



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Identificación de virus y viroides en el amaranto
ornamental (*Iresine herbstii* Hook).**

Tesis

Que para obtener el título de Biólogo



P R E S E N T A

Héctor Salgado Ortíz

Director de tesis: Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México, 2014



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.

AGRADECIMIENTOS

- **A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO POR HABERME PERMITIDO PERTENECER A LA MAXIMA CASA DE ESTUDIOS, Y QUE CON ORGULLO Y HONOR LLEVAMOS EL SÍMBOLO DE LA UNAM Y DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**
- **A LA DR. MARTHA MARTINEZ, POR TODO SU APOYO, SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES ASI COMO TAMBIEN EL TIEMPO BRINDADO.**
- **AL DR. JORGE CAMPOS, POR SU TIEMPO, Y RECOMENDACIONES HACIA ESTE TRABAJO PARA QUE QUEDARA LISTO.**
- **AL DR. SAUL MAYA, POR SU COLABORACION, ASI COMO TAMBIEN SU TIEMPO PARA LA REVISION.**
- **AL M. EN C. ALEJANDRO MONSALVO, GRACIAS POR SU TIEMPO, SUS COMENTARIOS, SUGERENCIAS Y ASESORAMIENTO DURANTE EL PROYECTO.**
- **Y POR ULTIMO Y MAS IMPORTANTE. AL DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ, GRACIAS POR LA CONFIANZA, EL APOYO, EL TIEMPO BRINDADO, LA PASIENCIA, Y POR HABERME BRINDADO LA OPORTUNIDAD DE HABER TRABAJADO EN SU LABORATORIO, TAMBIEN POR TODAS LAS ENSEÑANZAS QUE ME LLEVE EN EL TRANCURSO DEL DESARROLLO DE MI TESIS. Y TODOS LOS BUENOS RATOS QUE VIVIMOS GRACIAS A LAS COMPAÑERAS DE LABORATORIO QUE HACEN MAS AMENO EL TRABAJO. MUCHAS GRACIAS DR. RODOLFO.**

DEDICATORIA

ESTA TESIS VA DEDICADA A MIS PADRES, RAMON Y GUILLE.
GRACIAS POR HABERME AYUDADO A COMPLETAR MI SUEÑO
DE TERMINAR LA UNIVERSIDAD, POR TODO SU APOYO
INCONDICIONAL, AL IGUAL QUE A MIS
HERMANOS, QUE ME ESTUVIERON DURO Y DURO
QUE SI YA HABIA ACABADO. AUN EN TIEMPOS DIFICILES,
SEGUIMOS JUNTOS QUE ES LO QUE HACE
GRANDE A NUESTRA FAMILIA, LOS QUIERO MUCHO.

GRACIAS FAMILIA

Y NO PODRIA CONTINUAR SIN ANTES MENCIONAR
A LA PERSONA QUE ME AYUDO A CUMPLIR TODO ESTO
GRACIAS POR ESTAR CONMIGO TODO ESTE TIEMPO
POR MOSTRARME EL CAMINO DE LA SUPERACION
POR AYUDARME CUANDO MAS LO NECESITE
POR ENSEÑARME QUE EL AMOR LO PUEDE TODO
Y QUE SIEMPRE ESTAREMOS AHÍ EL UNO PARA EL OTRO
MUCHAS GRACIAS, ESTA DEDICATORIA ES SOLO
POR Y PARA TI, TE QUIERO MUCHO.

MUCHAS GRACIAS ALEJANDRA

ÍNDICE

| TEMA | PÁGINA |
|---|--------|
| RESUMEN | VI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 3 |
| i. <u>Características generales de los virus</u> | 3 |
| ii. <u>Características generales de agentes parecidos a virus: viroides y ARN satélites</u> | 3 |
| iii. <u>Enfermedades causadas por virus y partículas parecidas a virus en plantas</u> | 6 |
| iv. <u>Detección de virus y agentes virales</u> | 7 |
| v. <u>Detección por pruebas serológicas</u> | 8 |
| vi. <u>Detección por análisis electroforético de ARNdc de origen viral y RT-PCR</u> | 9 |
| vii. <u>Patógenos virales en <i>Iresine herbstii</i></u> | 10 |
| 1.2 Hipótesis | 11 |
| 1.3 Objetivos | 11 |
| 2. MATERIAL Y METODOS | 11 |
| 2.1 Recolecta de muestras | 11 |
| 2.2 Análisis electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6%(PAGE) de ARNdc de origen viral | 12 |
| 2.3 Análisis Electroforético doble de ARNdc de origen viral, en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% (PAGE con UREA 8M) | 12 |
| 2.4 Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) | 12 |
| i. <u>RT-PCR de CMV</u> | 13 |
| ii. <u>RT-PCR para CARNA 5</u> | 13 |
| iii. <u>RT-PCR para Viroide del <i>Iresine</i> (IrVd)</u> | 13 |
| 2.5 Secuenciación directa de los productos de RT-PCR de CMV, CARNA 5 e IrVd | 14 |
| 2.6 Análisis de las secuencias | 14 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 14 |
| 3.1 Análisis electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6%(PAGE) de ARNdc de origen viral | 14 |
| 3.2 Análisis Electroforético doble de ARNdc de origen viral, en gel desnaturizante | 16 |

| | |
|--|----|
| de poliacrilamida al 6% (PAGE con UREA 8M) | |
| 3.3 Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) | 16 |
| 3.4 Secuenciación de los productos de RT-PCR de CMV, CARNA-5 e IrVd | 19 |
| 3.5 Análisis de las secuencias | 21 |
| 4. CONCLUSIONES | 24 |
| 5. REFERENCIAS | 26 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| CUADRO | TÍTULO | PÁGINA |
|--------|---|--------|
| 1 | Secuencias parciales de la proteína de la cápside de CMV con su número de acceso proporcionado por el GenBank | 20 |
| FIGURA | TÍTULO | |
| 1 | Plantas de <i>Iresine herbstii</i> variedad verde con daños | 2 |
| 2 | Plantas de <i>Iresine herbstii</i> variedad morada con daños | 2 |
| 3 | Diagrama de las vías de replicación de viroides | 4 |
| 4 | Representación gráfica de la estructura del viroide de la papa PSTVd | 5 |
| 5 | Representación gráfica de la estructura del viroide del aguacate ASBVd | 6 |
| 6 | Patrón electroforético en Gel de Poliacrilamida no desnaturalizante, del CMV y su CARNA-5 | 15 |
| 7 | Electroforesis en gel de Agarosa del CMV | 17 |
| 8 | Electroforesis en gel de Agarosa del CARNA-5 | 17 |
| 9 | Gráfica de porcentajes de detección de CMV y CARNA-5 | 18 |
| 10 | Electroforesis en Agarosa de IrVd | 19 |
| 11 | Secuencia parcial de CARNA-5 | 21 |
| 12 | Árbol filogenético de secuencias parciales del gen de la proteína de la cápside de CMV | 22 |
| 13 | Esquema representativo del virión de CMV | 23 |

RESUMEN

En recorridos por jardines públicos y privados de la ciudad de México se han observado numerosas plantas de amaranto ornamental (*Iresine herbstii* Hook), con daños como arrugamiento, clorosis, proliferación y reducción del tamaño de las hojas, y enanismo de la planta. Con el objeto de identificar a los agentes causales involucrados en los daños descritos, se realizaron análisis en electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE) de ARN de doble cadena de origen viral. Se observaron bandas de ARNdc que correspondieron al genoma del *Cucumber mosaic virus* (CMV) y su satélite CARNA-5; más abajo del satélite, se encontraron bandas que señalaron la posible presencia de un viroide. Para determinar la identidad del CMV y su CARNA-5, se secuenciaron productos de ensayos de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, del tamaño esperado para CMV (550pb), CARNA-5 (250pb). Y para el viroide IrVd se obtuvieron amplicones con el tamaño esperado (350pb). La secuenciación directa de los amplicones obtenidos confirmó la identidad del virus y su satélite, en un 98% y 95% respectivamente, comparadas con secuencias disponibles en el GeneBank/NCBI. En este trabajo se reporta la presencia del virus CMV, su satélite CARNA-5 y el IrVd en plantas de amaranto ornamental, se sugiere realizar las pruebas de patogenicidad por medio de inoculación mecánica, para determinar si estos son los causantes de los daños observados.

