

Determinación de la presencia del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y Viroides en Cítricos del Departamento de Guatemala

José Daniel De Paz Gil¹ / depa18047@uvg.edu.gt, Julio David del Cid Villatoro¹ / del18063@uvg.edu.gt, Marie Andrée Salazar Mérida¹ / sal18289@uvg.edu.gt, Martha Patricia Herrera González² / mpherrera@uvg.edu.gt

¹ Departamento de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala.

² Laboratorio de Protección Vegetal, Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios, Universidad del Valle de Guatemala.

RESUMEN: Los cultivos de cítricos pueden verse afectados tanto por infecciones virales como subvirales, causando una disminución de rendimiento, por lo tanto, llevando a pérdidas económicas. El estudio fue realizado con el propósito de evaluar la presencia del Virus de Tristeza de los Cítricos (CTV) y viroides en cítricos dentro del departamento de Guatemala, en los municipios de Ciudad de Guatemala, Mixco, Santa Catarina Pinula y San Juan Sacatepéquez. Para ello, se seleccionaron hojas sintomáticas y asintomáticas, a las cuales se les aplicó la prueba de RT-PCR para la detección de viroides utilizando marcadores generales, mientras que en el caso del CTV, su detección se realizó mediante el ensayo de ELISA. De esto se obtuvo que ninguna de las muestras presentó infección por viroides, sin embargo, la prueba se vio afectada debido a la degradación que presentaba el ARN analizado. Por otro lado, se determinó la presencia de CTV en las muestras sintomáticas pertenecientes a los municipios de San Juan Sacatepéquez, Ciudad de Guatemala y Mixco, así como para las muestras asintomáticas de la Ciudad de Guatemala y Mixco, indicando la presencia de CTV en tres de los cuatro sitios muestreados. A partir de lo obtenido, se deben realizar pruebas adicionales como secuenciación, para establecer la cepa del virus. Adicionalmente, se recomienda evaluar una posible infección bacteriana y/o fúngica que pueda dar paso a la sintomatología observada. Finalmente, para evitar la propagación del virus, se recomienda el uso de hongos entomopatógenos antagonistas del vector transmisor.

PALABRAS CLAVE: Viroides, Virus de la tristeza de los cítricos (CTV), ELISA, RT-PCR.

Determination of the presence of Citrus Tristeza Virus (CTV) and Viroids in Citrus from the Department of Guatemala

ABSTRACT: The citrus cultivations can be affected because of viral and subviral infections, causing a decrease in its performance therefore leading to economic losses. The purpose of this study was to evaluate the presence of Citrus Tristeza Virus (CTV) and citric viroids inside the Department of Guatemala, in the municipalities of Guatemala City, Mixco, Santa Catarina Pinula and San Juan Sacatepéquez. We selected symptomatic and asymptomatic leaves of citrus plants to which RT-PCR was performed for the detection of viroids using general markers, while in the case of CTV, its detection was performed by an ELISA test. None of the samples presented viroids, nevertheless the test was affected because of the degradation represented in the RNA analyzed. On the other hand, it was confirmed the presence of CTV in the symptomatic samples belonging to the municipalities of San Juan Sacatepéquez, Guatemala City and Mixco, as well as for the asymptomatic samples of Guatemala City and Mixco, indicating the presence of CTV in three of four sampled sites. It is recommended to carry out additional tests, like sequencing, to establish the virus strain. Furthermore, it is recommended to evaluate a possible bacterial and/or fungal infection that can lead to the observed symptomatology. Finally, to avoid the virus propagation, it is recommended the use of antagonist entomopathogenic fungi.

KEY WORDS: Viroids, Citrus Tristeza Virus (CTV), ELISA, RT-PCR.

Introducción

Los cítricos son uno de los productos más comercializados en Guatemala; estos se exportan principalmente a Holanda, Inglaterra y Estados Unidos, generando exportaciones anuales de US\$5,729,745 (Agexport, 2021), y creando alrededor de 177,254 empleos en todo el país. Sin embargo, uno de los mayores problemas para la exportación de cítricos son las enfermedades que estos pueden llegar a tener, ya sea por bacterias, hongos, plagas o virus que afecten la calidad del fruto y el rendimiento de producción. Las plantas afectadas por alguna de estas enfermedades pueden disminuir la producción hasta un 35% y los árboles pueden morir en cuatro años (FAO, 2013)

