



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS (UBIPRO)  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

---



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS EN  
CLAVEL (*Dianthus Caryophyllus* L.) EN VILLA  
GUERRERO ESTADO DE MÉXICO.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

---

PRESENTA:  
**JORGE ANTONIO OLMOS GUZMÁN**

---

DIRECTOR DE TESIS:  
**DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Tú puedes participar en grandes hazañas,  
como hicieron otros que se atrevieron. Tú puedes cambiar  
una existencia carente de sentido; define tu propósito  
y entrégate completamente a él para alcanzarlo.*

*Tener un propósito definido es una necesidad  
perentoria para hacer una contribución  
significativa a la sociedad.*

***POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU***

---

## AGRADECIMIENTOS

Supongo que en realidad no existen logros personales absolutos de cierta y única envergadura, si no por el concurso de la ayuda directa e indirecta de innumerables personas, que día a día, consciente e inconscientemente, definen ese entorno humano que nos permite, a cada uno, conseguir que nuestro esfuerzo pueda convertirse en algo gigantesco o pequeño, pero sumamente concreto. Mi sincero y agradecido reconocimiento a ¡**TODOS!** mis seres queridos, amigos, compañeros y familiares.

Ya en particular, en primer término quiero expresar mis profundos agradecimientos a mis **Padres** por su inmenso amor y su incondicional apoyo, que me han brindado todos estos años de vida y en el recorrido de este camino. A ti Mama, que siempre me has enseñado el valor de la vida levantándome cada que tropezaba, tu admirable orientación de madre para dirigirme a mí y a mis hermanos. A ti Papa, que me has guiado con tu baúl de enseñanzas, de fortalezas y valores a ser lo que hoy soy en día. A mis hermanos Carlos, Cesar y Paco que me ofrecieron su felicidad y su apoyo en tantos momentos. (*Mama, Papa y Hermanos sin ustedes no soy nada*).

También de manera muy especial quiero agradecer a mi Abuelito Antonio Olmos García, por siempre brindarme su gran apoyo en todos los sentidos, por pasar tantos momentos felices de mi infancia a tu lado, te agradezco tanto abuelo y doy gracias que aun te tengo a mi lado. A mi Abuelita Hermila Jiménez López, por demostrarme tu gran amor que me tienes y el gran amor a tu familia, eres la persona más valiente que conozco y más perseverante. (*Los quiero mucho abuelitos*).

En este agradecimiento quiero hacer una especial mención a Jimena Valadez, ya que sin ti no estaría redactando esto, contigo siempre estaré agradecido. ¿Por dónde empezar? Tengo que

empezar con el reconocimiento de que me hayan cruzado en tu camino, ese simple gran hecho hizo que concluyera este satisfactorio camino a tu lado; mi motor, mi fuerza básica que movía mi mundo, tu entrega total fue vital para darme cuenta que esta es mi verdadera vocación. Te correspondo tantas lecciones de vida que me diste y el cómo me enseñaste que las circunstancias de la vida cambian y que esas circunstancias también prospera nuestro camino de la vida, pero sobre todo te agradezco que creyeras en mí y que me brindaras tu cariño todos estos años **Jime** (*Gracias moustrito*).

A mi director de tesis Dr. Rodolfo de la Torre quiero expresar mi profundo agradecimiento, no sólo por su legado científico e intelectual, sino fundamentalmente por la confianza que me brindo y deposito en mí, aun cuando yo no la tenía.

A mis sinodales de tesis al Dr. Jorge Campos, a la Dra. Martha, al Dr. Saúl Flores y al Maestro Alejandro Monsalvo por ayudarme a pulir este trabajo y su disponibilidad para esto.

A todos mis compañeros de mi grupo por brindarme su amistad y todas las vivencias que compartimos juntos.

Como todo trabajo que involucra mucho tiempo, la lista es irremediabilmente larga, o al menos así lo percibo, por lo que me refugio en el lugar común de los límites del formato, de mi afectada sinapsis y los efectos de la vigilia anticircadiana para escapar a la enumeración, pero sin reclamar con ello el olvido.

Finalmente, este trabajo no termina porque también es, por último, el testimonio de un trabajo pendiente, la constancia de lo mucho que queda por hacer.....

## DEDICADO

A mis padres: Delia Guzmán González y Francisco  
Antonio Olmos Jiménez.

A mis abuelos: Antonio Olmos García y Hermila  
Jiménez López.

A: Jimena Valadez Mejía.

## I. ÍNDICE

II. ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
III. ÍNDICE DE CUADROS.....	9
IV. GLOSARIO.....	9
V. RESUMEN.....	10
VI. PALABRAS CLAVE.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	13
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE VIRUS .....	13
VIRUS QUE INFECTAN AL CLAVEL.....	14
MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE VIRUS.....	19
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE LA PROTEINA DE LA CÁPSIDE VIRAL (ELISA).....	21
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS FITOPATÓGENOS.....	21
ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ARN VIRAL DE DOBLE CADENA.....	21
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	22
CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
COLECTA DE MATERIAL.....	25
DETECCION SEROLOGICA DE PROTEINA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLOGICO LIGADO A ENZIMAS (DAS-ELISA).....	25
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	26
ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN	

VIRAL (ARNdc).....	26
SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) .....	26
TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	26
SECUENCIACIÓN.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PROTEÍNA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS	
(DAS-ELISA).....	29
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	30
ELECTROFORESIS DE ARN REPLICATIVO DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc).....	31
SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	33
TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .....	33
SECUENCIACIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXOS.....	48
ANEXO 1. DAS- ELISA.....	48
ANEXO 2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DOBLE CADENA.....	51
ANEXO 3. PROTOCOLO DE RT-PCR EN TRES PASOS PARA AMPLIFICAR LOS VIRUS DEL CLAVEL.....	54
ANEXO 4. LIMPIEZA CON WIZARD SV GEL Y PCR CLEAN UP SYSTEM.....	55

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Aspecto general del clavel ( <i>Dianthus caryophyllus</i> L.).....	12
Figura 2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de ARN de doble cadena de origen viral obtenido de muestras de clavel con síntomas de virus (100 Volts, 2.45 hrs., tenido con solución de nitrato de plata 0.011 M) carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8 y 9 patrones de ARNdc de virus de clavel, carril 10 patrón de referencia ARN-dc de CM.....	31
Figura 3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de ARN de doble cadena de origen viral obtenido de muestras de clavel con síntomas de virus (100 Volts, 2.45 horas., tenido con solución de nitrato de plata 0.011 M) carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 patrones de ARNdc de virus de clavel.....	32
Figura 4.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%(100 Volts, 80 ampo, durante 55 min. Tenidos con bromuro de etídio) de los productos de RT- PCR con los oligonucleótidos CarMV (1723/1724), en el carril 1.-Marcador de peso molecular 1 Kb plus. Carril 2.- espacio vacío. Carril 3, 4, 5, 6, 7 y 8.- CarMV. Carril 9. Control negativo y carril 10 control positivo.....	33
Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%(100 Volts, 80 amp, durante 30 min. Tenidos con bromuro de etídio) de los productos de RT- PCR con los oligonucleótidos CERV (1725/1726), en el carril 1.-Marcador de peso molecular 1 Kb plus. Carril 2.- espacio vacío, 3, 4, 6, 8 CERV 9.- control negativo (agua libre de nucleasas) y 10.- control positivo CarMV....	34
Figura 6.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%(100 Volts, 80 amp, durante 30 min. Tenidos con bromuro de etídio) de los productos de RT- PCR con los oligonucleótidos CMV (Fo/Do), en el carril 1.-Marcador de peso molecular 1 Kb plus. Carril 5, posible CMV.....	35
Figuras 7.- Representación esquemática del virión y del genoma unipartita de <i>Carnation mottle virus</i> (CarMv), en el cual se observa el virón de ARN infeccioso (tomado de ViralZone, instituto Suizo de Bioinformática).....	38

Figuras 8.- Representación esquemática del virión y el genoma monoportita de doble cadena de DNA de aproximadamente 8000 pares de bases del *Carnation etched ring virus* (CERV) (tomado de ViralZone instituto Suizo de Bioinformática).....41

Figuras 9.- Representación del virión y del genoma tripartita de RNA de cadena sencilla positiva del *Cucumber mosaic virus* (CMV) (tomado de ViralZone instituto Suizo de Bioinformática).....42

### III.- ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Oligonucleótidos específicos y sus secuencias para la detección de los virus más comunes en clavel en el mundo.....27

Cuadro 2.- DAS-ELISA Antisuero de CarMV. Los signos positivos muestran la intensidad con relación a las muestras positivas (7C y 7D).....29

Cuadro 3.- Muestra nombre de la secuencia, número de acceso del GeneBank, gen amplificado y el porcentaje de similitud con los demás registros de las muestras de clavel que se pudieron secuenciar en el caso de CarMv.....36

Cuadro 4. - Muestra nombre de la secuencia, número de acceso del GeneBank, gen amplificado y el porcentaje de similitud con los demás registros en la base de datos de Gene bank de las 12 muestras seleccionadas de CERV.....39

### VI. GLOSARIO

ARN-dc: Se refiere a ARN (ácido ribonucleico) doble cadena, el cual se forma durante la replicación de virus que tienen un genoma compuesto de ARN monocatenario.

Cápside: la capsida vírica, es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros. En el interior de esta capsida se encuentra siempre el material genético del virus. Puede estar rodeada por una envoltura. Cada capsómero puede estar constituido por una o varias proteínas distintas. El termino nucleocápside se refiere al material genético

envuelto en su capsídeo.

**DAS-ELISA:** La DAS-ELISA (doble sándwich) es una de las técnicas basadas en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

**dNTP:** Dideoxinucleótidos trifosfatos que son el sustrato que sirve para polimerizar nuevo ADN.

**Electroforesis:** Técnica para la separación de moléculas, según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

**Encapsidación:** Proceso mediante el cual el ácido nucleico de un virus es capturado e incorporado dentro de una capsídeo.

**Fitopatología:** Ciencia de diagnóstico y control de enfermedades de plantas.

**Genoma:** Es la totalidad de la información genética que posee un organismo en particular

**Oligonucleótidos:** Es una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos. Tienen distintas funciones: se utilizan como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación y en bloqueos específicos de ARN mensajero.

## **V. RESUMEN**

En recorridos realizados durante 2010 y 2011 en invernaderos comerciales de producción de clavel en la localidad de Villa Guerrero, Estado de México, se observaron daños de moteados estriados de color amarillo y deformación de hojas, además de reducción de la talla de las plantas afectadas, causados probablemente por virus desconocidos. Se realizó la detección de proteína viral, por serología del tipo DAS-ELISA, utilizando 15 antisueros comerciales para detectar un número similar de virus distintos que pudieran estar infectando a *Dianthus caryophyllus* L. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos de origen viral de *Dianthus*

*caryophyllus* L. con síntomas, para realizar análisis electroforéticos de RNAdc genómico de origen viral. El ARN viral se utilizó como templado para realizar ensayos de transcriptasa inversa ligado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando distintos juegos de oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos del gen de la proteína de la cápside de los virus que infectan comúnmente al clavel en el Mundo. Estos fragmentos fueron, secuenciados y comparados con la base de datos disponibles en el GenBank. Por serología se detectó la presencia del *Carnation mottle virus* (CarMV. Carmovirus) en la mayoría de las plantas de clavel evaluadas. El análisis electroforético de RNAdc viral mostró los perfiles genómicos de CarMV y del *Cucumber mosaic virus* (CMV. Bromoviridae), virus no reportado previamente en *Dianthus caryophyllus* L. en el mundo. Se confirmó la presencia e identidad por comparación de secuencias nucleotídicas del CarMV y CERV (Carnation etch ringspot virus). En el presente trabajo se reporta por primera ocasión a estos virus en México y en el Mundo.

**VI. PALABRAS CLAVE:** Diagnóstico, ELISA, RT-PCR, secuenciación.

## INTRODUCCIÓN

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) (Figura 1), pertenece a la familia *Cariophyllaceae* y al género *Dianthus*, esta familia presenta 86 géneros y 2200 especies distribuidas en todo el mundo (Stevens, 2001). La familia *Cariophyllaceae* es cosmopolita; abundante en las regiones templadas del mundo (Izco, 1998). El clavel es una planta ornamental perenne de base leñosa, con tallos de hasta 80 cm de altura, con hojas lineares y flores en grupo; es de origen mediterráneo y de gran demanda en el mercado de flores a nivel mundial (Stevens, 2001). En la actualidad, el clavel ocupa un destacado lugar en el mundo de la producción de flor cortada, junto a sus excelentes características de belleza, posee cualidades que la hacen especialmente apta para su comercialización. En nuestro país se tienen las condiciones para ampliar la

producción de clavel como por ejemplo: bajo costo de mano de obra, menor costo de producción y fácil manejo y transporte en la cosecha. Por lo que cada vez adquiere un mayor valor entre las plantas ornamentales.



**Figura 1.-** Aspecto general del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.)

En nuestro país el Estado de México es el único productor de clavel, en donde se cultivan cerca de 702.6 hectáreas, obteniéndose cerca de 5,274.3 miles de gruesas, con un valor anual de ventas de 579.6 millones de pesos (SAGARPA 2009). El clavel se encuentra entre una de las cinco especies florícolas con mayor demandada en el mercado nacional e internacional (INEGI, 2011).

