja dándoles una apariencia de pseudo-latencia. Estas hojas infectadas murieron prematuramente y a la planta le crecieron hojas nuevas. Por lo general, estas hojas eran más pequeñas de lo normal, y en algunos casos, estaban arrugadas, deformadas, moteadas con manchas cloróticas o curvadas. Las plantas indicadoras infectadas UC-4 y/o UC-10, mostraron enfermedades crónicas durante tres o cuatro meses y luego murieron.

Se encontraron áfidos en casi la mitad de los sitios de muestreo y se identificaron utilizando una guía taxonómica para áfidos de la región (Holman *et al.*, 1991). Las especies de áfidos predominantes fueron: *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell), vector de SCV y SMYEV, y *Aphis gossypii* vector para la transmisión del SMoV (Tzanetakis and Martin, 2013).

Diversidad viral asociada a los cultivos de fresa mexicana. La diversidad viral asociada a los cultivos de fresa mexicana es poco conocida. En este estudio, se analizaron 57 muestras de fresas procedentes de 13 ubicaciones diferentes en Irapuato y Abasolo, dentro de la subregión geográfica conocida como "El Bajío" (Cuadro 1). El análisis fué realizado después de la amplificación de fragmentos virales presentes en las muestras analizadas por PCR. Los resultados revelaron la presencia de siete especies virales diferentes: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV y SMYEV, ya sea en infecciones simples o mixtas. Cuarenta y siete muestras fueron positivas para al menos uno de los siete virus presentes, y 10 no dieron lugar a ningún producto viral amplificado, y, por lo tanto, fueron negativas. La presencia de FCICV fue asignado basándose en la secuencia del fragmento amplificado por PCR de 151 nucleótidos (AAGTCCGTGAGCACTGCCATGCCCCGTGACGAATTACTCTGCCTTCGAATGCTCA

RESULTS

Symptom survey. Fifty-seven strawberry samples from Irapuato and Abasolo counties were analyzed. Forty correspond to 'Camino Real', 'Festival' and 'Sweet Charlie' commercial varieties and twelve to advanced clones from a local strawberry breeding program. Strawberry UC-4 and UC-10 were grown at the same time, as indicator control plants of virus infections, and served as an indirect hint to establish which viruses would be part of the LSVC. During the summer, UC-4 plants usually developed visible premature redness at the edges of the leaves, which spread throughout the entire leaf, giving them the appearance of pseudo-dormancy. These infected leaves died prematurely and the plant grew new leaves. Usually, these leaves were smaller than normal, and in some cases, they were wrinkled, deformed, mottled with chlorotic spots, or curled. Infected UC-4 and/or UC-10 indicator plants showed chronic illness for three or four months and then died.

Aphids were found in almost half of the sampling sites and were identified using a taxonomic guide for aphids in the region (Holman *et al.*, 1991). The prevailing aphid species were *Chaetosiphon fragaefolli* (Cockerell), vector for SCV, SMYEV and *Aphis gossypii* vector for SMoV transmission (Tzanetakis and Martin 2013).

Viral diversity associated to Mexican strawberry crops. The viral diversity associated to Mexican strawberry crops is poorly known. In this study, we analyzed 57 strawberry samples from 13 locations in the Irapuato and Abasolo counties, within "El Bajío" geographical sub-region (Table 1). The analysis was done after the amplification of the viral fragments present on the samples, by PCR. Our data revealed the presence of seven different viral species: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV and SMYEV, either in single or mixed infections. Forty-seven samples were positive for at least one of the seven viruses present, and 10 did not give rise to any amplified viral product, and were therefore negative. The presence of FCICV was assigned based on the sequence of the PCR amplified fragment of 151 nucleotides (AAGTCCGTGAGCACTGCCATGCCCCGTGACGAATTACTCTGCCTTCGAATGCTCAATTTCCAGAATACGTCGTAGAATCTGGCGCAATGTCAACTTTGCGTGCACATCCATTACCAAGACGCTGGAATCAATTCCCGTTACTTGTATTCA) which was identical to the same stretch of the RNA1 segment of the only isolate from Chile (DQ093961.2), available on NCBI (Tzanetakis and Martin, 2005a).

SMoV (*Secoviridae*), was detected in 31 out of the 57 samples tested (54%), two members of the *Bromoviridae* family, FCILV and SNSV, in 25 samples (44%), SMYEV (*Alphaflexiviridae*) in 15 samples (26%), SCV (*Rhabdoviridae*) in 16 samples (28%), SPaV (*Closteroviridae*) in 9 samples (16%), and FCICV in 14 samples (24%).

We identified 14 samples infected with only one virus: eight had SMoV, five had SCV and one had SPaV. (Table 3). The remaining 29 samples had mixed infections with two or more viruses present conforming 23 combinations (C) (Table 3). Of the 14 samples with two

ATTTCCAGAATACGTCGTAGAAATCTGGCGCAATGT CAACTTTGCGTGCACATTCCATTACCAAGACGCT GGAATCAATTCCCCTTACTTGTATTCA) el cual fue idéntico al mismo tramo del segmento de ARN1 del único aislado de Chile (DQ093961.2) disponible en el NCBI (Tzanetakis and Martin, 2005a).