Palabras clave: Amaranthaceae, técnicas moleculares, Cucumovirus, CARNA-5

1. INTRODUCCIÓN

La horticultura ornamental es una de las actividades más rentables de la agricultura en nuestro país. Alrededor de 270 especies de plantas se producen con fines ornamentales sobre todo en los estados de México, Morelos, Puebla Veracruz y el D.F. Desde hace tiempo se han empezado a utilizar muchas más especies de plantas para adorno de parques y jardines públicos o privados (Ramírez, 1996; INEGI, 1998; Lepiz, y Rodríguez, 2006).

Una planta ornamental de reciente introducción en México es el amaranto ornamental (*Iresine herbstii* Hook. Fam: Amaranthaceae) utilizada en la jardinería para la delimitación de áreas verdes, es una planta perenne, herbácea o arbustiva de hojas reniformes, con color rosa brillante o amarillo, opuestas, con floración en espiga y follaje de tamaño medio. *I. herbstii* es nativa de Brasil y Australia. Existen dos tipos de variedades, unas de color morado y otras de color amarillo y verde, conocidas estas últimas como Aureoreticulata (Pantoja *et al.* 2011).

Recientemente en jardines públicos, jardines privados y viveros comerciales de la Ciudad de México, se han observado plantas de amaranto ornamental con daños como: enanismo de la planta, arrugamiento en las hojas y clorosis, principalmente en la variedad verde (FIGURA 1), mientras la variedad morada muestra enanismo, proliferación y reducción del tamaño de las hojas (FIGURA 2).

En México no se conoce el origen de estos síntomas, pero el análisis visual de las plantas de amaranto ornamental indicó que estos podrían ser causados por virus o viroides. El diagnóstico de este tipo de patógenos es difícil de realizar por técnicas tradicionales comunes, debido a su tamaño ultramicroscópico y a su composición química (Walkey, 1991). En este

trabajo se utilizaron diferentes técnicas de diagnóstico de virus y viroides para precisar la identidad de los agentes causales de los daños observados en el amaranto ornamental.



FIGURA. 1. *Iresine herbstii* variedad verde, con daños de arrugamiento en las hojas, clorosis, y enanismo de la planta.



FIGURA. 2. *I. herbstii* variedad morada, con daños de enanismo de la planta(a), proliferación (b) y disminución de tamaño en las hojas (c).

1.1 Antecedentes

i. Características generales de los virus

Los virus son parásitos celulares obligados, su genoma está compuesto de moléculas de ADN o ARN de cadena sencilla o doble cadena, resguardado por una cubierta de naturaleza proteica conocida como cápside, y en algunos casos se encuentran cubiertos por una envoltura a base de lipoproteínas y espículas de glicoproteínas. Las partículas virales infectan a todo tipo de células, eucariotas: (vertebrados, invertebrados, plantas y hongos), y procariotas (bacterias y archeas). La presencia de partículas virales o viriones, en las células es obvia por la presencia de síntomas, aunque en algunos casos también se presentan asintomáticos. Los virus utilizan la maquinaria celular para su replicación y posterior producción de más partículas virales (Carter y Saunders, 2007).

ii. Características generales de agentes parecidos a virus: viroides y ARN satélites

Existen otras entidades patogénicas que poseen características más similares a virus que otros organismos, como los viroides y ARN satélites.

Los viroides son entidades muy pequeñas de ARN circular, de 200 a 400 nucleótidos, no poseen cápside ni envoltura, y solamente han sido asociados a varias enfermedades de plantas hasta ahora; el primer viroide que fue descubierto es el viroide del tubérculo fusiforme de la papa, *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), los viroides no codifican proteínas, y al igual que los virus, son parásitos obligados celulares, aunque difieren en su forma de replicación, no se replican en el citoplasma como los virus de ARN convencionales en plantas, son replicados en el núcleo o en los cloroplastos, debido a que utilizan la Polimerasa II para replicar su genoma (Flores, 2003). Existen dos vías de replicación, la asimétrica y la simétrica, la vía asimétrica comienza al

sintetizarse a manera de círculo rodante, una cadena de sentido negativo oligomérica, complementaria al ARN del viroide, generando varias copias del genoma, posteriormente la Polimerasa II comienza a sintetizar otra cadena de sentido positivo oligomérica, complementaria a la negativa, que después es cortada por enzimas de la célula huésped, formando genomas monoméricos de viroides maduros. En el caso de la vía simétrica, comienza al sintetizarse una cadena de sentido negativo, que es autocortada mediante actividad catalítica, en sitios específicos de secuencias, conocidos como ribozimas, generando una cadena monomérica de sentido negativo, posteriormente se sintetiza una cadena de sentido positivo a partir de la cadena de sentido negativo, que igualmente es autocortada mediante ribozimas, y unida posteriormente, produciendo así viroides maduros (FIGURA 3).

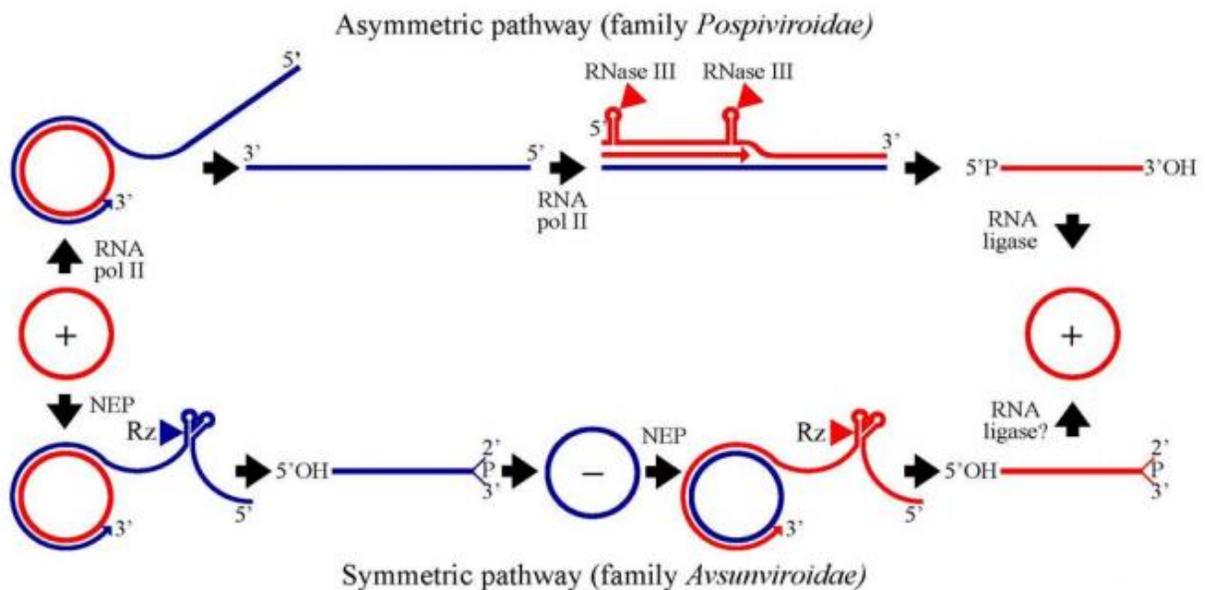


FIGURA. 3. Representación gráfica de las vías de replicación. Asimétrica, primero la Pol II sintetiza la cadena negativa, oligomérica, que sirve de molde para la cadena positiva, que es cortada por ARNasas del huésped. La vía simétrica comienza con una cadena negativa que es autocortada por la ribozima (Rz), para después sintetizar la cadena positiva, y autocortarse también por la Rz (Tomado de Flores *et al*, 2009).