Sin embargo una de las causas más comunes del crecimiento deficiente o alteraciones de las funciones de las plantas son las enfermedades, causadas por: hongos, bacterias, micoplasmas, plantas superiores parasitas, protozoarios, nematodos, virus y viroides. Estos patógenos debilitan células y tejidos de las plantas que infectan, por lo que éstas alteran sus funciones, dando como resultado que mermen su crecimiento o mueran (Agrios, 1996).

En recorridos de campo realizados en 2010 y 2011 en zonas productoras de clavel de Villa Guerrero en el Estado de México, se detectaron diversas clases de daños en esta planta ornamental como: moteados, rayas de color amarillo claro de hojas, reducción de la talla de la planta y de la flor. Los análisis fitopatológicos en el laboratorio del material recolectado con los daños antes discutidos, índicos que estos probablemente eran causados por virus. En México no se han descrito o caracterizado a los probables virus que afectan al clavel, por tanto los objetivos del presente trabajo fueron: La identificación y caracterización de los virus que afectan al clavel en México.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE VIRUS

Los virus son parásitos celulares obligados, que consisten de una o varias moléculas de ácido nucleico (ARN o ADN), con una cubierta de naturaleza proteica denominada cápside; algunas especies contienen una envoltura (lipoproteínas) y espículas (glicoproteínas). Típicamente un virus ingresa en una célula a través de un receptor de superficie celular por el que tiene afinidad o por heridas en la membrana celular, ya sea por daño directo o con ayuda de un vector. Una vez en el interior de la célula, el virus toma el control de la maquinaria biosintética de la célula, para multiplicar todos sus componentes, incluido el genoma. En muchos casos, el proceso de multiplicación genómica es propenso a errores, por lo cual genera numerosas mutaciones (Kindt *et al.*, 2007).

Cada especie de virus tiene un nombre oficial que permite su identificación por reconocimiento de algunas de sus características generales. El nombre del virus, en idioma inglés, está constituido por tres o cuatro palabras. La primera describe al hospedero, por lo general, o al sitio geográfico donde, históricamente, fue encontrado; la segunda describe el síntoma principal; finalmente la tercera palabra: virus que viene del latín *virus*, que significa “veneno”. Las características físicas, químicas y biológicas de cada especie de virus permite agruparlos

en su correspondiente grupo taxonómico, aunque existen innumerables y probables nuevas especies de virus sin nombre o sin categoría, otras características importantes son el modo de transmisión y la distribución del virus.

## **VIRUS QUE INFECTAN AL CLAVEL**

En clavel *Dianthus caryophyllus* L. se han descrito 18 especies de virus diferentes a nivel mundial (Brut *et al.*, 1996). Los virus más frecuentes de encontrar en clavel son:

### *Alfalfa mosaic virus* (**AMV**. ALFAMOVIRUS)

Este virus fue reportado por primera vez en E.U.A. por Weimer en (1931), con síntomas persistentes que desaparecen después de la infección, es transmitido de diferentes maneras incluyendo su insecto vector *Myzus persicae*, por inoculación mecánica y por polen infectado, no es transmitido por contacto entre plantas. Su distribución es mundial y su amplitud de hospedantes susceptibles abarca a nueve familias botánicas. Las plantas infectadas muestran lesiones necróticas locales, moteados o manchas anulares (Gibbs, 1987).

### *Arabis mosaic virus* (**ArMV**. NEPOVIRUS)

Fue reportado por primera vez en *Arabis hirsuta* en Inglaterra por Smith and Markham en 1944, sus síntomas remiten después de la infección. Es transmitido por los nematodos *Xiphinema bakeri*, *X. coxi*, y *X. diversicaudatum*, también son transmitidos por inoculación mecánica, pero no por contacto entre plantas. Se distribuye en regiones Africanas, Euroasiáticas y en norte América. Este virus afecta a más de 9 familias botánicas (Murant, 1984).

### *Beet curly top virus* (**BCTV**. HYBRIGEMINIVIRUS)

Fue reportado por primera vez en E.U.A por Ball 1909 en *Beta vulgaris*. La transmisión vía vector es por insectos, no es trasmisible por la progenie de estos, tampoco se trasmite por

inoculación mecánica. Su distribución pudiese abarcar África, Euroasia, regiones del mediterráneo y probablemente toda América (Boswell, 1985).

*Beer mosaic virus* (**BtMV**. POTYVIRUS)

Fue reportado por primera vez en *Beta vulgaris*, en Alemania por Scheider y Mundry en 1956. Este virus es transmitido por más de 28 especies de vectores incluidos *Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *Rhopalosiphum padi*, *Acyrtosiphon* (Metopolophium) *dirhodum*, *Macrosiphum* (Sitobion) *avenae*. También es transmitido por inoculación mecánica y por injerto. No es transmitido por contacto entre plantas, ni por semilla ni por polen. Su distribución es probablemente en todo el mundo (Heathcote *et al.*, 1982).

*Carnation mottle virus* (**CarMV**. CARMOVIRUS)

El CarMV fue reportado por primera vez en el Reino Unido por Kassanis en 1955. Su transmisión es por inoculación mecánica, también es transmitido por contacto entre plantas. Su distribución probablemente sea en todo el mundo. Este virus afecta a más de 9 familias, presentando diferentes síntomas dependiendo la familia; causa pequeñas lesiones locales cloróticas, líneas cloróticas, malformaciones y lesiones locales necróticas. La morfología de sus partículas menciona que son viriones isométricos; de 34 nm de diámetro; su genoma consiste de RNA lineal de cadena sencilla, tiene un genoma unipartita (Tremaine *et al.*, 1985).

*Carnation virus* (**CBV**. RHABDOVIRUS)

Este virus de morfología baciliforme se reportó por primera vez en clavel en Nueva Zelanda por Bennet y Milne en 1976. Solo se ha reportado susceptibilidad en dos especies. No se conoce mucho sobre este virus (Brunt, 1990).

*Carnation 1 virus* (**CCV-1**. ALPHACRYPTOVIRUS)

Este virus fue reportado en clavel en Italia por Lisa y colaboradores en 1980. No se transmite por vectores, aunque es probable que se transmita por injerto. Su distribución probablemente

es Mundial. Es un virus isométrico sin envoltura de 29 nm en diámetro. Su material genético consiste de RNA doble cadena linear (Milne *et al.*, 1991).

*Carnation 2 virus* (**CCV-2** ALPHACRYPTOVIRUS)

Fue reportado por primera vez en *Dianthus caryophyllus* en Italia por Boccardo y colaboradores en 1987. No se conoce sobre su transmisión, ni tampoco su distribución mundial (Boccardo *et al.*, 1987)

*Carnation etched ring virus* (**CERV**. CAULIMOVIRUS)

Fue reportado por vez primera en Inglaterra por Hollings y Stone en 1960. Sus síntomas son manchas y líneas necróticas, aunque muchas veces no presenta síntomas. Este virus es transmitido de forma semi-permanente por un vector *Myzus persicae*, también es transmitido por inoculación mecánica e injerto, no se transmite por contacto entre plantas, ni tampoco por semilla. Este virus afecta a más de 3 familias botánicas. Su genoma consiste de DNA de doble cadena, circular y linear (Hammond *et al.*, 1987).

*Carnation Italian ringspot virus* (**CIRV**. TOMBUSVIRUS)

Fue reportado por primera vez en el reino unido en plantas provenientes de Italia y de Estado unidos por Hollings en 1970. Sus síntomas son manchas cloróticas y anillos en las hojas y un ligero retraso de crecimiento. El virus es transmitido por inoculación mecánica. Su distribución probablemente este limitada en Alemania, Italia, Inglaterra y estados unidos de norte América. Su genoma consiste en RNA de cadena sencilla (Brunt, 1995).

*Carnation latent virus* (**CLV**. CARLAVIRUS)

Este virus fue reportado por primera vez en Inglaterra por Kassanis en 1955. El virus CLV puede ser transmitido por el insecto *Myzus persicae* y también por inoculación mecánica, sin embargo no se trasmite por contacto entre plantas y ni por semilla. Su distribución probablemente sea en todo el mundo. Su rango de hospederos incluye a plantas de 3 familias

botánicas. Los síntomas presentes a consecuencia de este virus son moteados y lesiones necróticas locales. El virus es filamentososo, no envuelto; su genoma consiste de RNA de cadena simple, de genoma unipartita (Moran, 1987).

*Carnation necrotic fleck virus (CNFV. CLOSTEROVIRUS)*

El Carnation yellow fleck virus fue reportado en clavel en Japón por Inouye y Mitsuhata en 1973. Los síntomas *en clavel* son moteados, rallas necróticas, rallas grises o manchas rojas necróticas. Su transmisión es por medio de un Aphido, esta transmisión es semipermanente aun que el virus no se transmite congénitamente a la progenie del vector, también se puede transmitir por inoculación mecánica. Su distribución probablemente sea en todo el mundo. Su rango de hospedero probablemente sea de más de 3 familias. Su morfología es de viriones filamentosos flexibles, su genoma consiste de RNA de cadena sencilla, de genoma unipartita (Moran *et al.*, 1987).

*Carnation ringspot virus (CRSV. DIANTHOVIRUS)*

Este virus fue reportado en el Reino Unido por Kassanis en 1955. Las plantas infectadas presentan moteados y anillamientos en las hojas, distorsión y bajo crecimiento en las plantas al igual que en las flores. Este virus es transmitido por nematodos *Longidorus elongatus*, *L. macrosoma* y *Xiphinema diversicaudatm*. También se transmite por inoculación mecánica, injerto, y contacto entre plantas, no es transmitido por semillas. Probablemente su distribución sea en todo el mundo. Susceptibilidad probablemente sea hasta de 9 familias. Su genoma consiste de RNA linear de cadena sencilla (Tremaine *et al.*, 1985).

*Carnation vein mottle virus (CVMV. POTYVIRUS)*

CVMV fue reportado por primera vez en Estados Unidos por Kassanis en 1954, puede ser transmitido por un insecto y por inoculación mecánica. Su distribución probablemente sea en

todo el mundo. Su rango experimental de hospederos incluye a especies ubicadas en más de 3 familias botánicas. Los síntomas que presentan la mayoría de plantas infectadas son lesiones locales cloróticas y necróticas. La morfología de sus partículas son viriones filamentosos no envueltos usualmente flexibles; el genoma consiste de RNA de cadena sencilla (Moran *et al.*, 1987).

*Carnation yellow stripe virus (CYSV. NECROVIRUS.)*

El necrovirus fue reportado por primera vez en Apulia al sur de Italia en *Dianthus caryophyllus* por Rana *et al.*, en 1977. Este virus es transmitido por inoculación mecánica. Su distribución está limitada en Italia. Su rango de hospederos es aproximadamente de 9 familias. Plantas infectadas experimentalmente muestran lesiones necróticas y cloróticas. Su morfología es isométrica y su genoma consiste de RNA de cadena sencilla, su genoma es unipartita (Gallitelli, 1991).

*Lettuce infectious yellows virus (LIYV. CLOSTEROVIRUS)*

Fue reportado por primera vez en *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* y *Daucus carota* en California y Arizona en Estados Unidos por Duffus *et al.*, 1982. Los síntomas que presentan las plantas infectadas son clorosis severa y/o enrojecimiento, fragilidad en las hojas y retraso en el crecimiento. Su transmisión es por el insecto *Bemisia tabaci (Aleyrodidae)*, esta transmisión es semi-persistente, el virus no es multiplicado en el vector y tampoco es transmitido por inoculación mecánica. Su rango de hospederos es probablemente mayor a 9 familias. Su morfología es de viriones filamentosos usualmente flexibles, su genoma consiste de RNA de cadena sencilla (Duffus *et al.*, 1986).

*Melandrium yellow fleck virus (MYFV. BROMOVIRUS)*

Su primer reporte fue en *Melandrium album* en Hungría por Hollings y Stone en 1978. Los síntomas que induce se caracterizan por líneas amarillas. Su transmisión es por inoculación

mecánica. La distribución geográfica probablemente este restringida en Hungría. El rango experimental de hospedantes es de más de 9 familias botánicas. La morfología del virus es isométrica de 25 nm de diámetro aproximadamente, su genoma consiste en RNA de cadena simple (Horváth, 1987).

*Potato M virus* (**PVM**. CARLAVIRUS)

Fue reportado por primera vez en *Solanum tuberosum* en Estados Unidos de Norte América por Schultz y Folsom en 1923 y posteriormente Bagnall en 1956. Los síntomas que causa son moteados, mosaicos, arrugas, enrollamiento abaxial de las hojas y retraso en el crecimiento de los brotes. Su transmisión puede ser por insectos *Myzus persicae*, *Aphis frangulae* y *Macrosiphum euphorbiae*, de forma no persistente, el virus también puede ser transmitido por inoculación mecánica e injerto. Su distribución es mundial, principalmente en cultivares de papa. Su rango experimental de hospedero es de menos de 3 familias. Su morfología son viriones filamentosos no envueltos, su genoma consiste de RNA de cadena sencilla y su genoma es unipartita (Bokx, 1987).