El SMoV (*Secoviridae*) se detectó en 31 de las 57 muestras analizadas (54%), dos miembros de la familia *Bromoviridae*, FCILV y SNSV, en 25 muestras (44%), SMYEV (*Alphaflexiviridae*) en 15 muestras (26%), SCV (*Rhabdoviridae*) en 16 muestras (28%), SPaV (*Closteviridae*) en 9 muestras (16%) y el FCICV en 14 muestras (24%).

Se identificaron 14 muestras infectadas con sólo un virus: ocho tenían SMoV, cinco tenían SCV y uno tenía SPaV. (Cuadro 3). Las 29 muestras restantes tenían infecciones mixtas con dos o más virus presentes en 23 combinaciones (C) (Cuadro 3). De las 14 muestras con dos virus, cinco contenían la combinación SMoV + FCICV (C1), dos con SMoV + SMYEV (C2), dos con SMoV + SNSV (C6) y dos con SMYEV + SNSV (C7). Las otras tres muestras contenían una combinación no repetitiva de FCICV + FCILV (C3), FCILV + SCV (C4) y SMoV + SPaV (C5). Doce muestras tenían mezclas de tres virus: dos con SMoV + FCICV + FCILV (C9), dos con SMYEV + SNSV + SPaV (C10) y dos con SMoV + SCV + SMYEV (C16). Los seis restantes tenían las combinaciones SCV + SNSV + SPaV (C8), SMoV + FCICV + SCV (C11), SMoV + SNSV + SPaV (C12), SMoV + SCV + SNSV (C13), SMoV + FCICV + SNSV (C14) y SCV + SMYEV + SNSV (C15). Adicionalmente, se observaron cuatro muestras únicas con mezclas de cuatro virus FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV (C17), SMoV + SCV + SNSV + SPaV (C18), SMoV + SMYEV + SNSV + SPaV (C19) y SMoV + SCV + SMYEV + SNSV (C20). Las dos muestras con cinco virus mixtos fueron: FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SNSV (C21) y SMoV + FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV (C22). Por último, únicamente se encontró una muestra con seis virus: FCICV + FCILV + SCV + SMoV + SMYEV + SPaV (C23) (Cuadro 4).

Con la finalidad de determinar la relación de las cepas virales que se encontraron con aquellas reportadas en los EE.UU., de donde provenían la mayoría de las plántulas, se compararon las secuencias parciales de los diferentes segmentos de los nucleótidos de las siete especies virales detectadas (Figura 1). No se observaron diferencias entre la secuencia de nucleótidos de SPaV parecida a HSP70 del aislamiento de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2004) y el aislamiento encontrado en éste trabajo. El FCICV de esta región geográfica mostró dos diferencias con la secuencia de referencia del Chile (Tzanetakis *et al.*, 2008): un nucleótido cambió y otro fue escindido en el ORF de la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN). Se encontraron más diferencias de nucleótidos en el SMoV mexicano con ocho diferencias de nucleótidos en comparación con el 3' UTR de su par chileno más similar (Thompson and Jelkmann, 2003). Todas las otras especies virales detectadas e identificadas en este estudio, mostraron diferencias de nucleótidos que resultaron en cambios de aminoácidos en diferentes ORFs

viruses, five contained the SMoV+FCICV combination (C1), two of SMoV+SMYEV (C2), two of SMoV+SNSV (C6) and two of SMYEV+SNSV (C7). The other three samples contained a non-repetitive combination of FCICV+FCILV (C3), FCILV+SCV (C4) and SMoV+SPaV (C5). Twelve samples had mixtures of three viruses: two of SMoV+FCICV+FCILV (C9), two of SMYEV+SNSV+SPaV (C10) and two of SMoV+SCV+SMYEV (C16). The remaining six had the combinations SCV+SNSV+SPaV (C8), SMoV+FCICV+SCV (C11), SMoV+SNSV+SPaV (C12), SMoV+SCV+SNSV (C13) SMoV+FCICV+SNSV (C14) and SCV+SMYEV+SNSV (C15). We found four unique samples with mixes of four viruses FCICV+FCILV+SMYEV+SNSV (C17), SMoV+SCV+SNSV+SPaV (C18), SMoV+SMYEV+SNSV+SPaV (C19) and SMoV+SCV+SMYEV+SNSV (C20). The two samples with five viruses mixed FCICV+FCILV+SCV+SMYEV+SNSV (C21) and SMoV+FCICV+FCILV+SMYEV+SNSV (C22). Lastly, we found just one sample with six viruses contained FCICV+FCILV+SCV+SMoV+SMYEV+SPaV (C23) (Table 4).

In order to determine the relatedness of viral isolates found with those reported in the USA, where most of the plantlets came from, the partial nucleotide sequences from different segments of the seven viral species detected were compared (Figure 1). There are no differences between the SPaV nucleotide HSP70-like sequence of USA isolate (Tzanetakis *et al.*, 2004) and isolate found in this work. The FCICV from this geographic region showed two differences with the reference sequence from Chile (Tzanetakis *et al.*, 2008), one nucleotide change and other was deleted in the ORF of the RdRp (RNA-dependent RNA polymerase). More nucleotide differences were found in the Mexican SMoV with eight nucleotide differences compared with the 3' UTR of its most similar Chilean counterpart (Thompson and Jelkmann, 2003). All the other viral species detected and identified here had nucleotide differences resulting in amino acid changes in different ORFs in four of the seven species from Mexico when compared to their closest homologues: a substitution of one Asparagine in the carboxy region of the coat protein (CP) instead of a Glutamine in the SNSV of USA (Tzanetakis *et al.*, 2010). One Serine was found instead of one Proline in the same region (CP), of the *Strawberry mild yellow edge virus* from Germany (Jelkmann *et al.*, 1990), and one Arginine for one Glutamic acid in the mid-region of the RNA-dependent RNA polymerase of FCILV from USA (Tzanetakis *et al.*, 2008). Finally, two amino acid changes were inferred in the core region of the L protein (RNA-dependent RNA polymerase) of the *Strawberry crinkle virus*; one Leucine for an Isoleucine; and one Proline for an Arginine, when compared to the Netherlands' isolate (Klerks *et al.*, 2004).