Los viroides se dividen en dos familias: Pospoviridae, que se replican en el núcleo, y se replican por medio de la vía asimétrica, donde las secuencias son cortadas por enzimas de la célula huésped, formando las formas monoméricas, poseen tres regiones conservadas (FIGURA 4), el PSTVd es un miembro representativo de esta familia. Por otro lado, la familia Avsunviroidae, que no poseen las tres regiones conservadas mencionadas anteriormente, pero poseen secuencias auto-catalíticas conocidas como ribozimas en forma de cabeza de martillo, *Hammerhead ribozyme* (FIGURA 5), que después de la replicación, autocortan los genomas, formando la forma monomérica del viroide, evitando la necesidad de usar enzimas del huésped, uno de los miembros de esta familia es el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2009).

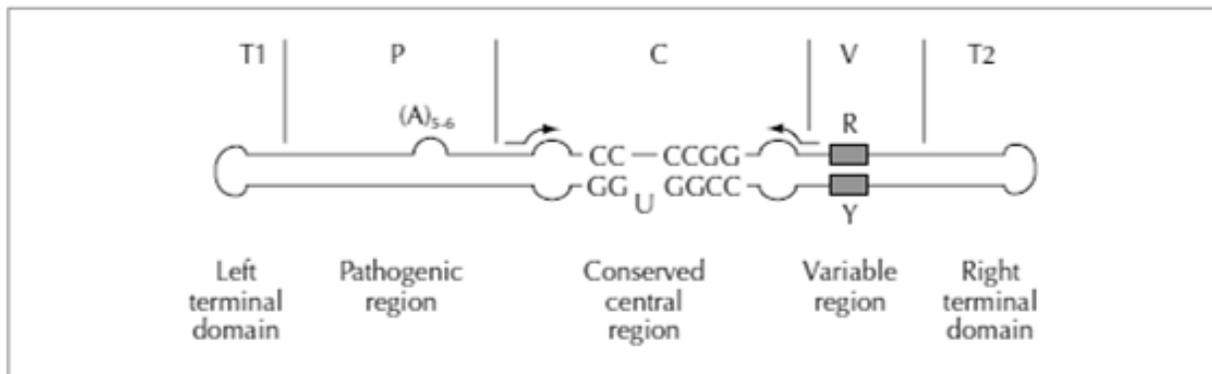


FIGURA. 4. Representación gráfica de un viroide, se observan la región central conservada (C), la región patogénica (P), la región variable (V), y las regiones de dominio terminales (T₁ y T₂) (Tomado de Tabler y Tsagris, 2004).

Hasta el momento sólo se han encontrado en las plantas superiores, y causan síntomas de enfermedad o infecciones asintomáticas (Rivera, *et al.*, 1985; Gallitelli *et al.*, 1991; Yie *et al.*, 1992; Spieker, 1996; Stommel *et al.*, 1998). Algunos viroides como el del coco, *Cadang-cadang coconut viroid*, (CCCVd) y algunas variedades del *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), provocan severas y letales enfermedades en sus plantas huésped (Cann, 2005).

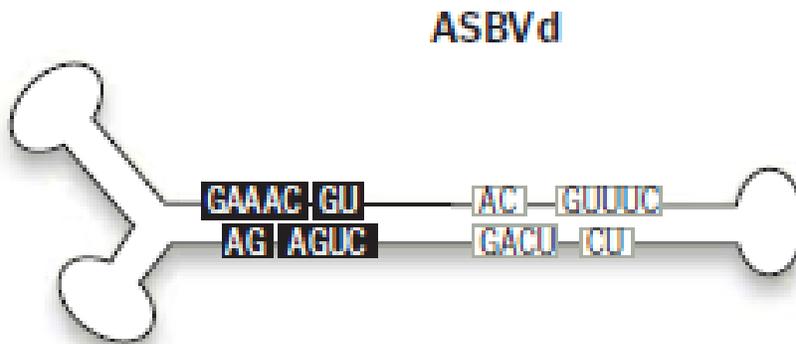


FIGURA. 5. Representación gráfica del viroide ASBVd, perteneciente a la familia Avsunviroidae, se observan las regiones conservadas para todas las estructuras de cabeza de martillo en negro las de cadena de sentido positivo, y en blanco las de cadena de sentido negativo (Tomado de Flores, 2003).

Al contrario de los viroides que no necesitan de un virus para infectar a las células de la planta, los ARN satélites son pequeñas moléculas, totalmente dependientes de un virus para su replicación; llamado virus auxiliar o Helper Virus en inglés, (HV), y con una secuencia distinta al genoma de su virus ayudador, estos ARN satélites son encapsidados por su virus auxiliar, poseen marcos de lectura abierta, capaces de traducir proteínas, aunque aún no se conoce concretamente su función. Algunos ARN satélites han sido asociados al desarrollo de síntomas letales en plantas, y recientemente se ha encontrado que los ARN satélites podrían estar asociados al silenciamiento de ARN (Kaper *et al.*, 1988; Matthews, 1993; Wu *et al.*, 1993; Escriu *et al.*, 2000; Carter y Saunders, 2007).

iii. Enfermedades causadas por virus y partículas parecidas a virus en plantas

Las causas más comunes del deficiente crecimiento o alteraciones en las funciones de las plantas son debidas a microorganismos como bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios y virus o viroides (Agrios, 1996).

Después de los hongos, los virus son los principales agentes fitopatógenos que afectan los cultivos en todo el mundo. En los cultivos hortícolas, las enfermedades constituyen uno de los factores de mayor riesgo para su producción, en los últimos años las enfermedades causadas por virus han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos (Pérez *et al.*, 2004).

La infección por virus no siempre presenta síntomas, debido tal vez a una cepa atenuada, un huésped tolerante, o a virus crípticos que no producen daños. Las células infectadas pueden presentar pérdida de clorofila, u otros pigmentos, produciendo manchas cloróticas, o también se presenta muerte celular, generando marcas necróticas. En otros casos se presentan síntomas de reducción de tamaño tanto en la planta como en la hoja, o enrollamiento y caída de las mismas (Matthews, 1993).