Algunas de las enfermedades más conocidas que afectan a las plantaciones de cítricos son, el virus de la tristeza de los cítricos (CTV por sus siglas en inglés para *Citrus Tristeza Virus*) y los viroides. En Guatemala, el CTV fue detectado en 2003 y ha continuado su propagación (Cucul, 2012; Lin, et al., 2015). El CTV es considerado una de las virosis más importante y devastadora para este tipo de cultivo a escala mundial. Este se puede transmitir de manera semipersistente por algunas especies de áfidos, principalmente *Toxoptera citricida*. Este virus afecta a especies de naranjas, toronjas y limones (Chaparro et al. 2008). Los principales síntomas que presenta son, decaimiento, defoliación, detención del desarrollo y en muchos casos muerte (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2015)

Por otro lado, los viroides, son entidades subcelulares de menor complejidad genética y estructural que son conocidos por representar una forma externa de parasitismo y atacan principalmente a los vegetales (De Fitopatología, S.E., 2016). Se conoce que los viroides son transmitidos por diseminación de una planta a otra, a través de propagación vegetativa, contaminación mecánica, polen o semillas (Gergerich y Dolja, 2006). Estos causan serios problemas en las cosechas, presentando síntomas como la reducción de fruto y hojas, reducción del crecimiento del árbol y muerte (Gonzalez, 1995)

El propósito de este estudio fue determinar la presencia del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y de viroides en plantas de cítricos (Naranja, Mandarina y Limón) en distintos municipios del Departamento de Guatemala.

Materiales y Métodos

Recolección de muestra

Se realizó la recolección de hojas sintomáticas de limón (*Citrus x limon*), naranja (*Citrus x sinensis*) y mandarina (*Citrus reticulata*) en diferentes localizaciones dentro del departamento

de Guatemala; específicamente en la Ciudad de Guatemala, Santa Catarina Pinula, San Juan Sacatepéquez y Mixco. Luego, se preparó en tubos Eppendorf un total de 15 muestras a trabajar, en las cuales se incorporaron las hojas colectadas en los puntos de muestreo de cada departamento. En total, se obtuvieron cinco muestras para trabajar del municipio de Santa Catarina Pinula y cinco para el municipio San Juan Sacatepéquez; para ambos se preparó tres tubos con muestras sintomáticas, y dos con asintomáticas. En el caso del municipio de Mixco, se prepararon tres muestras, dos de ellas sintomáticas, y una asintomática. Para la Ciudad de Guatemala, se prepararon dos muestras de trabajo, una sintomática y la otra asintomática. Adicionalmente se incorporó a las pruebas la muestra control, positiva para viroides, la cual se obtuvo del invernadero de la Universidad Del Valle de Guatemala (Campus Central)

Se realizó el registro fotográfico a cada muestra, se registraron los síntomas, y se asignó un código acorde al número de muestra y sitio de muestreo: Ciudad de Guatemala (Ciu), Santa Catarina Pinula (CS), San Juan Sacatepéquez (SJ) y Mixco (Mix). También se asignó un código acorde al tipo de cítrico muestreado: limón (L), naranja (N), mandarina (M). Un ejemplo representativo de las mismas se muestra en la figura 1.

Detección de CTV mediante el ensayo de ELISA

Se realizó la detección del CTV en las muestras por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se trabajó acorde al protocolo establecido por Agdia (2021) para la detección serológica por el kit *ELISA Reagent Set for Citrus tristeza virus*. Se realizó la lectura de la placa pasada

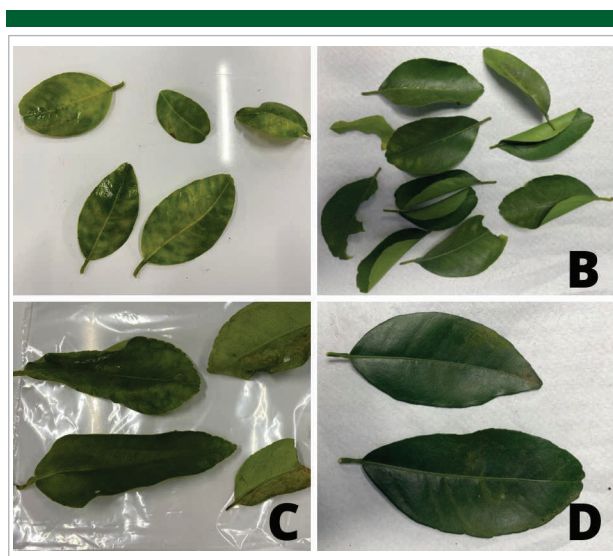


Figura 1. Muestras de cítricos de Ciudad de Guatemala (A, limón), Santa Catarina Pinula (B, mandarina), San Juan Sacatepéquez (C, limón) y Mixco (D, naranja) respectivamente.