DISCUSSION

Near to 30 DNA and RNA viruses have been associated to strawberry in worldwide (Tzanetakis and

Cuadro 3. Muestras positivas y negativas para los siete virus detectados en las 57 muestras analizadas.
Table 3. Positive and negative samples for seven viruses detected in the 57 samples tested.

Family Virus	FCICV	Bromo FCILV	Rhabdo SCV	Sequi SMoV	Fexi SMYEV	Bromo SNSV	Closterospora SPaV	...viridae	Viral diversity	Viral combination
Sample	-	JQ629412*	JQ629413	JQ629414	JQ629417	JQ629415	JQ629416			
1	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
2	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
3	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
4	-	-	-	+	-	-	+	-	2	C5
5	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
6	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
7	-	-	-	+	-	+	-	-	2	C6
8	+	-	-	+	-	+	-	-	3	C14
9	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
10	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
11	-	-	+	+	-	+	+	-	4	C18
12	-	-	-	-	-	-	+	-	1	S
13	-	-	-	+	-	+	+	-	3	C12
14	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
15	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
16	-	-	+	+	-	+	-	-	3	C13
17	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
18	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
20	+	+	-	-	+	+	-	-	4	C17
21	+	+	+	-	+	+	-	-	5	C21
22	+	+	-	+	+	+	-	-	5	C22
23	+	+	+	+	+	-	+	-	6	C23
24	+	+	-	-	-	-	-	-	2	C3
25	+	-	+	+	-	-	-	-	3	C11
26	+	+	-	+	-	-	-	-	3	C9
27	-	+	+	-	-	-	-	-	2	C4
28	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
29	+	+	-	+	-	-	-	-	3	C9
30	+	-	-	+	-	-	-	-	2	C1
31	-	-	-	-	+	+	+	-	3	C10
32	-	-	+	-	+	+	-	-	3	C15
33	-	-	-	+	+	+	+	-	4	C19
34	-	-	+	+	+	-	-	-	3	C16
35	-	-	-	-	+	+	+	-	3	C10
36	-	-	-	+	+	-	-	-	2	C2
37	-	-	+	+	+	+	-	-	4	C20
38	-	-	-	-	+	+	-	-	2	C7
39	-	-	-	+	+	-	-	-	2	C2
40	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
42	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
43	-	-	+	-	-	+	+	-	3	C8
44	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
45	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
46	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
48	-	-	-	+	-	+	-	-	2	C6
49	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
50	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
51	-	-	-	+	-	-	-	-	1	S
52	-	-	-	-	+	+	-	-	2	C7
53	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
54	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
56	-	-	+	-	-	-	-	-	1	S
57	-	-	+	+	+	-	-	-	3	C16

* Refers to Gene Bank (NCBI) accession number
S Refers to single infection
- No virus present in these samples

Cuadro 4. Abundancia y diversidad de mezclas virales encontradas en muestras de fresa.
Table 4. Abundance and diversity of the viral mixes found in strawberry samples.

Mixed viruses	Abundance	Viral mixes	ID	
2	5	SMoV + FCICV	C1	
	2	SMoV + SMYEV	C2	
	2	SMoV + SNSV	C6	
	2	SMYEV + SNSV	C7	
	1	FCICV + FCILV	C3	
	1	FCILV + SCV	C4	
	1	SMoV + SPaV	C5	
	3	2	SMoV + FCICV + FCILV	C9
		2	SMYEV + SNSV + SPaV	C10
2		SMoV + SCV + SMYEV	C16	
1		SCV + SNSV + SPaV	C8	
1		SMoV + FCICV + SCV	C11	
1		SMoV + SNSV + SPaV	C12	
1		SMoV + SCV + SNSV	C13	
1		SMoV + FCICV + SNSV	C14	
1		SCV + SMYEV + SNSV	C15	
4	1	FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV	C17	
	1	SMoV + SCV + SNSV + SPaV	C18	
	1	SMoV + SMYEV + SNSV + SPaV	C19	
	1	SMoV + SCV + SMYEV + SNSV	C20	
5	1	FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SNSV	C21	
	1	SMoV + FCICV + FCILV + SMYEV + SNSV	C22	
6	1	SMoV + FCICV + FCILV + SCV + SMYEV + SPaV	C23	

en cuatro de las siete especies de México, en comparación con sus homólogos más cercanos: una sustitución de una asparagina en la región carboxi de la proteína de la cápside (CP) en lugar de una glutamina en el SNSV de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2010). Se encontró una serina en lugar de una prolina en la misma región (CP), del virus del amarillamiento marginal tenue de la fresa de Alemania (Jelkmann *et al.*, 1990), y una arginina en lugar de un ácido glutámico en la región media de la ARN polimerasa dependiente de ARN del FCILV de EE.UU. (Tzanetakis *et al.*, 2008). Finalmente, dos cambios de aminoácidos se infirieron en la región central de la proteína L (ARN polimerasa de ARN) del virus del arrugamiento de la fresa; una leucina por una isoleucina; y una prolina en lugar de una arginina, en comparación con el aislado de Holanda (Klerks *et al.*, 2004).