La identificación eficiente de un virus como agente causal en la planta constituye un punto de partida para: adoptar medidas adecuadas de control y llevar a cabo estudios epidemiológicos (Conti *et al.*, 2001).

iv. Detección de virus y agentes virales

Un amplio rango de técnicas han sido desarrolladas para la detección de agentes virales y diagnósticos para enfermedades causadas por virus o partículas parecidas a virus, la simple observación de síntomas no es suficiente para diagnosticar, debido a que podrían ser más de un solo virus los causantes de los daños o también deberse a una condición fisiológica de la planta. Existen metodologías basadas en la Microscopia de luz y electrónica, o técnicas basadas en el uso de anticuerpos o serológicas; y de mayor auge, las técnicas moleculares como el análisis en Electroforesis de ARN doble cadena (ARNdc) de origen viral en gel de Poliacrilamida (PAGE),

PCR y la RT-PCR. Por otro lado las técnicas de microscopia de luz tienen un rango limitado para la observación de todo tipo de viriones, en este caso se marcan las células para poder observar en contraste el daño citológico provocado en las células a causa de los virus, aunque este método resulta muy caro; y no todos las partículas virales provocan síntomas en las células (Collmer y Howell, 1992).

v. Detección por pruebas serológicas

Los virus pueden ser detectados por medio del reconocimiento de algunas de sus proteínas ya sea estructural o funcional, por medio de antisueros específicos, o anticuerpos policlonales, extraídos de la sangre de animales inyectados con el antígeno, y que por consecuencia desarrollan el anticuerpo, debido a la respuesta de las células del sistema inmunológico del animal. Uno de estos ensayos es la prueba *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA, en la cual se incrementa la sensibilidad en la detección de la partícula viral, por medio de la reacción antígeno-anticuerpo, uniendo cualquiera de estos dos reactivos a una enzima, posteriormente se agrega un sustrato y da como resultado una reacción con color que puede ser medida cuantitativamente, existen numerosas variaciones de la ELISA utilizadas para la identificación de virus fitopatógenos, de las cuales el *Double Antibody Sandwich* ELISA (DAS-ELISA), es el más utilizado (Schulz y Spire, 1993).

Aunque la prueba ELISA es muy sensible para la detección de virus en plantas, comparada con otras técnicas; posee un costo elevado, debido a los anticuerpos específicos. Otro inconveniente radica en la especificidad hacia ciertos virus, y no detectar incluso variantes filogenéticamente relacionadas, por lo que es necesario pruebas adicionales de diagnóstico de enfermedades.

vi. Detección por análisis electroforético de ARNdc de origen viral y RT-PCR

Las técnicas moleculares están en auge en los últimos 50 años, estas herramientas han revolucionado el campo de la virología, cambiando los objetivos a ya no tan solo las partículas virales, sino también al genoma viral. La tecnología centrada en los ácidos nucleicos permitió el desarrollo de técnicas con una amplia sensibilidad. El ARN de doble cadena (ARNdc) es producido en plantas infectadas con virus de ARN, estos ARNs son muy resistentes a la degradación enzimática y no es normal encontrarlos en planta sanas. Durante la replicación del genoma viral de ARN de cadena sencilla en las células de la planta, el ARNdc es producido como un producto intermedio, que corresponde al híbrido de la cadena viral positiva, y su copia complementaria negativa. Este ARNdc es conocido como la forma replicativa, y es el ARNdc que se encuentra más comúnmente, en las células infectadas, a pesar de la existencia de más tipos de ARNdc presentes en la planta, lo cual hace que el análisis de ARNdc sea un método práctico para el diagnóstico viral (Valverde, 1990). El análisis del electroforético de ARNdc de origen viral en gel de poliacrilamida al 6 %, permite visualizar los componentes del genoma viral y se ha utilizado como un método de diagnóstico para detectar múltiples virus que afectan a plantas, además de ser un método de diagnóstico barato y relativamente rápido (Olmos, 2013).

Por otro lado la Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Polimerasa Chain Reaction*, PCR en inglés, permite la detección de virus con tan solo una sola molécula de ácido nucleico de origen viral, y sumando la utilización de la enzima *Reverse Transcriptasa* (RT) de los retrovirus, esta técnica se amplía para detectar virus de cadena de ARN por medio de RT-PCR. Ahora solo hace falta sumar la secuenciación de los productos de las PCR y RT-PCR, para así obtener una confirmación de la identidad del agente viral, al comparar las secuencias obtenidas con materiales

de bancos de secuencias, permitiendo así una detección y diagnóstico más rápido, barato, sensible y correcto de los agentes virales (Schulz y Spire, 1993; Cann, 2005; Carter y Saunders, 2007).

vii. Patógenos virales en *Iresine herbstii*

Como se mencionó anteriormente, *I. herbstii* es una planta ornamental de reciente introducción en México, y ha crecido mucho su uso en jardines públicos y privados. En el caso de esta planta, solamente se ha reportado un nuevo viroide llamado *Iresine viroid 1*, IrVd, con un genoma que consiste de 370 pb, perteneciente al grupo de viroides de la papa, Pospiviroidae y que poseen un amplio rango de plantas hospedantes (Spieker, 1996).

Este viroide también ha sido detectado en otras plantas de la familia Amaranthacea, tales como *Alternanthera sessilis* (Singh y Dilworth, 2006), y *Celosia plumosa* (Verhoeven *et al.*, 2010), en Holanda.

De igual forma, Nie y colaboradores en el 2010, reportaron el viroide IrVd en *Vinca major*, perteneciente a la familia de Apocynaceae; y observaron que al realizar las pruebas de patogenicidad con extractos de tejido infectado, por medio de inoculación mecánica sobre hojas de otras plantas sanas, como el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y el crisantemo (*Chrysanthemum × morifolium*), no se observaron síntomas en las plantas inoculadas, lo cual señala una poco probable amenaza del viroide IrVd hacia otros cultivares como la papa y el mismo jitomate.

Por otro lado Valverde y colaboradores en el 2012, observaron y reportaron síntomas parecidos a los daños que se observaron en esta planta: mosaico, moteado, venación de distintos colores y distorsiones en las hojas, sin embargo no determinaron la presencia de virus como los patógenos causantes de estos síntomas.

1.2 Hipótesis

Los daños observados en plantas de *Iresine herbstii* tales como: arrugamiento, clorosis y enanismo de la planta, en la variedad verde, y enanismo en la planta, proliferación y reducción del tamaño de las hojas, en la variedad morada, están relacionados a la presencia de virus o viroides.

1.3 Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron: identificar y caracterizar a los patógenos asociados a los daños de arrugamiento, clorosis y enanismo en la variedad verde y; enanismo de la planta, proliferación y reducción del tamaño de las hojas de la variedad morada, ambas de la planta ornamental *I. herbstii*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Recolecta de muestras

Se recolectaron hojas de 48 ejemplares de la planta *I. herbstii*, de la variedad morada y dos de la variedad verde, que presentaban los daños antes descritos, localizadas en las áreas verdes de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El material vegetal recolectado se almacenó a -70°C para su posterior análisis.

2.2 Análisis electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6%(PAGE) de ARNdc de origen viral

Para la detección de agentes virales, se extrajo el ARN de doble cadena (ARNdc) de origen viral de todas las muestras recolectadas, utilizando 3.5 g de tejido vegetal con daños. El ARNdc fue separado en un gel de poliacrilamida al 6 %, no desnaturizante, a 100 volts por 2:30 h y teñido con bromuro de etidio, y posteriormente con nitrato de plata (Valverde *et al.* 1990).

2.3 Análisis Electroforético doble de ARNdc de origen viral, en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% (PAGE con UREA 8M)

Para la detección del viroide, se analizó el ARNdc de origen viral en un gel PAGE al 6%, no desnaturizante, a 100 volts por 1 h, posteriormente se cortó un fragmento del gel, desde la marca de 400 pb, señalada por el marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen) hasta la parte inferior, que corresponde a la zona en donde se encuentran los genomas de viroides, debido a su peso de 200 a 400pb; para colocarlo encima del gel PAGE desnaturizante que contenía 8M de Urea, y se continuo con la separación, a 100 volts por 1 h (Rivera, *et al.* 1986).