1 y 2 horas de incubación en oscuridad, obteniendo en total dos lecturas de densidad óptica. Para evaluar los resultados se consideró como positivo para el virus, si la lectura de densidad óptica de la muestra era mayor que el doble de la media del control sano.

Extracción de ARN

La extracción de ARN para las muestras obtenidas fue realizada tomando en consideración el protocolo establecido por Locali y colaboradores (2003) con modificaciones del Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) de la Universidad del Valle de Guatemala (Campus Central) Para todo el proceso, las centrifugaciones fueron realizadas a 13,000 rpm a tiempo variado. Las modificaciones fueron las siguientes: las muestras fueron incubadas en frío durante 20 minutos, para luego macerar el tejido vegetal. Durante el proceso se adicionaron 200 μ l de fenol y 200 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), con centrifugación de 8 minutos. El precipitado final obtenido se secó al aire por 30 minutos, y fue resuspendido en 25 μ l de agua ultrapura. Se evaluó el estado del material genético extraído mediante geles de integridad, de los cuales se esperaba visualizar las subunidades ribosomales 18s y 28s del ARN.

Detección de viroides por RT-PCR de transcripción reversa

Se realizó la detección de viroides en las muestras sintomáticas mediante el ensayo de RT-PCR convencional. La transcripción reversa se fue realizada acorde al protocolo indicado por Promega (2018) para el kit *GoScript™ Reverse Transcription System*. Para la prueba de PCR, se preparó la mezcla de reacción utilizando la enzima *GoTaq® DNA Polymerase* de Promega™ en la siguiente reacción: *Buffer 5x*, $MgCl_2$ 25 mM, dNTPs 2.5 mM, *primers forward* y *reverse* 5 μ M, Taq polimerasa 5 U/ μ l y ajustando el volumen final a 25 μ l con agua libre de nucleasas. Se empleó el uso de *primers* generales para viroides. Tras preparar la mezcla de reacción se cargó el ADNc obtenido de la reacción de RT-PCR. Se configuró el programa para la amplificación con una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, para proceder con los 30 ciclos que incluye la desnaturalización del ADNc a 94°C durante 30s, el alineamiento de primers a 68°C por 45s, y la extensión de la polimerasa a 72°C por 45s. El paso final consistió en una extensión a 72°C durante 10 min.

Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los productos de amplificación de RT-PCR, se realizó la electroforesis en geles de agarosa, tomando de base el protocolo establecido por Padilla y colaboradores (2005) con modificaciones de LPV. Se preparó el gel al 1.33% de agarosa, agregando 0.4g de agarosa y 30 ml de buffer TAE 1X. Para cargar las muestras, se colocaron 4 μ l de producto y controles, a los que se agregó 1 μ l de buffer de

carga y 1 μ l de Gel Red. Se utilizó la escalera *PCR Marker* de 1000 pb de Promega™; esta fue la última en cargarse y se preparó de manera similar a los productos, pero agregando en su lugar 1 μ l de escalera. La electroforesis se programó a 85V durante 40 min y luego de la corrida, el gel fue visualizado en un transiluminador UVP™.

Resultados y Discusión

Detección de CTV mediante ELISA

La prueba de ELISA se llevó a cabo para detectar mediante enzimoimmunoabsorción la presencia de CTV en las muestras analizadas. De esta, se observó la presencia del virus en cuestión en las muestras sintomáticas pertenecientes a los municipios de San Juan Sacatepéquez, Ciudad de Guatemala y Mixco, así como para las muestras asintomáticas de Ciudad de Guatemala y Mixco, como está indicado en el cuadro 1. Lo anterior se determinó mediante las lecturas de absorción a 405 nm, donde la lectura de cada muestra positiva fue mayor al doble de la lectura promedio del control sano utilizado, siendo la lectura promedio de 0.450 ± 0.322 UA para las muestras positivas. El hecho de que muestras asintomáticas presentaran un resultado positivo puede implicar que la infección es ocasionada por una cepa moderada de CTV, dado que se ha reportado que estas pueden causar infecciones sin síntomas aparentes en cultivos de cítricos. Por otro lado, las muestras que presentan síntomas pueden ser indicativos de una infección por una cepa severa, lo que puede confirmado mediante una caracterización molecular (Lee y Keremane, 2013).