DISCUSIÓN

Cerca de 30 virus de ADN y ARN se han asociado a la fresa en todo el mundo (Tzanetakis and Martin, 2013), sin embargo, la diversidad viral asociada al cultivo de fresa es desconocido. En este trabajo, se detectaron siete virus en parcelas de fresa en una pequeña área del central estado mexicano de Guanajuato, en la región "El Bajío". Las infecciones mixtas no son nuevas en los campos de fresa, tal

Martin, 2013), however, the viral diversity associated to strawberry crop is unknown. In this work, seven viruses were detected in strawberry plots in a small area of the Mexican central state of Guanajuato, within "El Bajío" region. Mixed infections are not new to strawberry fields, as reports from the 1930s proposed the coexistence of viral mixtures involving mostly SCV (Martin and Tzanetakis, 2006). Also, SMYEV, SMoV, SPaV, *Strawberry latent C virus* (SLCV), and SVBV have been suggested to be present in mixed infections (Martin and Tzanetakis, 2006), but there are few reports outside of the USA addressing this issue. In this survey, SMoV was frequently found in mixed infections. From the 22 plants detected with mixed infection, 15 of them included SMoV. This is not surprising since this viral species, along with the SCV, was initially reported more than 20 years ago in this area (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). The prevalence for mixed infections seems to be a hallmark for strawberry viral infections. Two factors might have influenced the prevalence of SMoV and SCV in this region. The first one is the persistence of aphid populations that can transmit both viral species (Martin and Tzanetakis, 2006). The presence of aphid vectors might have facilitated the wide spread of mixed infections in the area under study, as roughly 75% of the samples analyzed here, have mixed infections. The second is the agronomic

como lo muestran los reportes de la década de los 30's donde se propone la coexistencia de mezclas virales conformadas principalmente por el SCV (Martin y Tzanetakis, 2006). También por el SMYEV, SMOv, SPaV, virus latente C (SLCV) y SVBV han sido sugeridos por estar presentes en infecciones mixtas (Martin and Tzanetakis, 2006), pero no hay muchos reportes fuera de los EE.UU. que aborden este tema. En el presente estudio se encontró al SMOv presente

cultural practices. Even though certificated plant is import from the USA, plants are infected as some of the producers in the region have nurseries in close proximity to first or second year production fields, acting as reservoirs for the LSVC.

The majority of mixed infections consisted of three or more different viral species, as shown by the sixteen different viral combinations (C8 to C23 in Table 4),