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

De acuerdo al patrón electroforético obtenido en la PAGE, lo cual señaló la presencia del *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) y su satélite CARNA-5, se realizó la RT-PCR para el virus del CMV y su satélite CARNA-5; en el caso del viroide, se realizó el RT-PCR para su identificación. Los oligonucleótidos para CMV y CARNA-5; así como las condiciones, se validaron anteriormente en el laboratorio con resultados positivos en otras muestras (datos no publicados).

Las reacciones se realizaron con el kit de RT-PCR Superscript SSIII y SSIII HI FI One Step de Invitrogen, con un volumen de reacción de 10 µL adicionando en un tubo de PCR: 2.15

μL^{-1} de agua, $5.0 \mu\text{L}^{-1}$ solución amortiguadora 2x, $1 \mu\text{L}^{-1}$ de la mezcla de oligonucleótidos específicos para CMV, CARNA-5 o IrVd, $1 \mu\text{L}$ de PVP 40 (10%), $0.05 \mu\text{L}$ inhibidor de RNAsa, $0.3 \mu\text{L}$ de RT/Taq Mix y $0.5 \mu\text{L}$ de ARN total.

i. RT-PCR de CMV

Los ensayos de RT-PCR se realizaron usando como templado la muestra de ARNdc de origen viral de las muestras de amaranto ornamental y los oligonucleótidos que amplifican parte del gen de la proteína de la cápside del CMV (CMV CP: Forward: 5'- TAT GAT AAG AAG CTT GTT TCG CG -3', Reverse: 5'- GCC GTA AGC TGG ATG GAC AA-3'), que rinden un amplicon con un tamaño de 550 pb. Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización de $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de alineamiento de $54 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y de elongación de $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

ii. RT-PCR para CARNA 5

Se utilizaron los oligonucleótidos CARNA-5s y CARNA-5as, que rinde un amplicón de un tamaño de 300 pb, y las condiciones fueron $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura de desnaturalización, $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de alineamiento y $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de elongación.

iii. RT-PCR para Viroide del Iresine (IrVd)

Se utilizaron los oligonucleótidos IreF 2: 5'-GGGCGGGCGGGCTTCAAGCTA-3' y IreR 2: 5'-TTTTTCTTCATTCTTCTGCTGCG-3', que rinden un amplicón de 350 pb, las condiciones fueron $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura de desnaturalización, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de alineamiento y $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de elongación (Spieker, 1996).

Los productos de RT-PCR se corrieron en un gel de Agarosa al 1% a 100 volts, durante 35 min., incluyendo un marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogene, USA) y se tiñeron con bromuro de etidio.

2.5 Secuenciación de los productos de RT-PCR de CMV, CARNA 5 e IrVd

Las bandas correspondientes a los productos de RT-PCR esperados, se limpiaron mediante EXOSAP o se separaron del gel de agarosa y se limpiaron por WIZARD (Promega). Se determinó la secuencia de nucleótidos del inserto, utilizando los mismos oligonucleótidos de la RT-PCR, en un secuenciador modelo ABI PRISM 3130 de 16 capilares que utiliza el método BIG DYE *Terminator fluorescence based sequencing* para análisis de secuencia.

2.6 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con las disponibles en el GenBank NCBI utilizando el programa de Clustal W ver. 2.2., y se realizó un árbol filogenético mediante MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) comparando con secuencias parciales para la proteína de la cápside de CMV obtenidas del GenBank.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6%(PAGE) de ARNdc de origen viral

El análisis electroforético en PAGE del ARNdc de origen viral mostró la presencia de 5 bandas de ARN, (FIGURA 6), Carriles A y B señalando que las primeras 4 podrían corresponder al patrón electroforético característico del CMV (Bromoviridae), de acuerdo a sus tres componentes y un cuarto subgenómico del tercer componente, cuyos pesos fueron 2.0, 1.9, 1.3 y 0.5 x10⁶ Daltons (Hayakawa *et al.*, 1989; De la Torre *et al.*, 2002; Gutiérrez, *et al.*, 2004), estas bandas fueron observadas en ambas variedades de *I. herbstii*, la verde (carril A) y la morada (carril B) lo cual indicaría que están infectadas por el CMV.

Por otro lado la banda número 5 correspondería al satélite asociado al CMV comúnmente llamado CARNA-5 (FIGURA 6, ARN-5) el cual depende de su virus ayudador, el CMV para su replicación (Montasser, *et al.*, 1991), en este caso, el CARNA-5 también se encontró en ambas variedades de *I. herbstii*.

También se observaron bandas por debajo de la correspondiente al CARNA-5, (resultados no mostrados) esto sugirió la presencia del viroide IrVd, debido a su tamaño pequeño de 350 pb lo cual significaría que se separara por debajo del satélite.

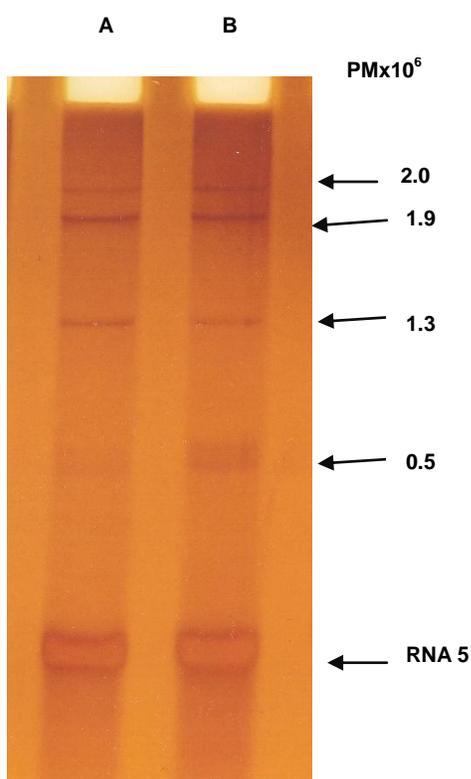


FIGURA. 6. Patrón electroforético en PAGE, (A) variedad verde, se observan las bandas de RNA correspondientes a los componentes del CMV y (B) variedad morada, la quinta banda correspondiente al CARNA-5.

3.2 Análisis Electroforético doble de ARNdc de origen viral, en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% (PAGE con UREA 8M)

En la electroforesis doble no se alcanzó a observar ninguna banda correspondiente al viroide debido tal vez al tamaño de la molécula de 350 pb, o a la baja concentración de este en el ARNdc.

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

Se determinó la presencia del CMV y el CARNA-5 por medio de la RT-PCR en todas las muestras recolectadas obteniendo un producto esperado de 550 pb para el CMV (ver FIGURA 7) con los oligonucleótidos CMV, que corresponde a una región del gen de la proteína de la cápside (Gutiérrez, *et al.*, 2004) y 300 pb para el CARNA-5 (FIGURA 8) con los primers CARNA-5 s y CARNA-5 as, sin embargo en algunas muestras se observaron bandas muy tenues lo cual podría señalar que hay diferentes concentraciones en la carga viral, siendo más baja en varias muestras, en comparación con las otras; aunque se sugiere realizar un control de carga para corroborar lo anterior, esto podría ser explicado debido a la mayor concentración del satélite CARNA-5, que inhibiría la replicación del CMV como se ha señalado en otras plantas al ser “vacunadas” con distintas variedades de CARNA-5 (Montasser *et al.*, 1991, 1998; McGarvey *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1998) Aunque se sugiere realizar un control de carga para corroborar lo anterior. Por otro lado también se encontraron bandas de CARNA-5 muy tenues, esto podría deberse por una parte a las bajas concentraciones del satélite en las muestras, o bien a que no se presentó asociado al CMV.