*Tobacco stunt virus* (**TStV**. VARICOSAVIRUS)

Este virus es reportado por primera vez en *Nicotina tabacum* en Japón por Hidaka en 1950. Este virus es transmitido por un hongo *Olpidium Brassicae*, también su transmisión puede ser por inoculación mecánica e injerto; no se transmite por semilla ni polen y tampoco por contacto entre plantas. Su distribución probablemente sea solo en Japón. Este virus puede llegar a infectar más de 9 familias botánicas (Kuwata, 1985).

## MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE VIRUS

Para la identificación de los virus se toman en cuenta diversos criterios prevaleciendo el de los síntomas observados en campo, sin embargo resultan insuficientes ya que estos pueden ser el

resultado de la presencia de más de un virus o muchos virus causan síntomas similares en el mismo cultivo (Chapman y Hall, 1991). Por lo que a la fecha se han desarrollado diversas técnicas para el diagnóstico de un gran número de virus.

Algunos métodos tienen ventajas inmediatas por lo rápido que permiten obtener resultados, sin embargo existen algunos otros que aunque resultan de gran utilidad biológica por facilitar el conocimiento de algunas de las propiedades de los virus, tienen grandes desventajas por el tiempo que toman obtener los resultados. Algunos métodos por mencionar son: transmisión mecánica (biobalística), transmisión por biovectores, se utilizan los vectores naturales de los virus para la separación o inoculación artificial del virus, microscopio electrónico, para observar partículas virales o células del tejido infectadas, serología que es un ensayo inmunoenzimático como la ELISA (De La Torre, 2003).

La correcta identificación de un virus como agente causal en la planta constituye un punto de partida importante para adoptar medidas adecuadas de lucha (Conti, 2001).

Los métodos para detectar un virus se basan en los síntomas que la planta presenta, determinar la morfología del virus, el tipo de ácido nucleico y las proteínas estructurales o funcionales de sus proteínas. La morfología de un virus solo es posible apreciarla mediante el uso del microscopio electrónico; mientras que el reconocimiento de ácidos nucleicos se basa en el reconocimiento de secuencias virales y en cuanto al reconocimiento de algunas de sus proteínas la detección del virus se lleva a cabo mediante anticuerpos específicos a través de ensayos tipo ELISA (Coll, 1993).

El análisis molecular de ácidos nucleicos incluye innumerables técnicas de laboratorio. Algunas de las técnicas de análisis de ácidos nucleicos que se utilizan comúnmente para el diagnóstico de virus son: análisis electroforético de ARN replicativo viral, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, así como la hibridación de ácidos nucleicos (De La Torre, 2003).

## **DETECCIÓN SEROLOGICA DE LA PROTEINA DE LA CAPSIDE VIRAL**

### **ELISA (ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS)**

En este procedimiento se incrementa la sensibilidad en la detección de la reacción antígeno anticuerpo uniendo cualquiera de estos dos reactivos a una enzima, se agrega después un sustrato y da como resultado una reacción con color que puede ser medida cuantitativamente y permite detectar virus aun en baja concentración, este procedimiento se desarrolló por primera vez en 1977 por Voller, pero numerosas variaciones de ELISA son utilizados para la identificación de virus patógenos. De estos el de “sándwich de doble anticuerpo” es el más utilizado (Chapman y Hall, 1991).

La técnica de ELISA es un ensayo de diagnóstico específico, rápido y sensible, relativamente barato, utilizado ampliamente para el diagnóstico de virus fitopatógenos. El primer inconveniente de esta técnica es que se requiere el antisuero específico para cada virus, que no necesariamente están disponibles en el mercado, ya que se necesita incrementar y purificar al virus de interés que se utilizará como inmunógeno y después purificar el antisuero del animal utilizado para generar los anticuerpos, además de conjugarlos con las enzimas de la reacción de ELISA. Otro inconveniente radica precisamente en su especificidad hacia ciertos virus y no detectar incluso variantes filogenéticamente relacionadas, por lo que es necesario realizar pruebas adicionales de diagnóstico de enfermedades.

## **CARACTERIZACION MOLECULAR DE VIRUS FITOPATOGENOS**

### **ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ARN VIRAL DE DOBLE CADENA**

El genoma del 90% de los virus que infectan plantas está constituido de uno o varios componentes de ARN de cadena sencilla (ARNcs). Durante la replicación del genoma viral, se

produce el ARN de doble cadena (ARNdc), que corresponde al híbrido de la cadena viral positiva (+) y la copia negativa (-), ésta última sirve de templado para la formación nuevas y múltiples copias del ARN viral (+). En esta etapa se acumula una gran cantidad de ARNdc como un producto intermediario, conocido como la forma replicativa viral (FRV) (Valverde, 1990). La técnica de extracción y análisis electroforético de ARNdc de origen viral, permite visualizar los componentes del genoma viral y se ha utilizado como un método de diagnóstico para detectar múltiples virus que afectan a plantas.

El análisis electroforético de ARNdc de origen viral es un método de diagnóstico barato y relativamente rápido y puede servir como un análisis presuntivo para determinar infecciones por un virus o una mezcla de virus en una sola planta. Sin embargo, este método de diagnóstico viral requiere tener cierto conocimiento previo de los patrones electroforéticos de los virus más comunes que afectan a plantas o determinar previamente con precisión el patrón del virus que se está procesando en un diagnóstico, por lo que no es muy específico y podría prestarse a errores de interpretación sino no se complementa con otros métodos de diagnóstico viral.

## **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, fue desarrollada por Kary Mullis en la década de 1980 y consiste en utilizar dos oligonucleótidos para dirigir la síntesis de una secuencia específica de ADN. Cada uno de los oligonucleótidos se une a las hebras de ADN, los sitios donde se unen los oligonucleótidos, generalmente están separados por unos cientos de pares de bases (100-1000 pb).

Las repeticiones de los ciclos de polimerización y desnaturalización permiten el incremento exponencial de la secuencia de interés (Bangham, 1991). La amplificación de una doble cadena de ADN no se limita únicamente al ADN genómico, puede aplicarse también a la doble cadena de ADNcd que es sintetizado a partir del ARNm mediante la utilización de una enzima

reversa transcriptasa y posteriormente se realiza la PCR (Dubey, 2009).

El diagnóstico viral basado en la PCR (para virus de ADN) o la reacción de la transcriptasa reversa ligada a la PCR (RT-PCR) es específica y muy sensible para detectar virus y otros patógenos que se encuentran infectando plantas en bajas concentraciones. La técnica es muy específica, rápida y relativamente barata, cuando se cuenta con el equipo y los reactivos necesarios, que requieren una inversión inicial considerable. Sin embargo, para utilizarla como técnica de diagnóstico podría resultar muy cara cuando se analizan numerosas muestras. Por otro lado, también se requiere un conocimiento previo del o los virus que están infectando a la planta en estudio y posteriormente verificar si los productos obtenidos corresponden al virus bajo estudio, por tanto y al igual que las otras técnicas de diagnóstico, la PCR y la RT-PCR requieren de verificaciones complementarias, en este caso por ejemplo la clonación y secuenciación de ácidos nucleicos virales.

## **CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES**

La clonación es el proceso por medio del cual se obtienen múltiples copias de un segmento de ADN de interés, que puede corresponder a un gen o a un segmento del mismo, a los que se les designa como inserto, mediante su incorporación o ligación a un plásmido (elemento extracromosómico bacteriano de ADN de doble cadena). El componente plásmido-inserto, son introducidos a una célula competente permisiva (regularmente cepas especiales de *Escherichia coli*), replicado a la par del genoma de la célula permisiva, obteniéndose múltiples copias del plásmido-inserto. Posteriormente son separados el ADN de la bacteria y el complejo plásmido-inserto. Este último puede ser secuenciado utilizando oligonucleótidos específicos que solo amplifican las regiones flanqueadoras y el inserto. En ambos casos, las secuencias obtenidas tienen que ser analizadas y editadas para eliminar secuencias del plásmido o de los oligonucleótidos que hayan sido incorporadas durante el proceso clonación (Dubey, 2009).

Actualmente, el proceso de secuenciación es llevado a cabo con equipo automático especializado en cuestión de horas.

## JUSTIFICACIÓN

La gran importancia que tiene la floricultura en la balanza comercial, al igual que el valor generado y el empleo ocupado, le hace aparecer como una de las grandes alternativas en un ambiente de crisis generalizada del sector agricultor mexicano. Por tanto es vital para la comercialización en América Latina y el Caribe que estos estén sometidos en diferentes gradientes a un proceso de modernización en materia agrícola, que favorece su comercialización internacional. El Área de Libre Comercio de las Américas (ALCA) se ha dado a la tarea de integrar a todos los países pertenecientes de América del Sur, para que exista un comercio sin barreras, dentro de los territorios que los conforman. Parte principal de este proceso y para garantizar una agricultura sana, es el uso de medidas sanitarias, fitosanitarias y de salud alimentaria, así como la adopción por todos los países de una serie de procesos y técnicas relacionadas, tales como el análisis de riesgo de introducción de plagas y enfermedades en un país infectado a uno libre. También se tiene el objetivo de desarrollar y dar a conocer diversas metodologías de diagnóstico de plagas, patógenos, malezas y enfermedades (Sosa-Moss *et al.*, 1997).

La detección oportuna de virus fitopatógenos es uno de los grandes aspectos fundamentales en la comercialización y distribución de plantas de ornato en donde, por ejemplo, el clavel por su alto valor estético y su alta demanda no solo en México, representa una fuerte pérdida económica para los productores, que sin embargo tienen que contar con elementos que les permitan certificar que su producto esté libre de virus, que podría ser peligroso para la economía agrícola de los países receptores de estas plantas, por lo que imposibilita la exportación y por ende la prospección de abrirse a nuevos mercados.

Considerando el valor económico que representa el clavel en la industria florícola mexicana y considerando que diversos daños están mermando el rendimiento y la calidad de esta planta bajo cultivo, causados probablemente por virus, el objetivo de este trabajo fue:

## **OBJETIVOS**

Identificar y caracterizar a los virus que afectan al clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Villa Guerrero, Estado de México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **COLECTA DE MATERIAL**

Se recolectaron 47 plantas de clavel en viveros comerciales en Villa Guerrero, Estado de México, con síntomas de manchas o moteados y rayas amarillas, así como deformación de hojas. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico cerradas y se transportaron al laboratorio y se mantuvieron en congelación a -20° C, hasta el procesamiento de la extracción de ARN.

### **DETECCIÓN SEROLÓGICA DE PROTEINA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLÓGICO LIGADO A ENZIMAS (DAS-ELISA)**

Se realizó la detección de infecciones virales en las 47 muestras recolectadas en los invernaderos, mediante la técnica DAS-ELISA en dos días (Clark y Adams, 1977; Chantler y Clayton, 1988), utilizando anticuerpos específicos de kits comerciales, a una dilución 1/200 µl y 1 g de tejido con daños macerado en 10 mL de solución amortiguadora de extracción, siguiendo las instrucciones del fabricante (Agdia Elkhart, IN). Las reacciones se consideraron positivas con la presencia de color amarillo en los pocillos y en relación a la intensidad del color

de los testigos positivos. (Anexo 1). Los anticuerpos utilizados en el presente estudio fueron: *Cucumber mosaic virus* (CMV. Cucumovirus), *Tobacco mosaic virus* (TMV. Tobamovirus), *Alfalfa mosaic virus* (AMV. Alfamovirus), *Tobacco etch virus* (TEV. Potyvirus), *Tomato bushy stunt* (TBSV. Tombusvirus), *Tobacco ringspot virus* (TRSV. Nepovirus), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV. Tospovirus) y el específico para *Carnation mottle virus* (CarMV. Carmovirus), uno de los virus más comunes de encontrar infectando al clavel en el Mundo.

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

### **ELECTROFORESIS DE ARN DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNDC)**

Se extrajo ARNdc viral a partir de 3.5 g de hojas de las 47 muestras de clavel con alguno de los daños antes descritos, purificado en columnas de celulosa CF-11 (Valverde *et al.*, 1990) (Anexo 2). El ARN se almaceno a -20°C hasta su uso.

El ARNdc se separó por electroforesis en geles de Poliacrilamida al 6%, utilizando 40 µl del extracto de ARN-dc por cada muestra por carril. (Valverde *et al.*,1990). (Anexo 2).

### **SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)**

#### **TRANSCRIPTASA INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Para la caracterización y confirmación de la identidad de los posibles virus en clavel se realizaron ensayos de RT-PCR en tres pasos, utilizando el Kit One step de Promega (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, en las 47 muestras de clavel. Se utilizaron 8 diferentes juegos de oligonucleótidos, que corresponden a los virus más frecuentes de encontrar en clavel en el Mundo: CarMV, CERV, CLV, CIRSV, CRSV, CVMV y CNFV, que

amplifican fragmentos específicos del genoma de cada virus (Cuadro 1). La enzima utilizada fue la transcriptasa inversa AMV y Las condiciones de amplificación para la RT, en general, fueron: Primer paso: 95 °C durante 5 minutos y después 42 °C 45 minutos. Posteriormente la PCR se llevó a cabo con la enzima Taq polimerasa con las condiciones: un ciclo a 96 °C durante 5 minutos; después 30 ciclos a 96 °C 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos y 72 °C 30 segundos; un ciclo a 72 °C durante 7 minutos y finalmente un solo ciclo a 14 °C por tiempo indefinido (Anexo 3).