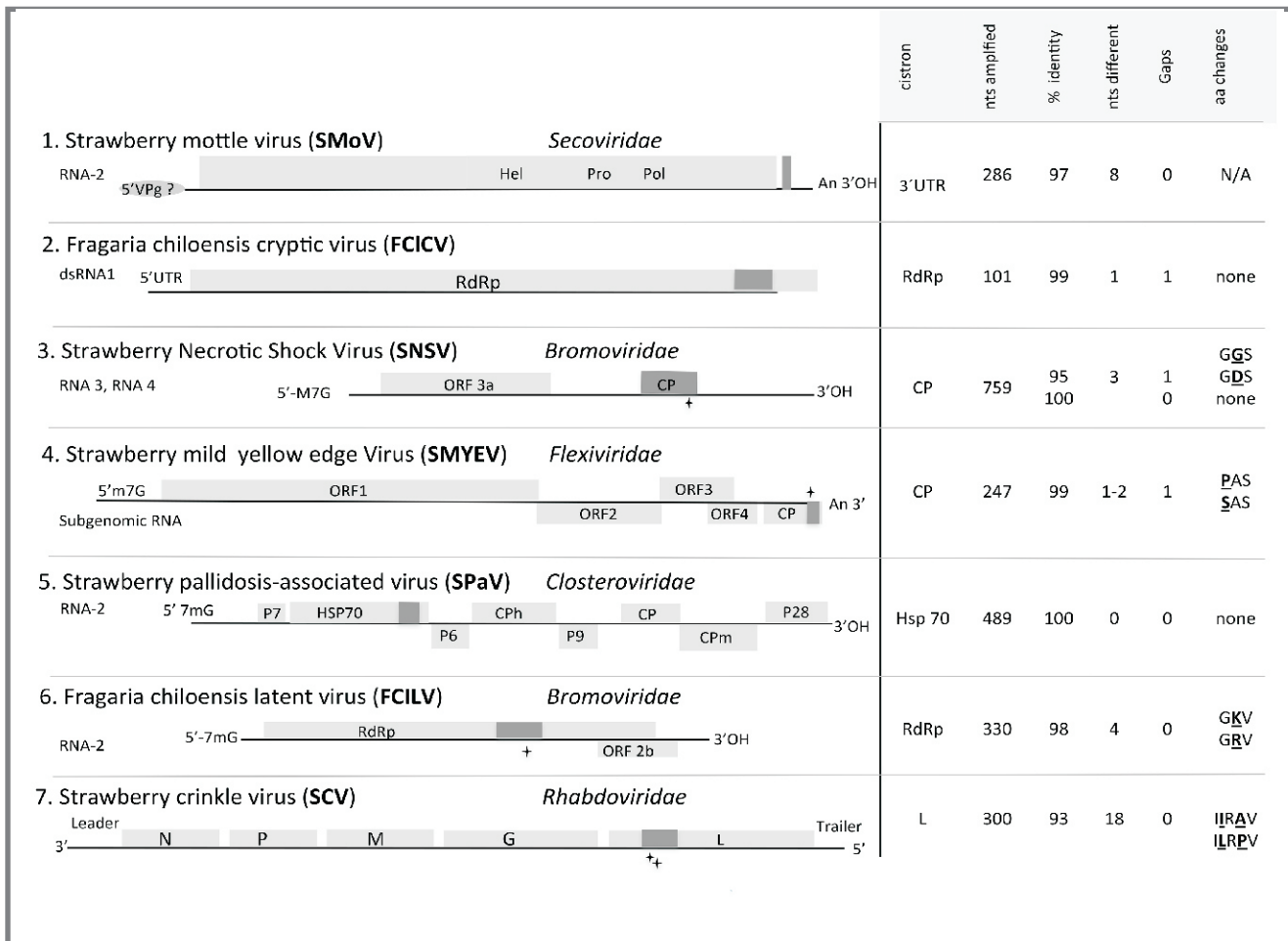


Figura 1. Segmentos de nucleótidos amplificados de los siete virus encontrados en infecciones simples o mixtas. Representación esquemática de los siete virus detectados correspondientes a las familias *Secoviridae*, *Bromoviridae*, *Partitiviridae*, *Closteroviridae* y *Rhabdoviridae*; FCICV no está asignado a ninguna familia taxonómica. Los recuadros grises representan ORF dentro de las secuencias genómicas. Los pequeños recuadros de color gris oscuro representan las secuencias de nucleótidos amplificadas obtenidas en el presente estudio. Las cruces negras indican los sitios donde se detectaron los cambios en los aminoácidos. La tabla de la derecha muestra el nombre cistron y el tamaño de su fragmento amplificado y secuenciado, su porcentaje de identidad (con otras secuencias en el NCBI), así como el número de diferentes nucleótidos, presencia de huecos y los cambios en los aminoácidos (en negrita y subrayado). Las representaciones esquemáticas fueron realizadas basándose en (Fauquet *et al.*, 2005).

Figure 1. Amplified nucleotide segments of the seven viruses found in single or mixed infections. Schematic representation of the seven viruses detected corresponding to the *Secoviridae*, *Bromoviridae*, *Partitiviridae*, *Closteroviridae* and *Rhabdoviridae* families; FCICV is not assigned to a taxonomic family. Grey boxes represent ORF within the genomic sequences. Small dark grey boxes represent the amplified nucleotide sequences reported here. Black crosses indicate the sites where amino acids changes were detected. The table on the right side shows the cistron name and size of its amplified and sequenced fragment, its percentage identity (with other sequences at NCBI), as well as the number of differing nucleotides, gaps presence and the amino acid changes (in bold and underlined). Schematic representations based on (Fauquet *et al.*, 2005).

con frecuencia en las infecciones mixtas. De las 22 plantas detectadas con infecciones mixtas, 15 de ellas incluyeron al SMoV. Esto no es de sorprenderse, ya que esta especie viral, junto con el SCV fue reportada por primera vez hace más de 20 años en esta área (Teliz-Ortiz and Trejo-Reyes, 1989). La prevalencia de infecciones mixtas parece ser un sello distintivo de las infecciones virales de la fresa. Hay dos factores que podrían haber influido en la prevalencia del SMoV y del SCV en esta región. La primera de ellas es la persistencia de las poblaciones de áfidos que pueden transmitir ambas especies virales (Martin and Tzanetakis, 2006). La presencia de vectores áfidos podría haber facilitado la amplia propagación de infecciones mixtas en el área de estudio, ya que aproximadamente el 75% de las muestras analizadas presentó infecciones mixtas. La segunda, son las prácticas agronómicas del cultivo. A pesar de que la planta certificada es importada de los EE.UU., las plantas son infectadas ya que algunos de los productores de la región tienen viveros de plantas en las proximidades cercanos al primer o segundo año de producción, actuando como reservorios del LSCV.

La mayoría de las infecciones mixtas se componía de tres o más diferentes especies virales, como se muestra por las dieciséis combinaciones virales diferentes (C8 a C23 en el cuadro 4), independientemente del cultivar de fresa evaluado. Las infecciones mixtas podrían verse favorecidas por la presencia de áfidos transmisores de SCV, SMYEV, SMoV y mosca blanca, transmitiendo el SPaV. Además, el FCILV y el SNSV se transmiten por el polen. Los trips, los cuales fueron observados pero no registrados en este trabajo, también pueden contribuir a la propagación del SNSV. La fresa se cultiva en esta región durante todo el año. La presencia de hospederos alternativos durante todo el año en muchos lugares donde se cultiva la fresa, como especies de *Chenopodium* entre otras, en esta región (Vibrans, 2012), podría facilitar la presencia de las especies virales detectadas.