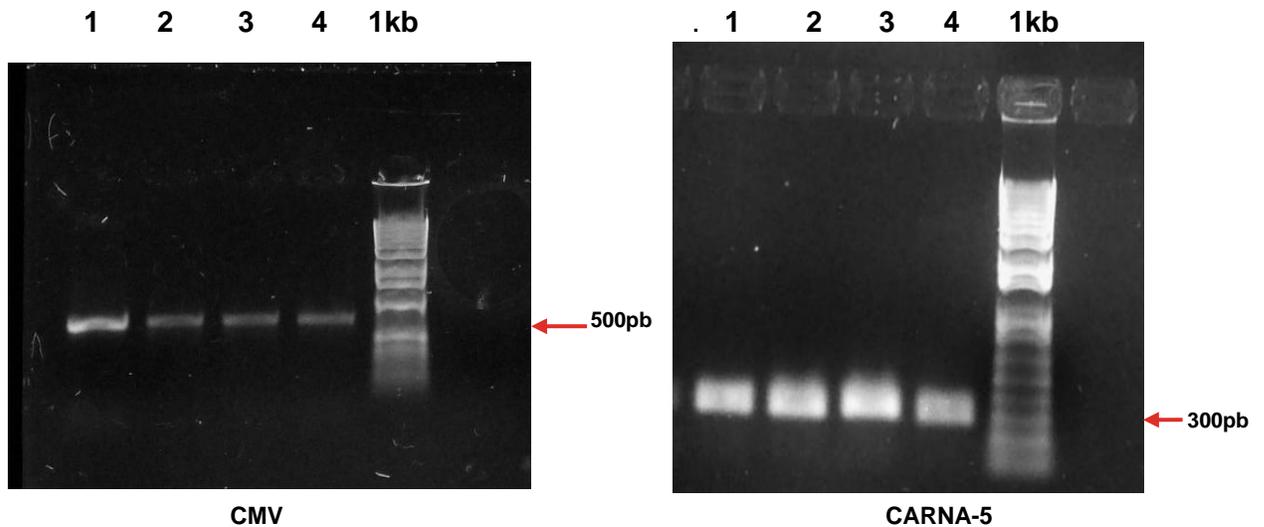


FIGURA. 7 y 8. Análisis electroforético en agarosa 1%, se observaron las bandas correspondientes CARNA-5 (250 pb) y CMV (550 pb) en todas las muestras.

De las 50 muestras obtenidas se diagnosticaron 41 con CMV correspondiente a un 82 %, y 37 para CARNA-5, que corresponde al 74 %, por medio de la RT-PCR, y por medio de la PAGE se observaron 30 muestras para CMV, y 28 para el CARNA- 5 (FIGURA 9), lo cual señala que el gel de PAGE no alcanzó a detectar el satélite ni el CMV en algunas muestras en igual porcentaje que el RT-PCR debido a su baja concentración , sin embargo resultó buena técnica para identificar los agentes virales aunque se necesita conocer el patrón electroforético de los virus.

Se presentaron 6 muestras en las que se logró detectar el virus pero no el CARNA-5, que pudiera no estar presente o su concentración era muy baja para ser detectada mediante el RT-PCR, por lo cual sería recomendable realizar otra prueba como la Hibridación molecular (Northern Blot) con la cual ha sido ya detectado el satélite en otra planta herbácea (Du *et al.*, 2007).

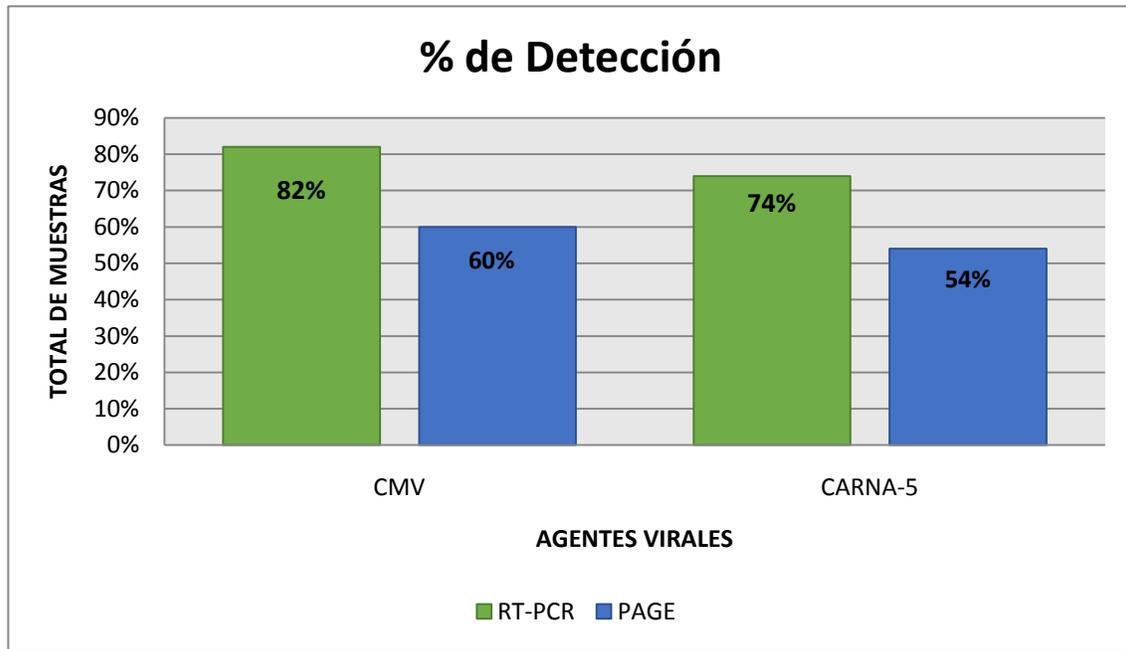


FIGURA. 9. Gráfica de porcentaje de detección del virus CMV y CARNA 5 por medio de PAGE y RT-PCR, es mayor en ambos casos el porcentaje con RT-PCR, ya que el PAGE funciona para diagnosticar la presencia de agentes virales o parecidos a virus.

En el caso del ensayo de RT-PCR para el viroide del *Iresine* se obtuvieron bandas en el tamaño de 350 pb y bandas muy marcadas en el tamaño de 500 pb (FIGURA 10), las cuales corresponderían a la forma dimérica del viroide, incluso se observaron más bandas cercanas a los 900 pb, correspondiente a la forma trimerica, esto en primer lugar, señaló la presencia del IreVd.