**Cuadro 1.-** Oligonucleótidos específicos y sus secuencias para la detección de los virus más comunes en clavel en el mundo.

<b>OLIGONUCLEÓTIDOS</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>CarMV (1723)</b>	<b>5´CACACTCGAGCTTTGAAGACTGGGTCG3´</b>
<b>CarMV (1724)</b>	<b>5´CACAGTCGACTAGTTTGGCATCATC3´</b>
<b>CLV (1644)</b>	<b>5´CACCTCGAGAACTTTAACGGTTCGAAC3´</b>
<b>CLV (1645)</b>	<b>5´CACGTCGACGGAAAAATATTTAAAAC3´</b>
<b>CVMV (1736)</b>	<b>5´AAACTCGAGTTACCTTGAATTCCAC3´</b>
<b>CVMV (1737)</b>	<b>5´ATCAAGGTCGACTCCTCCACG3´</b>
<b>CNFV (1731)</b>	<b>5´CACACTCGAGGTAATAATAAGTTGC3´</b>
<b>CNFV (1732)</b>	<b>5´CACAGTCGACACTAAACAAAAGGTATC3´</b>
<b>CRSV (1729)</b>	<b>5´CACACTCGAGGCGGCGAACTACGACC3´</b>
<b>CRSV (1730)</b>	<b>5´CACAGTCGACTCAATAGTATAATCCAG3´</b>
<b>CIRSV (1727)</b>	<b>5´CACACTCGAGCCGGTGTGCAGACACG3´</b>
<b>CIRSV (1728)</b>	<b>5´CGAACTCGACGAAGTAATCACTCC3´</b>

<b>CERV (1725)</b>	<b>5´CACACTCGAGTCAAATCTCTATAAGTT3´</b>
<b>CERV (1726)</b>	<b>5´CACAGTCGACTTGGTGTATTTAGGTT3´</b>
<b>CMV-Do</b>	<b>5´GCCGTAAGCTGGATGGACAA3´</b>
<b>CMV-Fo</b>	<b>5´TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG3´</b>

Los productos de la RT-PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% a 100 Volts, 80 amp, durante 45 minutos y teñidas con bromuro de etidio. Los amplicones del peso esperado fueron separadas del gel y purificadas con el kit comercial WIZARD (Promega, USA) (Anexo 4).

## **SECUENCIACIÓN**

El ADN ya purificado se concentró y se secuenció en el secuenciador automático modelo ABI 3100 de 16 capilares, que utiliza el método BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing, ubicado en el laboratorio de bioquímica molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Las secuencias virales fueron depositadas en el GenBank/NCBI para obtener su número de acceso. Todas las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con la base de datos del GenBank, utilizando Clustal W ver. 2.2, para realizar comparaciones y determinar la homología de los amplicones obtenidos por RT-PCR. Las secuencias seleccionadas fueron depositadas en el Genbank para obtener los números de acceso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## DETECCION SEROLOGICA DE PROTEINA VIRAL POR ENSAYO INMUNOLÓGICO

### LIGADO A ENZIMAS (DAS-ELISA)

Se detectaron infecciones positivas para el antisuero correspondiente al *Carnation mottle virus* (CarMV) en las 47 muestras analizadas (Cuadro 2) y ninguna resultó positiva para los otros antisueros de los virus utilizados en el presente trabajo. El ensayo por DAS-ELISA resultó muy sensible para detectar en forma rápida al CarMV en dos días y prácticamente en todas las muestras, por lo que se sugiere como un ensayo rápido de diagnóstico de este virus en forma rápida y eficiente.

**Cuadro 2.-** Detección serológica de proteína viral por ensayo inmunológico ligado a enzimas (DAS-ELISA) para 47 muestras de plantas de clavel infectadas. Los signos positivos muestran la intensidad del patrón colorimétrico de los antisueros comerciales (Agdia Elkhart, IN) para el virus CarMv con respecto a los controles positivos (carril 7 C y D).

	1	2	3	4	5	6	7
A	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	
B	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	
C	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	
D	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	
E	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	
F	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	
G	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>+++</u>	<u>+++</u>	
H	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	<u>++</u>		

Resultados similares obtuvo González en 1988, al comparar la técnica DAS-ELISA con el método de hibridación molecular no radioactivo, para la detección del CarMV en muestras de clavel infectado con este virus. El diagnóstico se complementó con observaciones del tipo de partícula viral bajo el microscopio electrónico, demostrando la presencia del CarMV en variedades comerciales propagadas en el país, así como las de importación proveniente de Europa y Estados Unidos de América.

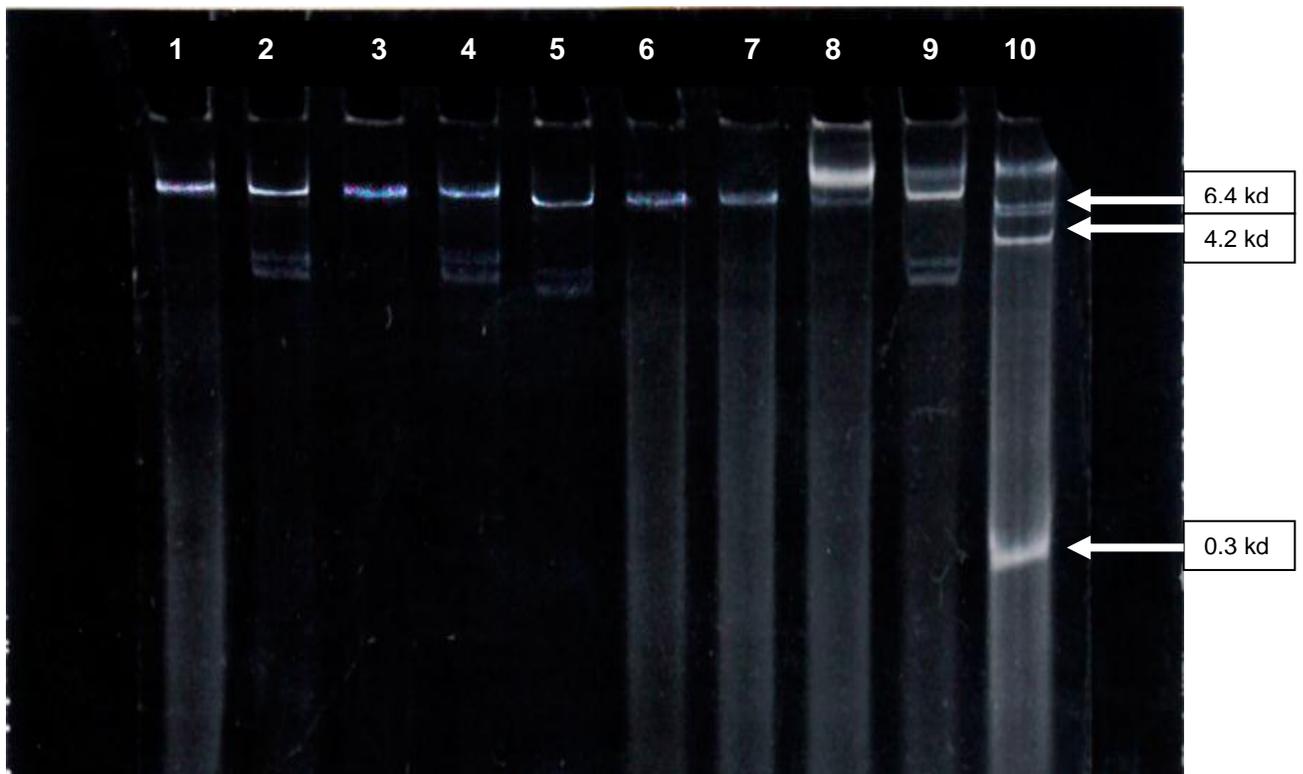
Por otro lado, Guzmán en 1996 comparó las técnicas serológicas de ELISA-SDA y aglutinación de látex para el diagnóstico del virus del moteado del clavel (CarMV) en México, demostrando que ambas técnicas resultaron apropiadas para el diagnóstico de este virus en clavel. La técnica de ELISA-SDA fue capaz de detectar concentraciones de hasta 84 ng/ml, con diluciones de gama globulina y de conjugado de hasta 1:2,000 y 1:500 respectivamente, mientras que en la técnica de aglutinación de látex mostro menos sensibilidad, detectando 420 ng/ml de virus con diluciones de 1/64 del antisuero y de 2 10<sup>3</sup> ng/ml del antígeno purificado con diluciones 1/128 del antisuero.

A pesar de que la técnica de ELISA es un ensayo de diagnóstico específico, rápido y sensible, relativamente barato, utilizado ampliamente para el diagnóstico de virus fitopatógenos e independientemente de su costo, esta prueba no está exenta de inconvenientes, ya que solo detecta al virus del cual fue obtenido el antisuero y puede no detectar variantes de la misma especie de virus. La especificidad de la prueba no permite detecta a otros virus de otras especies en infecciones mixtas en la misma planta, por lo que es necesario realizar pruebas adicionales de diagnóstico de virus.

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

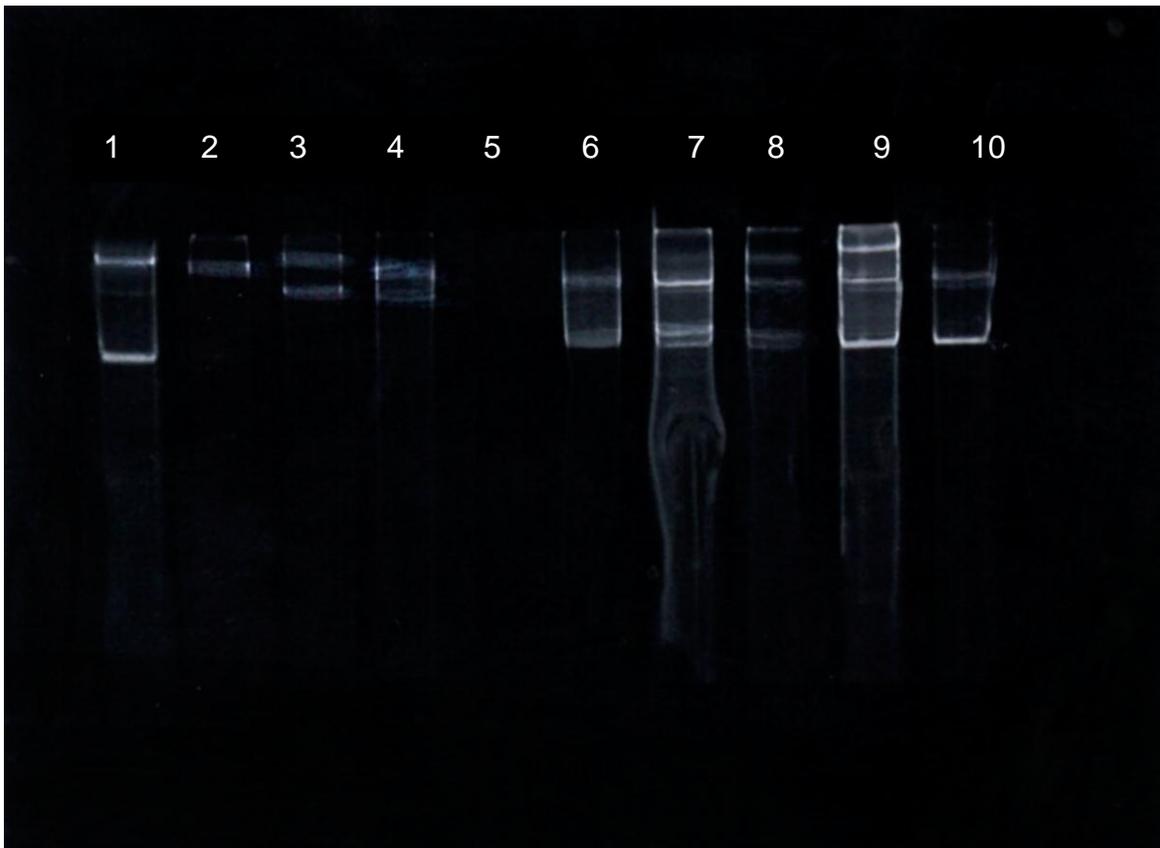
## ELECTROFORESIS DE ARN DE DOBLE CADENA DE ORIGEN VIRAL (ARNdc)

Se observaron bandas de ARNdc de diferente peso molecular en los ensayos de electroforesis en geles de poliacrilamida, de probable virus, en las muestras de clavel recolectadas y con daños de probable origen viral. Se observó una banda de aproximadamente 8.4 Kd que se identificó como perteneciente al genoma del CarMV en 46 muestras (Figura 3). También se observaron bandas de 6.4, 6.2, 4.2 y 2.0 Kd que corresponden al patrón electroforético del genoma de Cucumber mosaic virus en 5 muestras (Figura 4). En 40 muestras se observaron bandas de ARNdc de diferentes pesos, que pudieran corresponder a virus desconocidos o no identificados, que infectan al clavel.