A pesar de tener pequeños productos amplificados por PCR, con el conjunto de oligonucleótidos utilizado, la secuenciación directa e inversa confirmó la fiabilidad de los cambios observados a nivel de nucleótidos o de aminoácidos. La falta de cambios en el SPaV en el gen HSP70 podría indicar que, o bien la misma cepa está presente en México y en los EE.UU., o las plántulas importadas ya estaban infectadas con el virus al entrar al país. Los cambios silenciosos de nucleótidos, ya sea en las regiones no codificantes, como en el caso de SMoV o el FCICV, así como los no-silenciosos, como en el caso de SNSV, SMYEV, FCILV y el SCV, sugieren la diversificación de virus ya sea desde los primeros años después de primera introducción del virus, si se introdujo primero en plantas contaminadas, o bien derivados de plantas silvestres y malas hierbas en las inmediaciones del área de siembra.

La frecuencia de infecciones virales mixtas en la fresa, ya sean de material importado contaminado o bien de cepas virales preexistentes, enfatiza la importancia de utilizar nuevos métodos y más rápidos para garantizar que las plántulas de fresa importadas estén libres de virus. Las

regardless of the strawberry cultivar tested. Mixed infections could be favored by the presence of aphids, transmitting SCV, SMYEV, SMoV and whiteflies, transmitting SPaV. Additionally, FCILV and SNSV are transmitted by pollen. Thrips, observed but not registered in this work, could also contribute to the spread of SNSV. Strawberry is cultivated in this region all year round. The presence of alternative hosts throughout the year in many places, where this crop is grown, like *Chenopodium* species among others, in this region (Vibrans, 2012), could facilitate the presence of the viral species detected.

In spite of having small products amplified by RT-PCR, with the set of oligonucleotides used, the forward and reverse sequencing confirmed the reliability of the changes observed at the nucleotide or amino acid level. The lack of changes in the SPaV at the HSP70 gene might indicate that either the same strain is present in both Mexico and the USA, or the imported plantlets were already infected with the virus upon entering the country. Silent nucleotide changes, either in the non-coding regions, as in the case of SMoV and FCICV, as well as non-silent ones, as in the case of SNSV, SMYEV, FCILV and SCV, suggest virus diversification either from earlier years after first viral introduction, if firstly introduced in contaminated plants, or else stemming from feral and weed plants in the nearby planting area.

The frequency of mixed viral infections in strawberry, either from contaminated imported material as well as from pre-existing viral strains, highlights to the importance of using new and fast methods to ensure that imported strawberry plantlets are virus-free. Mexican phytosanitary regulations require the *in situ* evaluation imported products. However, though sometimes aided by ELISA techniques to detect the presence of a few viruses, inspections have been mostly visual. This study suggests the need to develop molecular detection methods to detect viral strains in all regions that produce strawberry.

Single and mixed plant infections having up to six viral species of SMoV, SCV, FCILV, SPaV, FCICV, SNSV and SMYEV, were found in a very small area in the central Mexico surveyed here (El Bajío Region), in 23 different combinations. However, the number of viral combinations does not seem to be equivalent to the diversity in viral symptoms probably as a reflection of synergistic or antagonistic viral relationships or with the plant in the field. Different viral combinations as well as their order of arrival to the host produce different responses in the plant as observed for other systems. In the work, being SMoV the most frequent virus it is tempting to speculate that the combination of this virus with all the other remaining six viruses might be responsible for the outcome of symptoms on the plant (Figure 2). More controlled experiments with the different combinations of viruses are underway to test this hypothesis.

Viral modifications such as non-silent mutations were found in four viral species (SNSV, SMYEV, FCILV and SCV), when compared to their most similar counterparts would be a possible indication of the adaptation of the viruses to a new environment in case they were introduced from abroad. In addition, these changes present

regulaciones fitosanitarias mexicanas requieren la evaluación *in situ* de los productos importados. Sin embargo, aunque a veces con la ayuda de técnicas de ELISA para detectar la presencia de algunos virus, las inspecciones han sido en su mayoría visuales. Este estudio sugiere la necesidad de desarrollar métodos de detección molecular para detectar cepas virales en todas las regiones productoras de fresa.

Infecciones individuales o mixtas de plantas que tienen hasta seis especies virales de SMoV, SCV, FCILV, SPaV, FCICV, SNSV y SMYEV, fueron encontradas en un área muy pequeña en el centro de México (región del Bajío), en 23 combinaciones diferentes. Sin embargo, el número de combinaciones virales no parece ser equivalente a la diversidad de síntomas virales probablemente como un reflejo de las relaciones virales sinérgicas o antagonistas o con la planta en el campo. Diferentes combinaciones virales, así como su orden de llegada al hospedero, producen diferentes respuestas en la planta como se ha observado para otros sistemas. En el presente estudio, el SMoV fue virus más frecuente por lo que se podría especular que la combinación de este virus con los otros seis virus restantes podría ser el responsable de los síntomas en la planta (Figura 2). Actualmente están en marcha experimentos más controlados con las diferentes combinaciones de virus para comprobar esta hipótesis.