Detección de viroides mediante RT-PCR

El RT-PCR se efectuó con el fin de determinar la presencia de viroides en las muestras analizadas. Estas no presentaron banda de amplificación en el rango esperado (246-375 pb), indicando por ello, la ausencia de viroides en las muestras evaluadas (Strauss y Strauss, 2008). A pesar de esto, el resultado puede verse afectado debido al estado de las muestras, ya que la integridad del ARN extraído se vió afectada (figuras 2 y 3).

En el gel de integridad, no fue posible observar la banda correspondiente para las dos subunidades de ARN ribosomal eucariota, excepto para una de las muestras de limón provenientes de Santa Catarina Pinula (figura 3, CS L2). En su lugar se observó la presencia de ADN genómico contaminante, evidenciado como las bandas de mayor tamaño en el gel (figuras 2 y 3), y de ARN degradado. Con esto en consideración, el material genético no se encontraba en un estado óptimo para análisis moleculares, ya que se recomienda

Cuadro 1. Resultados de detección para las pruebas aplicadas sobre muestras sintomáticas y asintomáticas.

Municipio de procedencia	Sintomatología Presentada*	ELISA CTV		RT-PCR Viroides	
		Sintomáticas	Asintomáticas	Sintomáticas	Asintomáticas
Ciudad de Guatemala	Amarillamiento, inicio de mosaico, aclaramiento de las venas, manchas necróticas y cloróticas, daño por insecto.	+	+	-	-
Santa Catarina Pinula	Puntos cloróticos, amarillamiento, moteado, daño por insecto, crecimiento de hongo.	-	-	-	-
San Juan Sacatepéquez	Clorosis, moteado, necrosis, crecimiento de hongo, mosaico, amarillamiento, aclaramiento de las venas, daño por insecto.	+	-	-	-
Mixco	Clorosis, moteado, necrosis, crecimiento de hongo, mosaico, amarillamiento, aclaramiento de las venas, daño por insecto.	+	+	-	-

*La sintomatología reportada no corresponde a la totalidad de muestras analizadas por sitio ya que en algunos casos los árboles de cítricos eran asintomáticos.

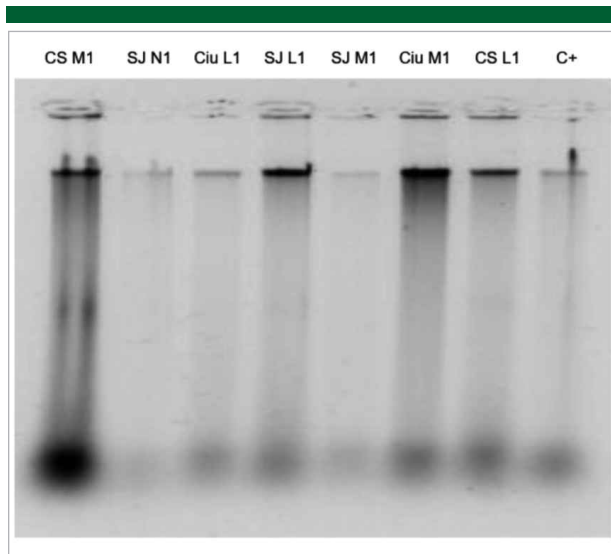


Figura 2. Integridad del primer grupo de ARN para la prueba de RT-PCR para viroides, visualizados en gel de agarosa al 1.33%.

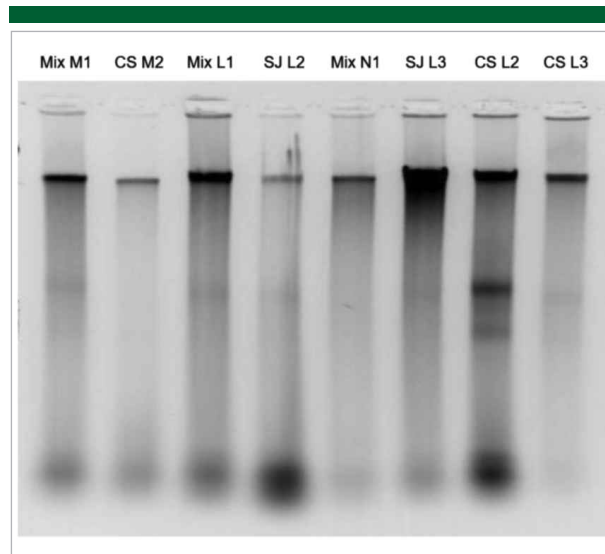


Figura 3. Integridad del segundo grupo de ARN para la prueba de RT-PCR de viroides, visualizados en gel de agarosa al 1.33%.

una proporción de subunidades 28s y 18s en 2:1, con bandas bien definidas en el gel de integridad (Skrypina et al., 2003; Palmer y Prediger, 2021). Tomando en cuenta lo anterior, no es posible garantizar la ausencia de viroides en las muestras analizadas, y se recomienda enfocar la prueba hacia la detección específica de un tipo de viroide de cítrico, acorde a la sintomatología que estos presentan.