**Figura 2.-** Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de ARN de doble cadena de origen viral (ARN-dc). Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 muestras de ARN-dc de origen viral de clavel.

Carril 10 patrón de referencia ARN-dc de CMV.



**Figura 3.-** Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de ARN-dc de origen viral. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 muestras de ARN-dc de origen viral de Clavel. Carril 10 patrón de referencia ARN-dc de CMV.

El análisis electroforético de ARNdc de origen viral es un método de análisis presuntivo para determinar infecciones por un virus o una mezcla de virus en una sola planta, relativamente barato y rápido. Sin embargo, este método de diagnóstico viral no es muy específico, por lo que podría prestarse a errores de interpretación sino no se complementa con otros métodos de diagnóstico viral. Este método requiere tener cierto conocimiento previo de los patrones electroforéticos de los virus más comunes que afectan a plantas. Otro inconveniente es que se requiere cierta concentración de las formas replicativas del virus (FRV) o ARNdc para obtener patrones electroforéticos claros y conocer con precisión el patrón del virus que se está procesando en un diagnóstico, finalmente y en muchas ocasiones es necesario el manejo

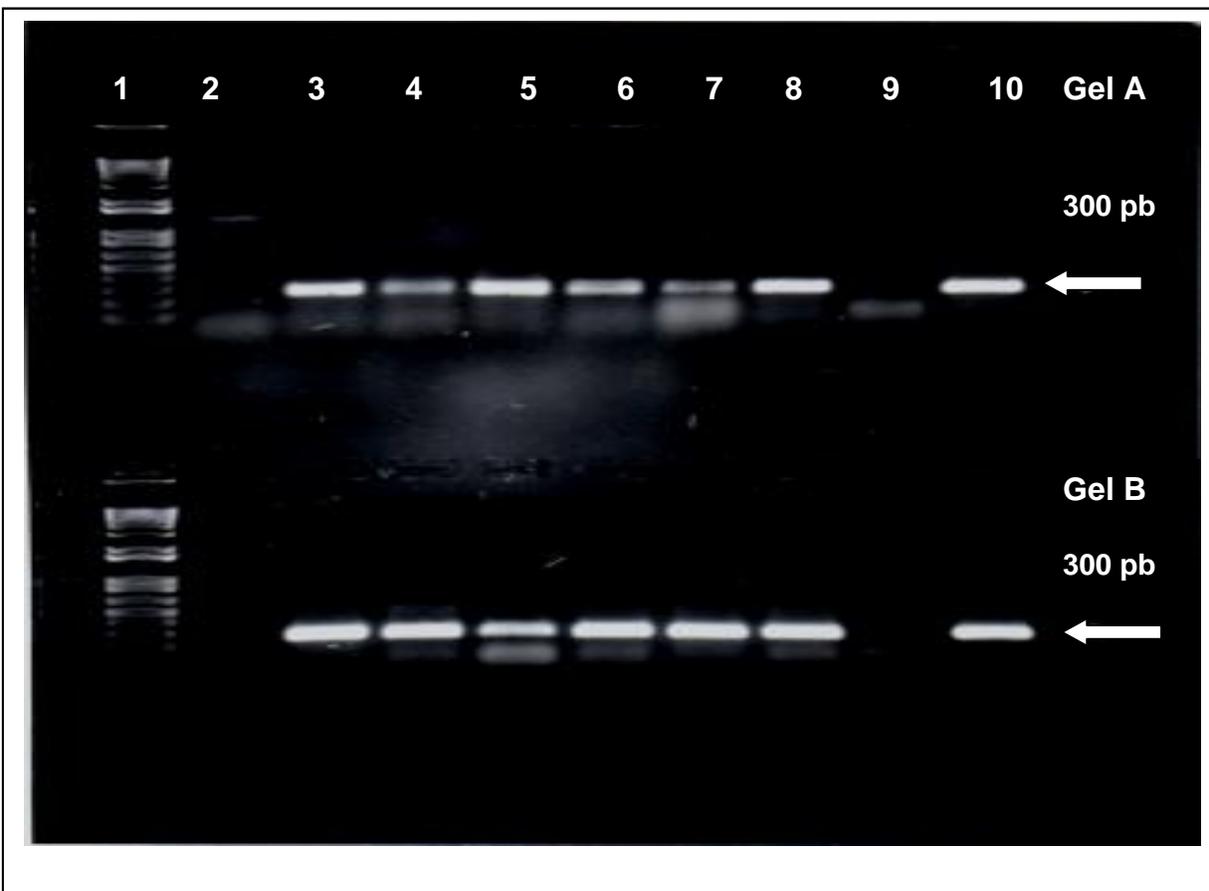
adecuado del equipo, reactivos y condiciones de la electroforesis (Valverde, 1990).

Sin embargo, la principal ventaja del análisis de ARNdc es que permite detectar infecciones en mezcla en plantas infectadas y sería el primer análisis presuntivo en el diagnóstico viral.

### **SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)**

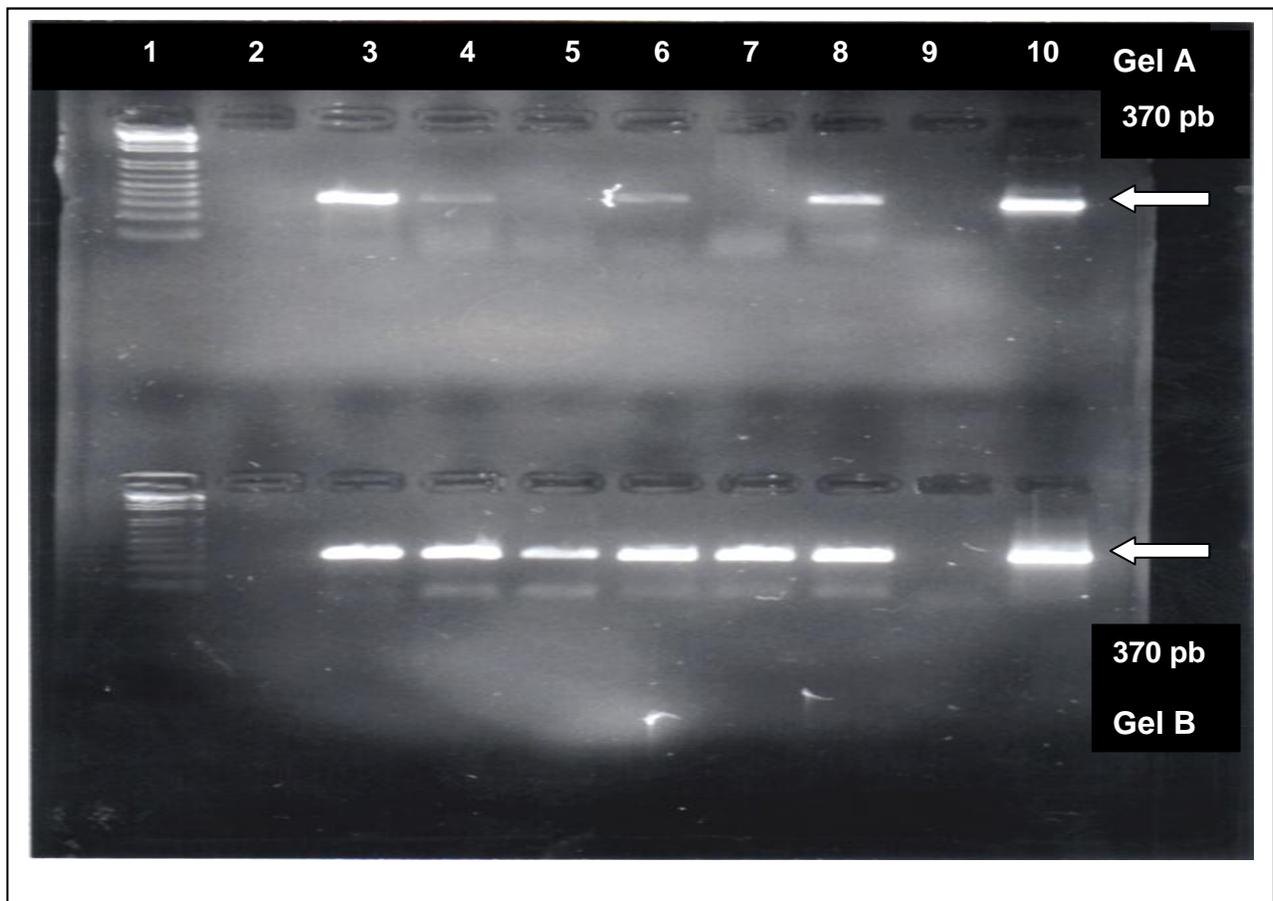
#### **TRANSCRIPTASA INVERSA LIGADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Se obtuvieron productos de la RT-PCR en numerosas muestras de clavel que permitieron confirmar la presencia de los virus CarMV, CERV y CMV. Las 47 muestras fueron positivas para el CarMV al obtener un amplicon de 300 pb. (Figura 5).



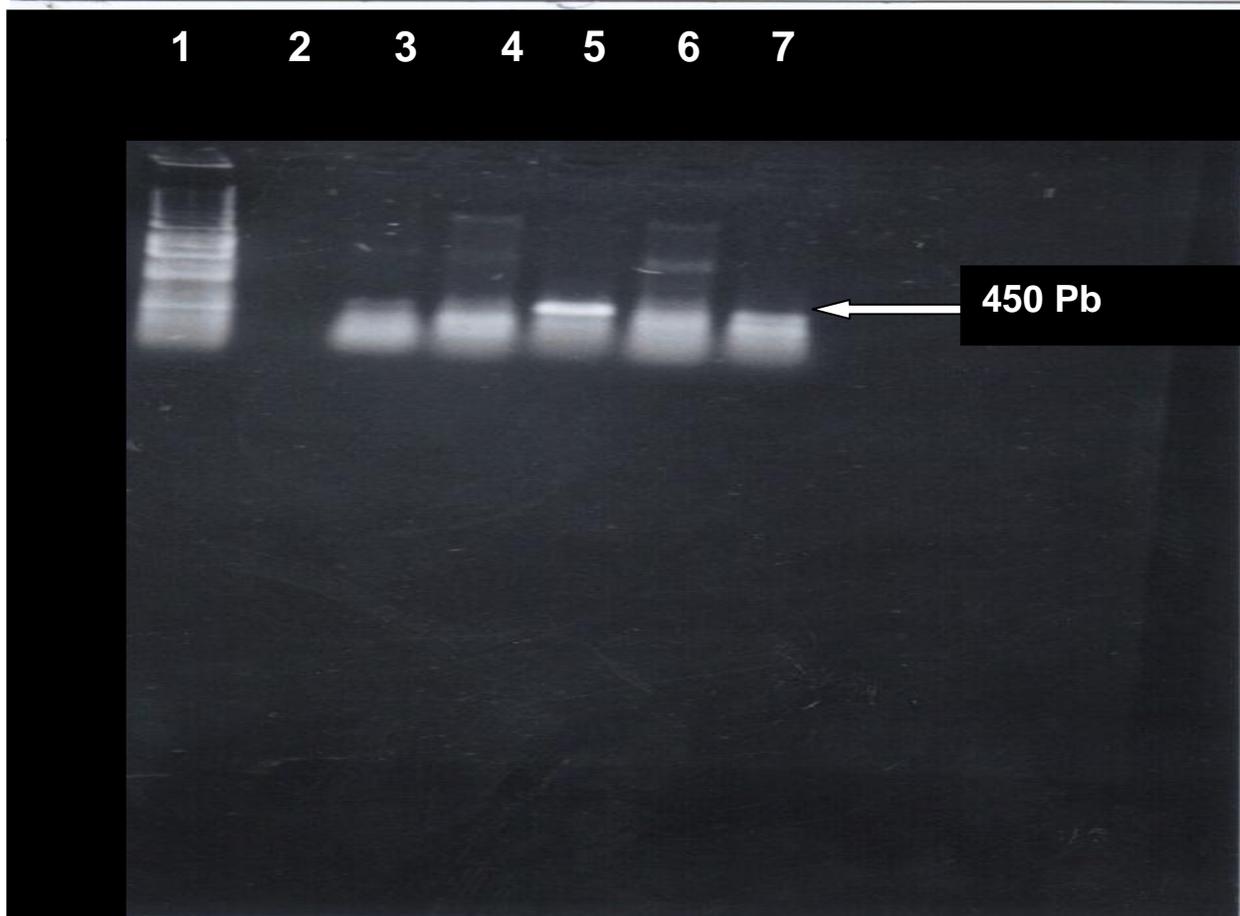
**Figura 4.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos CarMV (1723/1724). Gel A; Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb plus. Carril 2: espacio vacío. Carril 3, 4, 5, 6, 7 y 8 productos amplificados. Carril 9: control negativo y carril 10: control positivo. Gel B; en el carril 1: Marcador de peso molecular 1kb plus. Carril 2: espacio vacío. Carril 1, 4, 5, 6, 7 y 8 productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para CarMV. Carril 9. Control negativo y carril 10: control positivo.

En 25 muestras se obtuvieron amplicones de 370 pb que corresponden al producto predicho para CERV (Figura 6).