Se observaron algunas modificaciones virales tales como mutaciones no silentes en cuatro especies virales (SNSV, SMYEV, FCILV y SCV) en comparación con sus contrapartes más similares, esto sería una posible señal de la adaptación de los virus a un nuevo ambiente en caso de que hubieran sido introducidos del extranjero. Además, estos

en either structural (Coat protein or CP) or replication proteins (RNA dependent RNA polymerase or RdRp), could be of benefit for viruses to prevail (competing) with other viruses in the LSVC.

CONCLUSIONS

This study is an approach to the knowledge of the diversity of the strawberry viruses from Abasolo and Irapuato Counties, in Guanajuato State, we detected in 57 strawberry samples seven viruses: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV and SMYEV in simple or mixed viral infection, conformed the Irapuato's LSVC.

In the other hand, we found some changes in the viral sequences obtained that might lead to understand the relationship between viruses and the plant in an ecological niche.

Acknowledgements. This work was supported with grants no. 07-03-K662-051 A02 from Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) to AEJG, and 330/04 from “Fundación Guanajuato Produce, A.C.” to PADV and AEJG, and 2012-06-190290 from SAGARPA-CONACYT to LSR, PADG and AEJG. We are grateful to Dr. Ioannis Tzanetakis for providing some of the cDNAs that were used as positive controls of the experiments, and RNA isolation methodology, and to Nélida Vázquez and Jimena Carrillo Tripp for their technical assistance with part of the PCR and the cloning of the viral fragments.

LITERATURE CITED

Chang L, Zhang Z, Yang H, Li H and Dai H. 2007. Detection

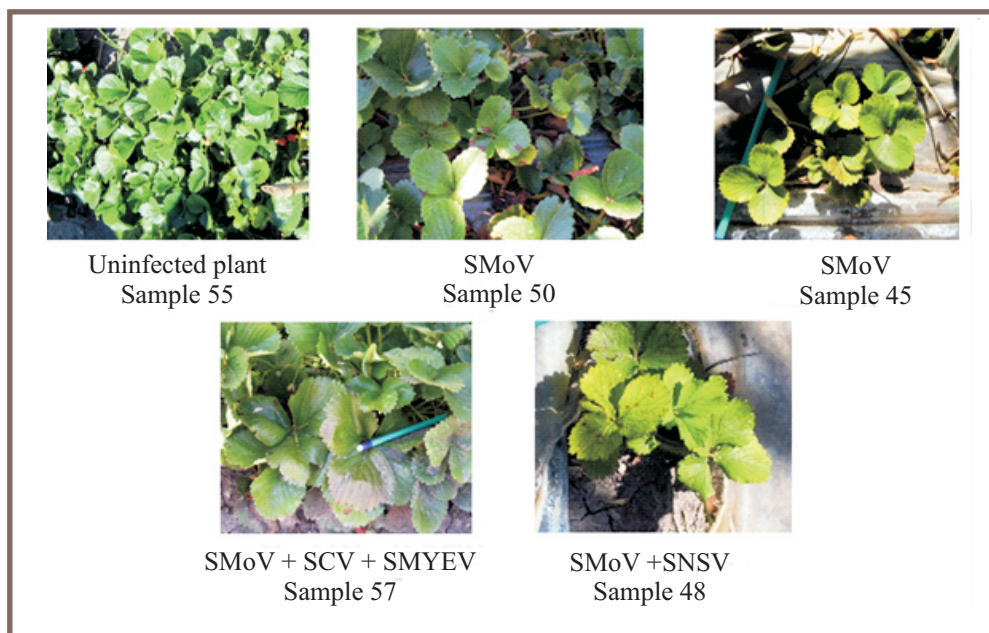


Figura 2. El SMoV fue el virus más abundante el cual produce síntomas diferenciales ante una infección única (superior) y en infección mixta viral (inferior). En cada caso se indica el virus encontrado y el número de muestra.

Figure 2. SMoV was the virus more abundant producing differential symptoms in single infection (upper) and in viral mixed infection (lower). In each case is indicated the virus found and the number of sample.

cambios presentes en cualquiera de las proteínas estructurales (proteína de la cápsida o CP) o de replicación (ARN polimerasa dependiente de ARN o RdRp) podrían ser de beneficio para que los virus prevalezcan (compitieran) con otros virus en el LSVC.

CONCLUSIONES

Este estudio es una aproximación al conocimiento de la diversidad de los virus de la fresa de Abasolo e Irapuato, en el estado de Guanajuato. En 57 muestras de fresas se detectaron siete virus: SNSV, FCILV, SPaV, FCICV, SMoV, SCV y SMYEV en infecciones virales simples o mixtas, conformando el LSVC de Irapuato.

Por otra parte, se observaron algunos cambios en las secuencias virales obtenidas lo cual podría llevar a entender la relación entre virus y la planta en un nicho ecológico.

Agradecimientos. Esta obra fue financiada con el apoyo financiero de los proyectos no. 07-03-K662-051 A02 del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG) a AEJG, el 330/04 de "Fundación Produce Guanajuato, AC" para PADV y AEJG y el 2012-06-190290 de SAGARPA-CONACYT a LSR, PADG y AEJG. Estamos muy agradecidos con el Dr. Ioannis Tzanetakis por proporcionar algunos de los cDNAs que se utilizaron como controles positivos de los experimentos, y por la metodología de aislamiento del ARN. A Nélida Vázquez y Jimena Carrillo Tripp por su asistencia técnica con parte de los experimentos de PCR y la clonación de los fragmentos virales.

of Strawberry RNA and DNA Viruses by RT-PCR Using Total Nucleic Acid as a Template. *Journal of Phytopathology* 155:431-436.