Implicaciones y vista a futuro

Puesto que la prueba de detección fue positiva para CTV, se recomienda secuenciar un segmento del genoma del virus que permita determinar el tipo de cepa presente. De esta forma puede implementarse un plan de monitoreo y establecer si la cepa es de alta o baja severidad (CIPF, 2016) También

se recomienda el monitoreo del vector de CTV, *T. citricida*, cuya presencia en Guatemala ha sido confirmada acorde a estudios realizados por SENASICA (2019) Si bien, se observó la presencia de CTV en la Ciudad de Guatemala, debido a la ausencia de datos actuales respecto al vector en el país, no es posible establecer una relación entre su distribución y la presencia en los municipios. Por dicha razón, se requiere de estudios adicionales sobre la prevalencia del vector, de manera que pueda establecerse relación en los municipios evaluados.

Por último, es posible que los resultados negativos para ambas pruebas se deban a que el daño a la morfología de las hojas evaluadas fuese causado por insectos, a pesar de la presencia de síntomas. Ejemplo de esto fue el caso de las muestras de Santa Catarina Pinula, San Juan Sacatepéquez y Ciudad de Guatemala, en la cual se observó el daño característico del minador de hojas de los cítricos *Phyllocnistis citrella*. Este insecto forma parte de las plagas de los cítricos, el cual realiza daño directo a la hoja, lo que se observa en la figura 1 brindando una vía de entrada a bacterias que afectan a los cítricos (Asplanato, 2009). Por este motivo, se recomienda evaluar la presencia de insectos y bacterias en las muestras, de manera que estos puedan confirmar los síntomas presentados en el Cuadro 1, que no coincidieron con CTV o viroides.

Conclusiones y recomendaciones

- La metodología de enzimo-inmunoanálisis empleada fue efectiva para la detección de CTV en muestras de cítricos, ya que fue posible determinar su presencia en tres de los cuatro sitios trabajados. Para la identificación de la cepa específica, se recomienda secuenciar el ADN extraído, de manera que pueda establecerse un monitoreo respecto a la misma. Dada la obtención del resultado positivo, se recomienda considerar el uso de hongos entomopatógenos e insectos antagonistas para el control de *T. citricida*, vector del CTV. Adicionalmente, se recomienda erradicar las plantas a las cuales corresponden las muestras con presencia del virus, en caso los síntomas se agraven y se cuente con árboles de cítricos en las cercanías, para evitar diseminar la infección. En cuanto a los árboles con resultados positivos para CTV, pero que no presentaron síntomas, se recomienda evaluar la severidad de la cepa ya que al comprobar que esta sea del tipo moderada, podría evaluarse su uso para contribuir a los estudios asociados al desarrollo de resistencia hacia el virus en distintos hospederos de cítricos (Folimonova, 2013).
- Mediante el ensayo de RT-PCR efectuado, no es posible afirmar que las muestras están libres de viroides, dada la baja integridad de su material genético. Con esto en consideración, se recomienda extraer el mismo a partir de

muestras frescas, asegurarse de trabajar en un ambiente libre de RNAsas y realizar la extracción procurando la ausencia de contaminación que afecte la viabilidad de las muestras. Como forma alternativa, se recomienda el uso de técnicas adicionales, como hibridación con *northern blot*, para la detección de viroides en las muestras. Finalmente, se recomienda evaluar una posible infección bacteriana o presencia de insectos en el follaje, de manera que se determine si los síntomas observados corresponden a estos y no a una infección por viroide.

Agradecimientos

Agradecemos a la MSc. Martha Patricia Herrera González por su tiempo, dedicación, apoyo y recomendaciones para el desarrollo de este proyecto. Así mismo, agradecemos al Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios de la Universidad del Valle de Guatemala por proporcionarnos un espacio y recursos para realizar nuestra investigación. Por otro lado, agradecemos a las personas que nos proporcionaron las muestras ya que sin ellos esta investigación no hubiera sido posible.