**Figura 5.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de RT-PCR de los oligonucleótidos específicos CERV (1725/1726), Gel A; carril 1. Marcador de peso molecular 1 Kb plus Carril 2. Espacio vacío, carriles 3, 4, 6, y 8 productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para CERV, carril 9 control negativo y carril 10 control positivo. Gel B; carril 1. Marcador de pesos molecular 1Kb plus, carril 2. Espacio libre, carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para CERV, carril 9 control negativo y carril 10 control positivo

En una muestra se obtuvo un amplicon de 450 pb que corresponde al CMV (Figura 7).



**Figura 6.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de RT.PCR con los oligonucleótidos específicos CMV (Fe/Do). En el carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus. Carril 2: espacio vacío. Carril 5: producto de los oligonucleótidos específicos para CMV.

Los resultados de la RT-PCR indicaron una mayor frecuencia de infecciones por CarMV, seguido por el CERV y al final el CMV en las 47 muestras analizadas, señalando claramente que en las muestras de clavel analizadas coexisten al menos estos tres virus.

## SECUENCIACIÓN

Se confirmó la identidad de los virus CarMv, CERV y CMV por secuenciación directa de los productos de la RT-PCR, así como por su análisis y comparación con secuencias similares disponibles en el GenBank/NCBI.

Se obtuvieron 10 secuencias de CarMV, correspondientes a 10 plantas distintas de clavel. El análisis y comparación entre las secuencias del CarMV obtenidas del clavel y con las disponibles en el GenBank indicó una homología del 96-99 % (Cuadro 4) que indica que la variante del CarMV, obtenida del clavel de México, es la más común y la más ampliamente distribuidas en el Mundo.

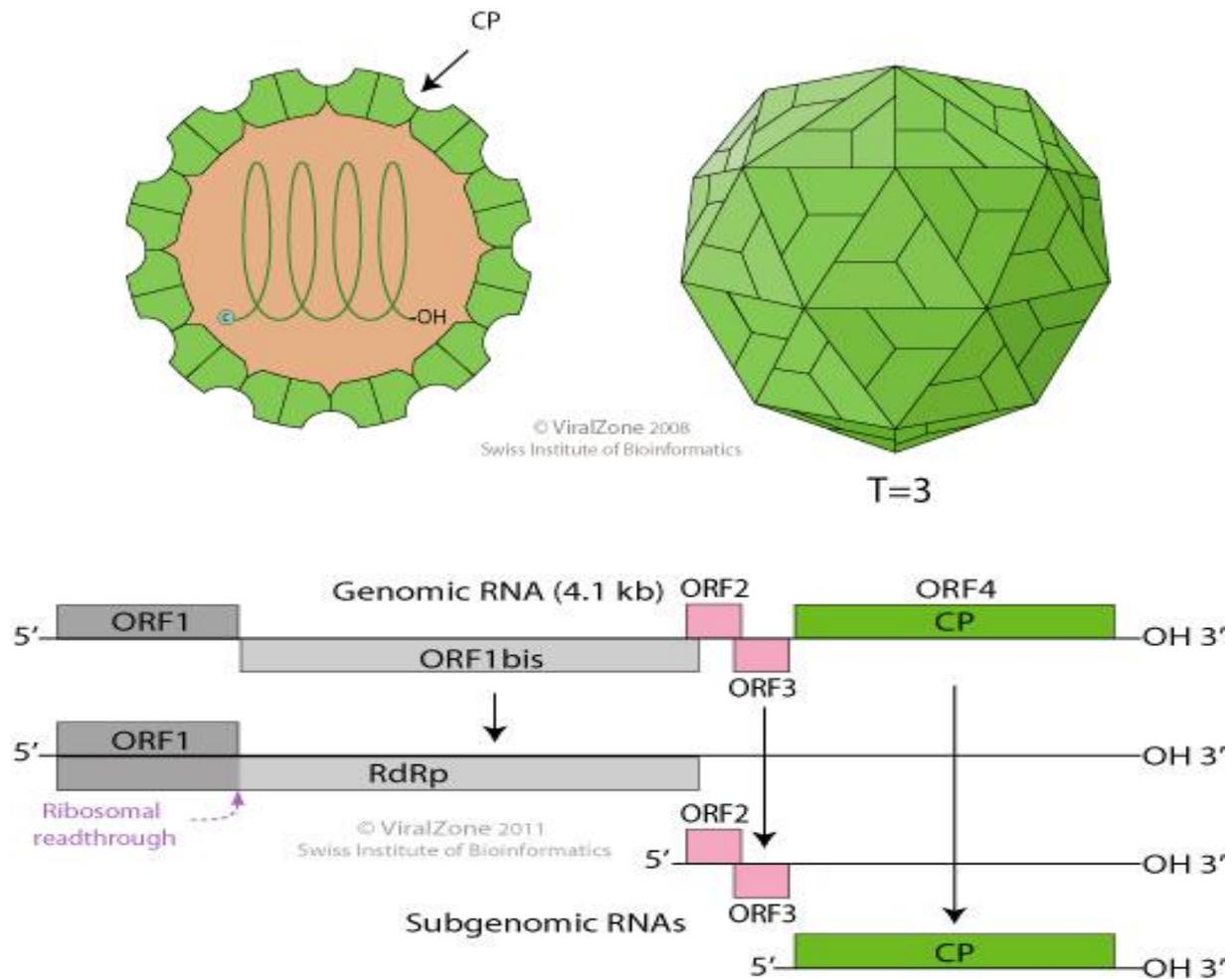
Nombre de la secuencia	No. acceso del GenBank	Gen	Máxima identidad.
17 CARMV_CarMV-R	HQ704793	Proteína de la cápside	98%
18-CARMV_CarMV-R	HQ704792	Proteína de la cápside	97%
19-CARMV_CarMV-R	HQ704790	Proteína de la cápside	97%
20-CARMV_CarMV-R	HQ704797	Proteína de la cápside	98%
21-CARMV_CarMV-R	HQ704795	Proteína de la cápside	96%
22-CARMV_CarMV-R	DQ092485	Proteína de la cápside	97%
23-CARMV_CarMV-R	AJ309501	Proteína de la cápside	96%
25-CARMV_CarMV-R	HQ704797	Proteína de la cápside	99%
26-CARMV_CarMV-R	HQ704792	Proteína de la cápside	98%
27-CARMV_CarMV-R	HQ704793	Proteína de la cápside	99%

**Cuadro 3.-** Muestra nombre de la secuencia, número de acceso del GeneBank, gen amplificado y el porcentaje de similitud con los demás registros en la base de datos de GeneBank de las 10 muestras seleccionadas del virus CarMv, mostrando la homología con éstas.

El CarMV fue reportado por primera vez en *Dianthus caryophyllus* L. en México, con técnicas serológicas por (González 1986) y (Guzmán 1996), pero cabe destacar que este es el primer reporte sobre su caracterización molecular, que confirma su identidad y alta homología con otras variantes distribuidas en otras regiones geográficas, que además señala probablemente una alta capacidad infectiva, facilitada por la movilidad del hospedante entre los productores de esta planta ornamental.

CarMV es reportado por primera ocasión en *Dianthus* spp en el Reino Unido. Este virus se distribuye por todo el Mundo. No se transmite por insectos vectores, pero si por transmisión mecánica, por injerto y contacto entre plantas y no se transmite por semilla. Infecta en forma natural a *Dianthus caryophyllus*, *D. barbatus*, *Saponaria vaccaria*, *Begonia elatior*, *Begonia x cheimantha*, *Daphne odora*, *Dianthus chinensis*, *D. Superbus* y *Saponaria officinalis*. En forma experimental puede infectar a más de 9 familias botánicas.

El virión de CarMV es una partícula isométrica, sin envoltura, de 28-34 nm de diámetro, con una capsida T=3 de simetría icosaédrica, con 30 capsómeros hexaédricos (Figura 8) pero con un perfil redondo en bajo el microscopio electrónico; es un virus con un solo componente de ARN de cadena sencilla, con un tamaño de 4.5 Kb (Figura 9), colocando a este virus en la familia Tombusviridae y al género Carmovirus. El virión contiene un 20% de ácido nucleico y 80% de proteína.



**Figuras 7.-** Representación esquemática del virión y del genoma unipartita de *Carnation mottle virus* (CarMv), en el cual se observa el virión de ARN infeccioso (tomado de ViralZone, instituto Suizo de Bioinformática).

Se obtuvieron 12 secuencias del CERV, correspondientes a 12 plantas distintas de clavel. El análisis y comparación entre las secuencias del CERV obtenidas del clavel y con las disponibles en el GenBank indicó una homología de 97-100%, (Cuadro 5) que indica que esta es idéntica a la variante más ampliamente distribuida del CERV en el Mundo.

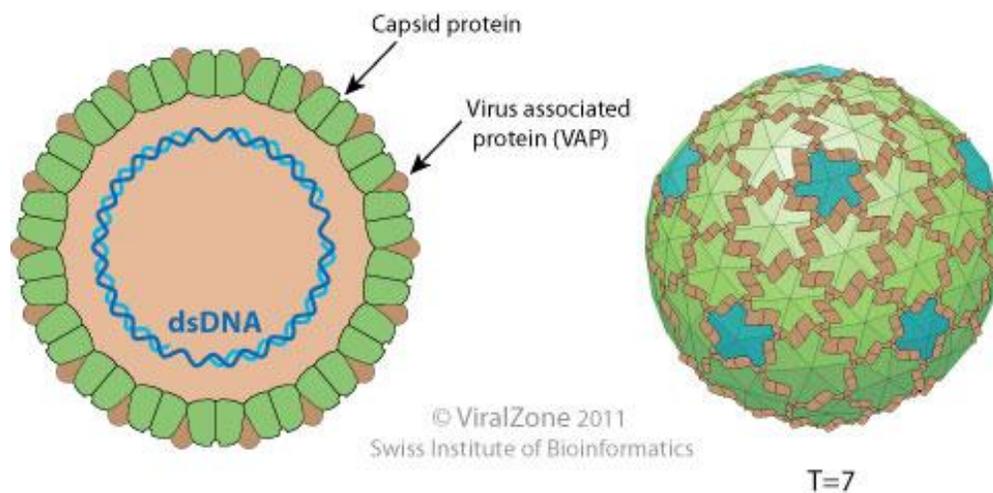
Nombre de la secuencia	No. acceso del Genbank	Gen	Máxima Identidad.
1-CERV_1725	HQ848662.1	Proteína de la capsida	97%
2-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%
3-CERV_1725	HQ848662.1	Proteína de la capsida	100%
4-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%
5-CERV_1725	X04658.1	Proteína de la capsida	99%
6-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%
7-CERV_1725	HQ848662.1	Proteína de la capsida	99%
8-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%
9-CERV_1725	HQ848662.1	Proteína de la capsida	99%
10-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%
11-CERV_1725	HQ848662.1	Proteína de la capsida	99%
12-CERV_1726	AJ853858.1	Proteína de la capsida	99%

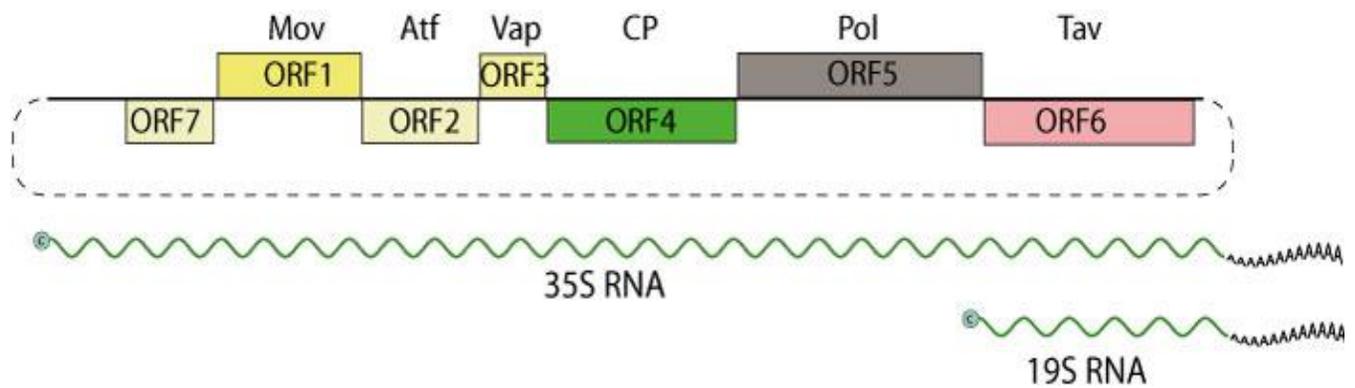
**Cuadro 4.-** Muestra nombre de la secuencia, número de acceso del Gene bank, gen amplificado y el porcentaje de similitud con los demás registros en la base de datos de Gene bank de las 12 muestras seleccionadas de CERV.

En México el CERV no había sido reportado previamente en alguna especie de planta, pero los resultados de su caracterización molecular en nuestro laboratorio, indicaron que este virus probablemente está ampliamente distribuido en clavel en nuestro país, que se facilita principalmente por su insecto vector, el pulgón, *Mysus persicae*. La alta frecuencia con la que se encontró al CERV en las muestras analizadas, indica que este virus puede estar en otros hospedantes diferentes al clavel y que son los reservorios naturales del virus en donde puede sobrevivir y después ser transmitido a las plantas del clavel.