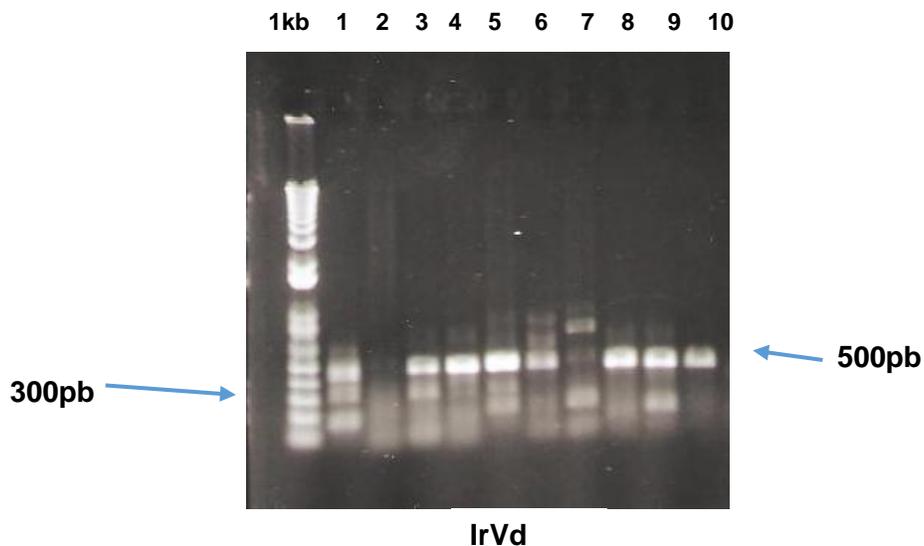


FIGURA. 10. Análisis electroforético en agarosa 1%, se observan las bandas correspondientes al IrVd de 350pb y también las bandas en 500pb corresponden a la forma dimérica del viroide.

3.4 Secuenciación de los productos de RT-PCR de CMV, CARNA 5 e IrVd

Se obtuvieron secuencias parciales de los productos de la RT-PCR de aislados de CMV y CARNA-5, estas secuencias confirmaron directamente la identidad del CMV y del CARNA-5, sin embargo no se lograron obtener secuencias del IrVd.

Las secuencias parciales obtenidas, que corresponden al gen de la proteína de la cápside de CMV, confirmaron la identidad del virus CMV, al ser comparadas con secuencias similares disponibles en el GenBank/NCBI, indicando una homología del 96-99%. Las secuencias fueron dadas de alta en el GenBank del NCBI con los siguientes números de acceso:

| Nombre de la secuencia | No. Acceso del Genbank | Máxima identidad |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| IrisIzta 1 | KJ623605 | 99 % |
| IrisIzta 2 | KJ623606 | 98 % |
| IrisIzta 3 | KJ623607 | 96 % |
| IrisIzta 4 | KJ623608 | 97 % |
| IrisIzta 5 | KJ623609 | 97 % |
| IrisIzta 6 | KJ623610 | 97 % |
| IrisIzta 7 | KJ623611 | 96% |

CUADRO. 1. Secuencias parciales obtenidas de los productos de RT_PCR para el gen de la proteína de la cápside del virus CMV, subidas al GeneBank/NCBI, junto con números de acceso para cada secuencia, y porcentaje de similitud con secuencias disponibles en el GeneBank.

Se obtuvieron secuencias parciales de los productos de RT-PCR correspondientes al satélite CARNA-5, que confirmaron su identidad al ser comparadas con secuencias en el GeneBank/NCBI, y que arrojaron una homología del 90 al 95%, pero con ninguna variedad descrita aquí en México; sin embargo, al ser de 250 pb aproximadamente, no se dieron de alta en el Genbank (FIGURA 11).

CARNA-5 *Iresine herbstii*

5´-

```
GTTTTGTTTGATGGAGAATTGCGTAGAGGGGTTGTATCTACGTGAGGATCTAG  
CACTCGGCGGTGTGGGTTACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCT  
CGGACTGGGGACCGCTGGCTTGCGAGCTATGTCCGCTACTATGGAAGTGAATG  
CTCATTGAGCCCCGCTCAGTTCGCTAGCGAAGCCCGGCCCATGGTTTGCCGT  
TACCGTGGAAAATCTGAAAAGAACAACACTGTTAGGTGGTATCAGTATGACGACGCA  
CGCAGGGAGAAGCTAAACC-3´
```

FIGURA. 11. Secuencia parcial del producto de RT-PCR de CARNA-5 de 261pb.

3.5 Análisis de las secuencias

El análisis filogenético mostró, que la secuencia correspondiente al IrisIzta 1 se encuentra más alejada que las otras secuencias de *I. herbstii*, las cuales se agruparon en dos grupos; al menos dos secuencias (IrisIzta 6 y 7) parecen estar más emparentadas con la mayor parte de las secuencias de CMV obtenidas del GeneBank, mientras que las otras secuencias de *Iresine herbstii* se agruparon mayormente entre ellas, sin embargo al parecer todas las secuencias se agruparon con una variedad de CMV, y no fue posible determinar si había diferentes variedades del virus, debido a que se necesitaría realizar la clonación de los productos obtenidos, y un mayor número de secuencias (FIGURA 12).

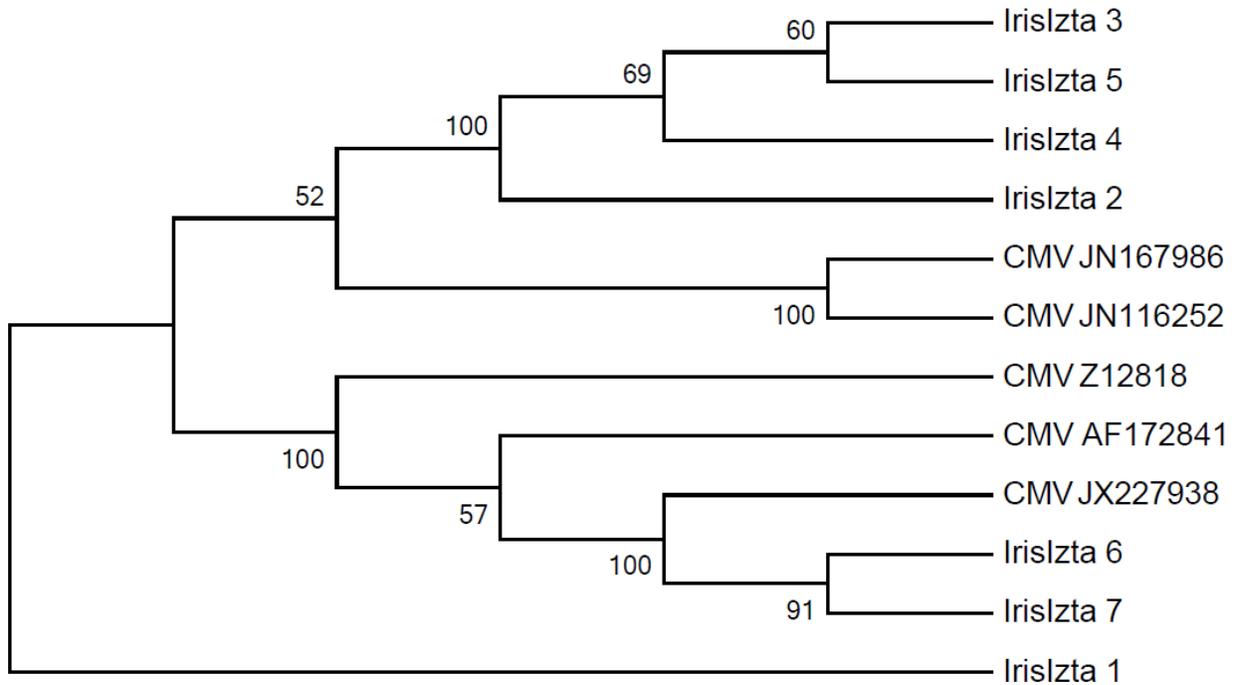


FIGURA. 12. Árbol filogenético del CMV, los valores más cercanos a 100 son estadísticamente probables de que existan, se observan 2 grupos.