Aporte de Autores

Autor 1 (JDDPG): Promotor del concepto de investigación. Diseño del estudio y experimentación. Análisis de datos. Redactor del artículo.

Autor 2 (JDDCV): Diseño del estudio y experimentación. Análisis de datos. Redactor del artículo.

Autor 3 (MASM): Diseño del estudio y experimentación. Análisis de datos. Redactora del artículo.

Autor 4 (MPHG): Promotora del concepto de investigación. Asesora durante el desarrollo de la investigación. Revisora del artículo.

Bibliografía

- Agdia (2021) ELISA Reagent Set for *Citrus tristeza virus* (CTV). User Guide: Compound-ELISA Reagent Set. Agdia. <https://orders.agdia.com/agdia-set-ctv-alkphos-sra-78900>
- Agexport. (2021) Comité de cítricos Guatemala. Recuperado de: <https://export.com.gt/publico/comite-de-citricos>
- Asplanato, G. (2009) El minador de la hoja de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* (LEPIDOPTERA: GRACILLARIIDAE): Bioecología y control biológico. Manejo integrado del Minador de los Cítricos, con énfasis en control biológico. Uruguay: Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.
- Chaparro, N. Velásquez, A, Rodríguez, J. (2008) Influencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el comportamiento de la lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre seis patrones en el piedemonte llanero de Colombia (1997-2008) Fisiología Vegetal 14 (1): 33-38.

- CIPF (2016) PD 15: *Virus de la tristeza de los cítricos. Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas*. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. Recuperado de: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_15_2016_Es_2017-01-31.pdf
- Cucul, J. (2012) *Determinación de áfidos e identificación de las enfermedades que producen los áfidos en la naranja (Citrus sinensis Osbeck)*, en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala [Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/6588/1/Trabajo%20de%20Graduacion%20Jimmy.pdf>
- Falimonova, S.Y. (2013) *Developing an understanding of cross-protection by citrus tristeza virus* *Frontiers in Microbiology* 4 (APR): 1-9.
- Gergerich, R, Dolja, V. (2006) *Introducción a los virus vegetales* Recuperado de: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/introduction/Pages/PlantVirusesEspañol.aspx>
- Gonzales, A. (1995) *Efectos de una fuente de virosis que contiene psorosis cóncava, exocortis y cachexia en plantas jóvenes de cítricos* 13 (2-3) p 26-30 Cuba.
- Lee, R., Keremane, M. (2013) *Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida* *Frontiers in Microbiology* 4: 1-11.
- Lin, C.H., Velásquez, J., Su, S., Morazán-Ocampo, C., Mejía, J. (2015) *Protocolo de manejo integrado de Huanglongbing*. Organismo Internacional Regional de la Sanidad Agropecuaria. [OIRSA]. El Salvador. F&G editoriales.
- Locali, E.C., Freitas-Astua, J., Alves de Souza, A., Takita, M.A., Astua-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E. W., Machado, M.A. (2003) *Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas* *Plant Disease* 87 (11): 1317-1321. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1317>
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2015) *Patógenos de plantas descritos en España* España: MAPA.
- Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L. (2008) *Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry* *Molecular Plant Pathology* 9 (2): 251-268. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [FAO] (2013) *Guatemala prepara plan contra la enfermedad de cítricos*. *Agronoticias* Recuperado de: <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/512458/>
- Padilla-Peña, C.A., Díez-Dapena, J., Martínez-Galisteo, E., Bárcena-Ruiz, J.A., García-Alfonso, C. (2005) *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico* España: Universidad de Córdoba.
- Palmer, M., Prediger, E. (2021) *Assessing RNA Quality*. TechNotes. Estados Unidos: Thermo Fisher Scientific.
- Promega (2018) *GoScript™ Reverse Transcription System*. Technical Manual. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol/>
- SENASICA (2019). *Pulgón Café de los Cítricos Toxoptera citricida (Kirkaldy)*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México: Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria.
- Skrypina, N., Timofeeva, A., Khaspekov, G., Savochkina, L., Beabealashvili, R. (2003) *Total RNA suitable for molecular biology analysis* *Journal of Biotechnology* 105 (1-2): 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00140-8)
- Strauss, J.H., Strauss, E.G. (2008) *Subviral Agents Viruses and Human Disease*, 345-368. doi:10.1016/b978-0-12-373741-0.50012-x

Cultura, Arte y Deportes