CERV se reportó por primera vez en *Dianthus caryophyllus* en Inglaterra por Hollings y Stone en 1960. Su distribución geográfica de CERV probablemente sea en todo el mundo. Este virus se transmite de manera semi-persistente por un vector, un insecto, llamado *Myzus persicae*, y también transmitido por inoculación mecánica e injerto; no se transmite por contacto entre plantas, tampoco por semilla. En forma natural pueden infectar a *Dianthus caryophyllus*, *Saponaria vaccaria* y *Silene armeria*. De forma experimental puede afectar a 3 familias botánicas susceptibles.

El virión de CERV es una partícula no envuelta, de 45-50 nm de diámetro, con una cápside T=7 de simetría icosaédrica (Figura 10). Su genoma consiste de DNA de doble cadena, tanto circular como linear, de un solo componente génico (Figura 11) con un tamaño de 7.932 KB, este virus pertenece a la familia Caulimoviridae y al género Caulimovirus.





**Figuras 8.-** Representación esquemática del virión y el genoma monoportita de doble cadena de DNA de aproximadamente 8000 pares de bases del *Carnation etched ring virus* (CERV) (tomado de ViralZone instituto Suizo de Bioinformática).

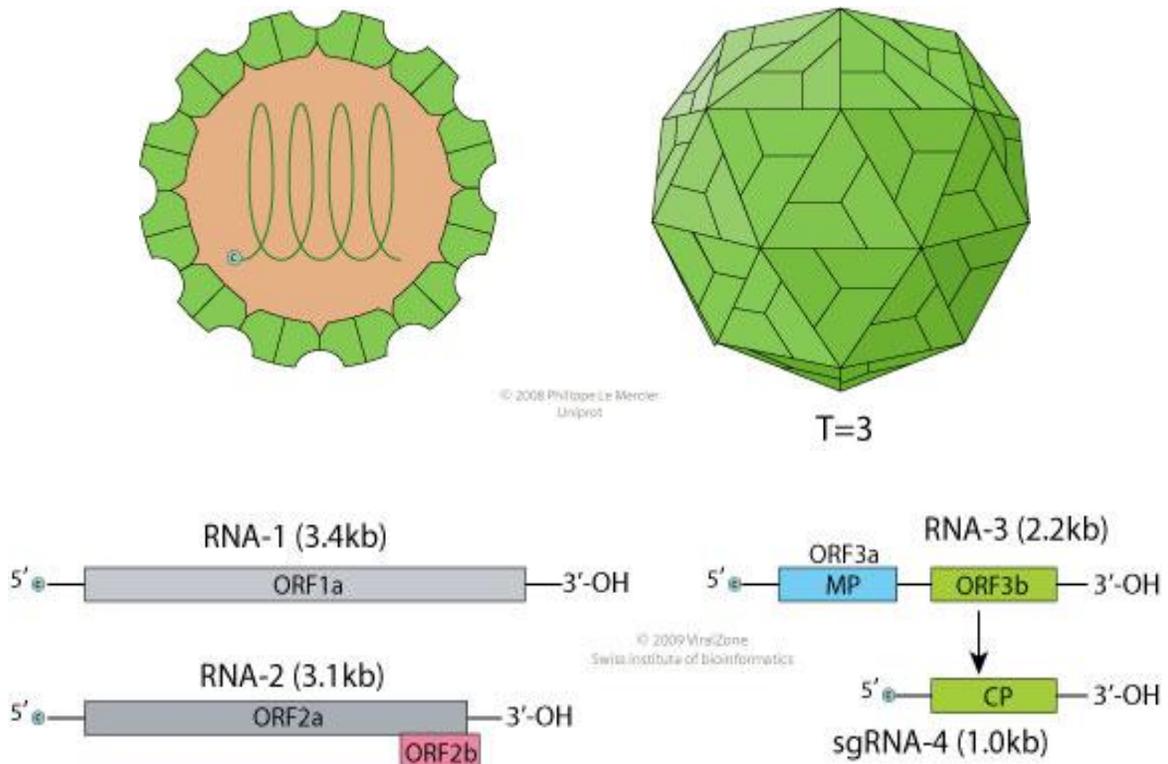
Se obtuvieron solo cinco secuencias del CMV. El análisis y comparación entre las secuencias del CMV obtenidas del clavel y con las disponibles en el GenBank indicó una homología de 98%, que indica que la variante del CMV encontrada en el clavel es de las más comunes, aunque es necesario continuar con una caracterización molecular más completa de este virus, ya que este es el primer reporte de la infección de este virus en clavel en el Mundo, lo cual es muy importante.

CMV es uno de los virus más ampliamente distribuidos en el Mundo, afectando a una gran cantidad de hospedantes, pertenecientes a diferentes familias botánicas, por lo que no es extraño encontrarlo frecuentemente infectando a una gran cantidad de cultivos, por lo que fue sorprendente identificar su presencia en algunas de las 47 plantas de clavel incluidas en el presente trabajo.

CMV se reportó por primera vez en *Cucumis sativus*, en los Estados Unidos de América, por Price en 1934. Su distribución geográfica posiblemente sea en todo el mundo. Este virus es transmitido por más de 60 especies de Aphidos incluyendo *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora* y *Myzus persicae*, también es transmitido por inoculación mecánica y por semilla. La

transmisión en forma natural puede infectar a *Cucumis sativus* y muchas otras cucurbitáceas, *Lycopersicon esculentum* y *Spinacia oleracea*. De manera experimental puede afectar a más de 9 familias botánicas susceptibles.

Los viriones de CMV son partículas esféricas isométricas, no envueltas, de aproximadamente 29 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica T=3 (Figura 12). Los componentes virales son tripartitas lineares de RNA de cadena sencilla positiva. El tamaño total del genoma es de 8.621 kb, el componente génico más grande es 3.389 kb, el segundo es de 3.035 kb y el tercero es de 2.197 kb. (Figura 13) Los viriones contienen 18% de ácidos nucleicos, el 82% de proteínas y 0% de lípidos.



**Figuras 9.-** Representación del virión y del genoma tripartita de RNA de cadena sencilla positiva del *Cucumber mosaic virus* (CMV) (tomado de ViralZone instituto Suizo de Bioinformática).

## CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia y sinonimia de los virus CarMV, CERV y CMV en plantas de clavel, con daños de moteados y rayas amarillas, recolectadas en invernaderos comerciales de la localidad de Villa Guerrero, Estado de México, utilizando en forma conjunta métodos de detección serológicos y de análisis molecular de ácidos nucleicos de origen viral como ARNdc y la secuenciación de productos de la RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de algunos genes virales.

La prueba serológica de DAS-ELISA utilizada permitió detectar en todas las muestras del material recolectado la presencia de CarMV rápida y eficientemente.

El análisis de ARNdc de origen viral de las muestras permitió observar el patrón electroforético del CarMV y CMV, y probablemente de otros virus desconocidos. Este método de diagnóstico viral no es muy específico, por lo que podría prestarse a errores de interpretación sino no se complementa con otros métodos de diagnóstico viral.

La secuenciación de los productos de la RT-PCR con los oligonucleótidos utilizados, permitió confirmar la identidad del CarMV y CERV en plantas de clavel en México, y en este trabajo se reporta por primera vez la presencia del CERV en nuestro país y del CMV en el mundo por medio del producto de RT-PCR en plantas de clavel.

## REFERENCIAS

1. Agrios, N. G. 1997. Plant Pathology. Elsevier. pp. 478-513.
2. Bangham Charles R. M. 1991, Métodos de biología molecular. Vol. 9: protocolos de genética humana. pp. 1-7.
3. Boccardo, G., Lisa, V., Luisoni, E. and Milne, R.G. 1987. *Carnation 2 virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
4. Bokx, J.A. 1987. *Potato M Virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
5. Boswell, K. 1985. *Beet curly top virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
6. Brunt, A.A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L., and Zurcher E. J. 1996. Plant viruses online: Descriptor and lists from the VIDE Database. Version: 16<sup>th</sup> January 1997. URL. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide>
7. Brunt, A.A. 1995. *Carnation Italian ringspot virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
8. Brunt, A.A. 1990. *Carnation virus (¿?)*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20<sup>th</sup> August 1996.'
9. Chapman y Hall. 1991. Applied Plant Virology. Ed. D. Walkey pp. 140-159.
10. Clark, M. F., and A. M. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
11. Coll J. 1993. Técnicas de diagnóstico en virología. Ed. Díaz de Santos. pp.11.

12. Conti M., Gatelli D., Lisa V., Lovisolo O., Martelli G. P., Ragozzino A., Rana G. L., Volvas C. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Ed. Mundi-Prensa. pp. 11-56.
13. De la Torre, A. R., Salazar, S. M., Valverde, A. R. 2003. Etiología del Moteado Amarillo del Tomate de Cascara (*Physalis ixocarpa* B.) en México. *Agrociencia* 37 (10): 40-40.
14. Dijkstra, J., and P. C. De Jager. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises.* Edit. Springer, Berlin. 459 p.
15. Dubey R. C. 2009. *Biotechnology. Plant Biotechnology.* Ed. S. Chand. Pp 365-385.
16. Duffus, J.E., and S. Molyneux. 1986. *Lettuce infectious yellows.* in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
17. Francki, R. I. B. 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology Supplementum 2: 392-401*
18. Gallitelli, D. 1991. *Carnation yellow stripe virus* in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
19. Gibbs, A.J. 1987. *Alfalfa mosaic virus.* in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
20. González, M. E. 1988. Identificación e Incidencia de Virus en Clavel (*Dianthus Caryophyllus* L.) en Villa Guerrero Estado de México. Tesis ingeniería. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo.
21. Guzmán, Isabel, J. 1996. Implementación y Comparación de las Técnicas Serológicas de ELISA-SDA (Enzyme-linked immunosorbent assay) y Aglutinación de Látex, para el Diagnostico del Virus del Moteado del Clavel (CarMv), en México. Tesis Ingeniería. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo.
22. Heathcote, G.D., R.D. Woods.1982. *Beet mosaic virus* in: Brunt, A.A., Crabtree, K.,

- Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
23. Hammond, J., R.H. Lawson and J.R. Moran, 1987. *Carnation etched ring virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20<sup>th</sup> August 1996.'
24. Horvath, J. 1987. *Melandrium yellow Fleck virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
25. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acceso: junio 2009
26. <http://pvo.bio-mirror.cn/refs.htm> (Fecha de consulta diciembre 2012)
27. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Perspectiva Estadística México. 2011.
28. Izco, J. 1998. Botanical. Ed. McGraw Hill. 781 p.
29. Kindt, T. J., A Goldsby y B. Osborne. 2007. Inmunología de Kuby. McGraw-Hill, México.
30. Kuwata, S. 1985. *Tabacco stunt varicosavirus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
31. NCBI, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
32. Mackenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Mejoramiento de la extracción de ARN en plantas maderables para transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa. Plant Dis. 81(2): 222-226.
33. Milne, R.G., V. Lisa, and C. Marzacho. 1991 in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
34. Moran, J.R. 1987. *Carnation latent virus*. 1987. In: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses

Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'

35. Moran, J.R., and A.A. Brunt. 1987. *Carnation necrotic fleck virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
36. Moran, J.R., M. Verhoyen., and G.van Caneghem. 1987. *Carnation vein mottle virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
37. Murant, A.F. 1984. *Alfalfa mosaic virus* in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
38. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Síntesis del Sector Agropecuario Estado de México. Dirección General de Estudios Agropecuarios y Pesqueros. 2009.
39. Sosa-Moss C., Perdomo R., Brathwaite C., Salazar C. 1997. Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. México. Pp. 139-186.
40. Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since].
41. Tremaine, J.H., and J.R. Moran. 1985. *Carnation mottle virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'
42. Tremaine, J.H., and J.R. Moran. 1985. *Carnation ringspot virus*. in: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Versión: 20<sup>th</sup> August 1996.'

43. Valverde R.1990. Análisis de ARN de doble cadena para el diagnóstico de virus fitopatógenos. Plant disease. Pp 255-258.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1. DAS-ELISA**

El Kit de Agdia posee el anticuerpo (a y b o sólo a), el conjugado (de a y b o sólo a), el sustrato y las placas.

Sensibilización de las Placas.

Para calcular la cantidad de pozos que se usarán, se toma en cuenta el número de muestras, más el control positivo (muestra que contenga el virus de interés), el control negativo (H<sub>2</sub>O) y el blanco (muestra con un virus diferente al virus de interés), y las repeticiones. Por ejemplo:  $10+1+1+1 \times 2=26$  pozos a usar.

Para calcular la cantidad de buffer que se usará se toma en cuenta el número de pozos por el volumen a llenar en los pozos entre 1, 000 ( $26 \times 100 / 1000 = 2.6$  ml de Buffer de cubrimiento).

Para calcular la cantidad de anticuerpos que se usará se toma en cuenta el número de pozos por el volumen a llenar y se divide entre 200 que es la [1:200] a la que tenemos el anticuerpo ( $26 \times 100 / 200 = 13 \mu\text{l}$  de anticuerpo).