FAOSTAT. 2011. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Retrieved September 10, 2011.

Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. 2005. *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. 1259+p.

Fránová-Honetslegrová J, Mráz I, Nebesárová J and MS. 1999. Preferential binding of secondary veins in strawberry is caused by mixed virus infection. *Acta Virologica* 43:349-355.

Halgren A, Tzanetakis IE and Martin RR. 2007. Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology* 97:44-50.

Holman J, Peña MR y Bujanos MR. 1991. Guía para la identificación y análisis de los pulgones alados (Homóptera: Aphidae) del Bajío (Mexico City: CONACYT, INIFAP-SARH, COFAA-IPN.) pp. 8-11.

Jelkmann W, Martin RR, Lesemann DE, Vetten HJ and Skelton F. 1990. A new potyvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. *The Journal of General Virology* 71:1251-1258.

Klerks MM, Lindner JL, Vaskova D, Spak J, Thompson JR, Jelkmann W, and Schoen CD. 2004. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates.

European Journal of Plant Pathology 110:45-52.

Martin RR, Marcum DB and Buchner R. 2009. Evaluation of nursery greenhouse strawberries for the presence of viruses. In *Annual Production Research Report*. California Strawberry Commission. Watsonville. pp. 99-105.

Martin RR and Tzanetakis IE. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90:384-396.

Pérez-Moreno L, Rico-Jaramillo E, Sánchez-Palé JR, Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R y Rivera-Bustamante RF. 2004. Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Hortícolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:187-197.

Postman JD, Tzanetakis IE and Martin RR 2004. First report of Strawberry latent ringspot virus in a *Mentha* sp from North America. *Plant Disease* 88:907-907.

Rott ME and Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420.

Silva-Rosales L, Vazquez-Sanchez MN, Gallegos V, Ortiz-Castellanos ML, Rivera-Bustamante R, Davalos-Gonzalez PA and Jofre-Garfias AE. 2013. First Report of *Fragaria chiloensis* cryptic virus, *Fragaria chiloensis* latent virus, Strawberry mild yellow edge virus, Strawberry necrotic shock virus, and Strawberry pallidosis associated virus in Single and Mixed Infections in Strawberry in Central Mexico. *Plant Disease* 97:1002-1002.

Teliz-Ortiz D and Trejo-Reyes A. 1989. Strawberry virus diseases in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7:38-40.

Thompson JR and Jelkmann W. 2003. The Detection and Variation of Strawberry mottle virus. *Plant Disease* 87:385-390.

Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vaskova D, Schoen, CD, Spak J and Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* 111:85-93.

Tzanetakis IE, Halgren AB, Keller KE, Hokanson SC, Maas JL, McCarthy PL and Martin RR. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease* 88:383-390.

Tzanetakis IE, Keller KE and Martin RR. 2005. The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. *Journal of Virological Methods* 124:73-77.

Tzanetakis IE, Mackey IC and Martin RR. 2001. *Strawberry Necrotic Shock Virus: A New Virus Previously Thought to be Tobacco Streak Virus*. *Acta Horticulturae* 656:27-31.

Tzanetakis IE and Martin RR. 2005a. *Fragaria chiloensis* cryptic virus: A new strawberry virus found in *Fragaria chiloensis* plants from Chile. *Plant Disease* 89:1241-

- 1241.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2005b. New features in the genus Ilarvirus revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus. *Virus Research* 112:32-37.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2007. Strawberry chlorotic fleck: identification and characterization of a novel *Closterovirus* associated with the disease. *Virus Research* 124:88-94.
- Tzanetakis IE and Martin RR. 2013. Expanding Field of Strawberry Viruses Which Are Important in North America. *International Journal of Fruit Science* 13:184-195.
- Tzanetakis IE, Martin RR. and Scott SW. 2010. Genomic sequences of blackberry chlorotic ringspot virus and strawberry necrotic shock virus and the phylogeny of viruses in subgroup 1 of the genus Ilarvirus. *Archives of Virology* 155:557-561.
- Tzanetakis IE, Postman JD and Martin RR. 2007. Identification, detection and transmission of a new vitivirus from *Mentha*. *Archives of Virology* 152:2027-2033.
- Tzanetakis IE, Price R and Martin RR. 2008. Nucleotide sequence of the tripartite *Fragaria chiloensis* cryptic virus and presence of the virus in the Americas. *Virus Genes* 36:267-272.
- Tzanetakis IE, Wintermantel WM and Martin RR. 2003. First Report of Beet pseudo yellows virus in Strawberry in the United States: A Second Crinivirus Able to Cause Pallidosis Disease. *Plant Disease* 87:1398-1398.
- Vibrans, H. 2012. "Sitio Malezas de México". Retrieved Jun 28, 2012, 2012, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Welsh-Assembly-Government 2010. Special requirements for strawberry plants to qualify as nuclear stock. Food and Environment Research Agency). pp. 4.
- Yoshikawa N and Converse RH. 1990. Strawberry Pallidosis Disease-Distinctive Dsrna Species Associated with Latent Infections in Indicators and in Diseased Strawberry Cultivars. *Phytopathology* 80:543-548.