Una vez hechos los cálculos del material y reactivos a utilizar se procede de la siguiente manera: se juntan el buffer de cubrimiento más el anticuerpo y se llenan los pozos con  $100 \mu\text{l}$  cada uno, se incuban a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche o a temperatura ambiente 4hrs en cámara húmeda (puede prepararse hasta con semanas de anterioridad).

Lavar las placas con PBST (buffer de lavado) de 4 a 6 veces y secar bien.

Preparación de las muestras.

Macerar cada una de las muestras en las bolsas con 1 a 5 mL de buffer SBI (Buffer de extracción).

Colocar  $100 \mu\text{L}$  de las muestras en cada uno de los pozos.

Incubar en cámara húmeda por 2.5 hrs.

Lavar la placa con PBST 1x (Buffer de lavado) de 4 a 6 veces a secar bien.

### **Preparación de la enzima de conjugado.**

Preparar la solución de conjugado 10 minutos antes de usar, el buffer de conjugado ECBI (26X100/1000= 2.6ml de Buffer) se mezcla con la enzima de conjugado (26X100/200= 13 µl de la enzima, en caso de ser a y b se pondrá 6.5 de cada una y se llena cada uno de los pozos con 100 µl de esta solución.

Se pone en incubación en una caja húmeda por dos horas a temperatura de 21 a 24°C.

Lavar la placa con PBST 1X (buffer de lavado) 4 a 6 veces y secar bien.

### **Preparación del sustrato**

Preparar la solución de sustrato de 10 a 15 minutos antes de que termine el tiempo de incubación.

Disolver previamente la pastilla (moler); para cada tableta o pastilla se agregan 5ml de PNP (solución de sustrato), esto alcanza para una placa completa. Se coloca 100µl de esta solución y se incuba en un lugar oscuro por 30 a 60 minutos.

Los resultados se evalúan cada 20, 40, y 60 minutos. Se tomará como reacción positiva visualmente, si da tono amarillo.

## **BUFFERS**

### **Buffer de cubrimiento**

Carbonato de sodio (anhidro)	1.60gr
Bicarbonato de sodio	2.92gr
Asida de sodio	0.2gr
Disolver en agua destilada y aforar a 1L.	
Ajustar el pH a 9.6 y almacenar a 4°	

### Buffer de lavado PBST 10X

Fosfato de sodio di básico (anhidro)	11.5gr
Fosfato de potasio monobásico (anhidro)	2.0gr
Cloruro de sodio	80.0gr
Cloruro de potasio	2.0gr
Tween-20	5.0gr
Disolver en agua destilada y aforar a 1L.  Ajustar pH a 7.3  Para preparar al X se prepara una solución con 100ml de 20X y se afora a 1L.	

### Buffer de extracción SBI

Albumina de huevo, grado II	2.0gr
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	
Sulfito de sodio (anhydro)	
Azida de sodio	
Tween-20	
Disolver en agua destilada y aforar a 1L  Ajustar pH a 7.3, almacenar a 4°C	

### Buffer de conjugado ECBI

Albumina de Bovino	2.0gr
--------------------	-------

Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	10gr
Azida de sodio	0.2gr
Disolver en PBST 1X, ajustar el pH a 7.3, almacenar a 4°C y aforar a 1L.	

### Buffer de sustrato PNP

Diethanolamine	
Cloruro de magnesio	
Azida de sodio	
Disolver en 800ml de agua destilada, ajustar el pH a 9.8 con ácido Clorhídrico.  Aforar a 1L y almacenar a 4°C.	

## ANEXO 2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DOBLE CADENA.

1. Macerar 3.5 gr de tejido en nitrógeno líquido o congelar el mortero con la muestra en el revco - 70°C y pasar a un tubo de 50ml. Añadir 10ml de STE 1X, 1ml de SDS al 10%, 500µl de bentonita al 2% y 9 ml de fenol-STE1X.
2. Poner el tubo en agitación fuerte durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 minutos, calibrar con STE 1X.
4. Recuperar la fase acuosa en otro tubo y agregar 2.1 ml de etanol absoluto frío, se mezcla bien y se guarda a -20°C (2 días máximo).
5. En otro tubo se mezclan 25ml de STE 1X- etanol al 16% y 1gr. De celulosa-CF 11 (distribuidor), agitar vigorosamente hasta que se deshagan los grumos. Tomar una jeringa de 20ml colocándole un círculo de papel filtro en el fondo y vaciar el contenido del tubo sin regresar líquido, deje que se drene completamente.

6. Tome el tubo del paso 4 descongelar el contenido y agregarlo en la columna de celulosa.
7. Ya que el contenido de la jeringa se haya drenado añadir 25ml de STE 1X-etanol al 16% para limpiar la columna y eliminar el DNA, RNA de cadena sencilla, clorofilas, etc. Este paso se repite hasta que la columna vuelva a ser blanca.
8. Cuando la columna ya este blanca, se coloca por debajo de ella un tubo limpio; a la columna se le agrega 10ml de STE 1X sin etanol al 16% y se recupera el filtrado.
9. Al filtrado se le agregan 20ml de etanol absoluto frío y 500µl de acetato de sodio 3M. aquí se pueden guardar los tubos a -20°C.
10. Mezcla bien y centrifugar a 8,000rpm durante 30 minutos. Para calibrar se utiliza etanol absoluto frío.
11. Se elimina el sobrenadante en un solo movimiento no regrese el líquido, ya que se puede despegar la pastilla y puede perder su RNAdc, vierta el tubo sobre un papel para que la pastilla se seque.
12. Cuando la pastilla este seca al igual que las paredes del tubo se agrega de 100 a 200µl e agua libre de nucleasas, cuidando de lavar bien las paredes. Se centrifuga brevemente para recuperar todo el líquido y se almacenan en tubos eppendorf a -20°C. Como una opción para cargar el gel de poliacrilamida se puede recuperar el RNAdc con 200µl de buffer de carga de RNA y se puede guardar a -20°C.

## **PATRON ELECTROFERÉTICO**

En vaso de precipitado mezclar en el siguiente orden:

- 3.5 ml de agua destilada des-ionizada estéril.
- 3.4 ml de regulador E3X.
- 2 ml de bis-acrilamida- acrilamida.
- 1 ml de TEMED
- 150 µl de persulfato de amonio (100mg/100ml)

Al colocar el persulfato ya se debe tener colocada la cámara de electroforesis para vaciar la mezcla anterior, se deja gelificar de 30 a 40 minutos. Son 10 carriles pero no se ocupan ni el

primero ni el último ya que las muestras pueden salirse del gel.

En ambos compartimientos se pone el regulador de electroforesis (E) 1X (50ml de E 20X más 950 ml de agua destilada des-ionizada). Para cargar las muestra, se enjuaga la jeringa de vidrio con el regulador E 1X, se toman 30 µl de RNAdc más 20 µl de buffer de carga de RNA se mezclan y se colocan lentamente en el carril. Por último se enjuaga la jeringa en el mismo buffer de electroforesis. Se conecta al dispositivo una fuente de poder y se corren las muestras a 100 volts durante 2 hrs. 15 minutos.

Para teñir el gel y observar bandas, se tiñe con bromuro de etidio al 0.5% durante 5 a 10 minutos en agitación, esto dependerá de que tan utilizado este el etidio, luego se enjuaga el gel con agua DDE.

### **Tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.1 M**

1. Se prepara la solución fijadora con 10 % de etanol absoluto y 1% de ácido acético glacial). Se agrega al gel y se deja actuar por 20 minutos, en agitación continua. \* Aquí se puede empezar a preparar la solución reveladora.
2. Se decanta la solución fijadora y se lava el gel con agua DD 3 veces.
3. Se adicionan 50ml de  $\text{AgNO}_3$  0.011M (5 ml  $\text{AgNO}_3$  + 45 ml de agua DD, dejando actuar por 20 minutos en agitación.
4. Se recupera  $\text{AgNO}_3$ , y se lava el gel con agua DD 5 veces.
5. Se añade 50 ml de solución reveladora (3gr de NaOH + 48ml de  $\text{H}_2\text{O}$  DD +2 ml de formaldehído) al gel, se observa constantemente y se detiene la reacción con agua DD cuando se observan las bandas.

## **REACTIVOS**

### **REGULADOR DE EXTRACCIÓN STE 10 X**

1.- 800 ml de agua destilada des-ionizada.

61 gr de tris base pH 8

58 gr de NaCl

3.7 gr de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O

Llevar a un volumen de 1 000 ml y ajustar a un pH de 6.8 con HCl concentrado.

### **STE1X-ETANOL AL 16%**

100 ml de STE 10X

174 ml de etanol al 95%

726 ml de agua destilada des-ionizada

### **REGULADOR DE ELECTROFORÉSIS 20X (E)**

97 gr de tris base pH 8

54.5 gr de acetato de sodio trihidratado.

7.4 gr de Na<sub>2</sub>EDTA- 2H<sub>2</sub>O

800 ml de agua destilada des-ionizada

Llevar a 1000 ml y ajustar pH de 7.8 con ácido acético.

### **BUFFER DE CARGA**

5 ml de regulador E 20X.

20 ml de glicerol.

75 ml de agua destilada.

Mezclar bien y esterilizar.

## **ANEXO 3. PROTOCOLO DE RT-PCR EN TRES PASOS PARA AMPLIFICAR LOS VIRUS DEL CLAVEL**

Las cantidades que aquí se presentan, son para 1 reacción

Paso 1: Desnaturalización del RNA

1. En un tubo eppendorf de 0.2 ml (200 µL) colocar 2µl de RNA
2. Adicionar 0.2 µl de primer mix
3. Incubar en el termociclador a 95°C durante 5 min.

4. Después 1 min. en hielo

#### Paso 2: Formación del cDNA

En un tubo eppendorf de 200  $\mu$ L.

1. Colocar 1  $\mu$ L de buffer 5X de la enzima AMV
2. Adicionar 0.4  $\mu$ l de dNTP's (10mM)
3. Colocar 0.2  $\mu$ l de enzima AMV (10u/ $\mu$ l)
4. Agregar 1.2  $\mu$ l de agua
5. Mezclar bien y adicionar 2.8  $\mu$ l de la mezcla a cada tubo del paso 1
6. Incubar en el termociclador a 42°C por 45 min
7. Incubar 1 min en hielo

#### Paso 3: PCR

1. En un tubo eppendorf, colocación de agua destilada.
2. Agregar 1  $\mu$ L de buffer 10X (250u/ml)
3. Adicionar 0.5  $\mu$ L de MgCl (50mM)
4. Poner 0.2  $\mu$ L de dNTP's (10mM)
5. Agregar 0.8  $\mu$ L de primer mix (10mM)
6. Colocar 0.2  $\mu$ L de la enzima Taq DNA Polimerasa (5u/ $\mu$ l)
7. Poner 0.3  $\mu$ L de cDNA
8. Ponerlo en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

96°C 5 minutos

96°C 30 segundos

52°C 30 segundos

72°C 30 segundos

72°C 7 minutos

14°C  $\infty$

} 30 ciclos

Electroforesis: Correr los productos en un gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 0.5%, de a 100 V durante 45 min.

Cada 5  $\mu$ L de producto de PCR, se mezcla con 1  $\mu$ L de buffer de carga.

### **ANEXO 4. LIMPIEZA CON WIZARD SV GEL Y PCR CLEAN UP SYSTEM**

#### **PURIFICACIÓN DEL DNA POR CENTRIFUGACIÓN**

Disolver el gel de agarosa.

Coloque el gel con la banda de interés en el tubo eppendorf de 1.5 ml anteriormente pesado.

Adicione 10 µl de la solución 1 (membrana binding solution) por cada 10mg de peso del gel de agarosa. Incube a 50-65°C hasta que el gel este completamente disuelto.

### **Unión de DNA**

Inserte una columna SV en un tubo colector.

Transfiera el mix del gel diluido con la solución 1 en la mini columna ensamblada. Incube a temperatura ambiente por 1 minuto.

Centrifugue a 10, 000 RPM por un minuto. Decante el sobrenadante del tubo colector y vuelva a insertar la mini columna en el mismo.

### **Lavados.**

Adicione 700µl de la solución 2 (membrana wash solution), centrifugue a 10, 000 RPM por 1 minuto. Decante el sobrenadante y reinserte la mini columna en el tubo colector.

Repita el paso 4 con 500µl de la solución 2, centrifugue a 10, 000 RPM por 5 minutos.

NOTA: Antes de colocar el agua asegúrese de que no queden restos de buffer de lavado, se pueden realizar uno o dos centrifugados más (De La Torre, 2008).

### **Elusión**

Transfiera la mini columna a un tubo estéril de 1.5 ml.

Adicione 50µl de agua libre de nucleasas en la mini columna. Incube a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente centrifugue a 10, 000 RPM por un minuto y tire la mini columna.

NOTA: Para asegurar que obtendremos todo el DNA se pueden colocar los 25µl restantes incubar y centrifugar (De La Torre, 2008).

Concentrar en DNA por medio de la centrifuga conectada al vacío, hasta evaporarlo a 10µl aproximadamente.

Guardar el DNA a 4°C o a -20°C.