El CMV es uno de los virus más ampliamente distribuidos en el mundo, la amplia ocurrencia e importancia económica del CMV, es debido en parte a su alto rango de huéspedes, alrededor de 800 especies de plantas de 85 familias ya sean monocotiledóneas o dicotiledóneas (Alonso *et al.*, 1998), afectando a una gran cantidad de plantas hospedantes, tales como el jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Cillo *et al.*, 2007,) y en México, la azucena (*Hippeastrum hybridum*) (Gutiérrez *et al.*, 2004), el tabaquillo (*Nicotiana glauca*) (datos no publicados) el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*) (De la Torre *et al.*, 2002), y clavel (*Diathus caryophyllus*)(Olmos, 2013), en este trabajo ha sido detectado por primera vez en la herbácea *I. herbstii*. El virus es transmitido mecánicamente de planta a planta, por medio de unas 60 especies de áfidos (Fisher y Nameth, 2000), el *Iresine herbstii* al ser utilizada para decoración de jardines, podría haber sido contagiada a través de transmisión mecánica por estos insectos.

Los viriones de CMV son partículas esféricas isométricas sin envoltura de 29 nm de diámetro y una cápside icosaédrica, su genoma está compuesto de 3 componentes de ARN linear de cadena sencilla con un tamaño total de 8.621 kb (FIGURA 13).

Cucumovirus

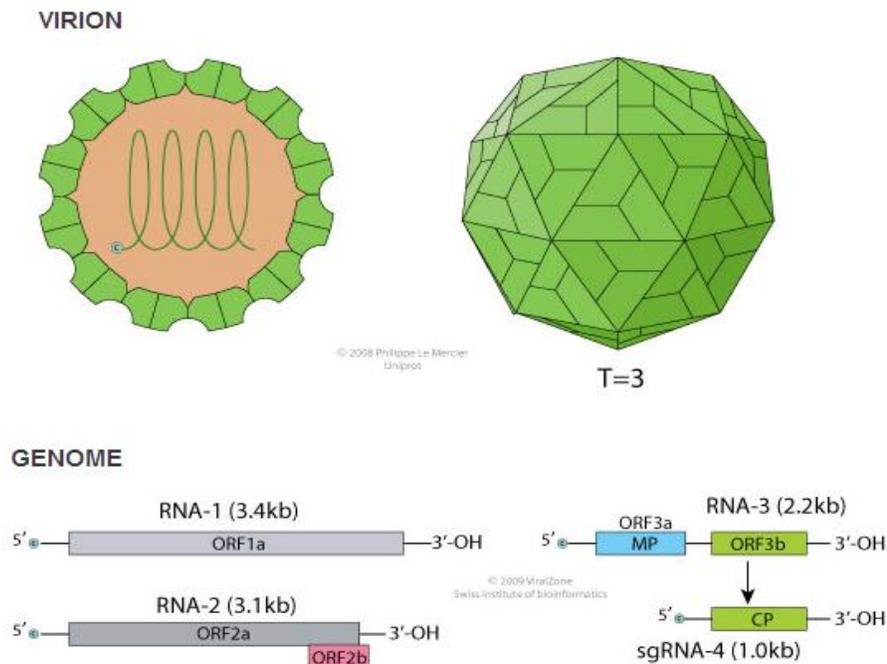


FIGURA. 13. Representación del virión y de su genoma tripartita del CMV (tomado del ViralZone Instituto Suizo de Bioinformática).

Por otro lado, el satélite de RNA asociado al CMV, también llamado CARNA-5, al igual que los demás ARN satélites son agentes subvirales compuestos de moléculas de ácidos nucleicos que dependen de su multiplicación productiva en co-infección de una célula huésped, con un virus ayudador o Helper Virus por sus siglas en inglés (HV) y que tienen secuencias de nucleótidos distintas del genoma tanto de su virus ayudador como de su huésped. Más de 40 satélites de ARN del CMV han sido aislados, identificados y secuenciados, la mayoría reduce la

enfermedad viral a una condición asintomática, y mientras otros pocos incrementan los síntomas del virus (Grumet, 1990; Collmer y Howell, 1992).

El CARNA- 5 ha demostrado que también está asociado en la regulación de los síntomas causados por su HV, atenuando sus efectos o en el caso del jitomate provocando necrosis letal (García *et al.*, 1984; Roosinck *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1993), en este trabajo al parecer solo provocaría una atenuación de los daños causados por el CMV, en este caso la clorosis en la variedad morada.

Se recomienda realizar las pruebas de patogenicidad, por medio de inoculación mecánica de una planta con daños, a plantas sanas, para poder determinar que los daños observados en *Iresine h.* son causados por el virus CMV y su satélite CARNA-5, o el viroide IrVd.

4. CONCLUSIONES

Se logró identificar por medio de RT-PCR la posible presencia del viroide IrVd ya reportado antes.

Se logró identificar y caracterizar por medio de la Electroforesis en gel de Poliacrilamida de dsRNA de origen viral, la presencia de CMV y de su CARNA-5, al igual que por la RT-PCR, y su posterior confirmación con la secuenciación directa, la identidad tanto del virus CMV como el satélite CARNA-5.

Se confirmó la identidad del virus CMV y su CARNA-5 mediante su identificación y caracterización molecular, por lo que podrían ser los agentes causantes de los daños de enanismo, proliferación y reducción del tamaño de las hojas de la variedad morada y arrugamiento, clorosis y enanismo en la variedad verde de la planta ornamental *I. herbstii*. Aunque se recomienda

realizar las pruebas de patogenicidad por inoculación de mecánica, para confirmar que el virus CMV y su CARNA-5, son los agentes causantes de los daños descritos anteriormente.

5. REFERENCIAS

- AGRIOS, N. G. 1997. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. 5° Edition. USA p.p. 478-513.
- ALONSO, J. L. P.; ARANDA, M. A.; MALPICA, J. M.; GARCÍA, F. A.; FRAILE, A. 1998. Satellite RNA of Cucumber Mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its Helper Virus. *Phytopathology* 88(6): 520-524.
- CANN, J. A. 2005. Principles of Molecular Virology. Elsevier Academic Press. 4ª Edition. USA. pp. 249-267.
- CARTER, J. B. y SAUNDERS, V. A. 2007. Virology: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. England. pp. 2-10
- CILLO, F.; PASCIUTO, M. M.; DE GIOVANNI, C.; FINETTI, S. M. M.; RICCIARDI, L.; GALLITELLI, D. 2007. Response of tomato and its wild relatives in the genus *Solanum* to *cucumber mosaic virus* and satellite RNA combinations. *Journal of General Virology*. 88: 3166-3176.
- COLLMER, C. W. y HOWELL, S. H. 1992. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathology* 30:419-422.
- 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. Mundi-Prensa. España. pp. 11-56.
- DE LA TORRE, A. R.; MONSALVO, R. A. C.; SALAZAR, S. M.; VALVERDE, R. A. 2002. Detection and partial characterization of a yellow strain of Cucumber mosaic virus from

- Gladiolus* (*Gladiolus grandiflorus* hort.) in México. Revista Chapingo. Serie Horticultura 36: 231-240.
- DU, Q. S.; DUAN, C. G.; ZHANG, Z. H.; FANG, Y. Y.; FANG, R. X.; QUIE, X.; GUO, H. S. 2007. DCL4 Targets *Cucumber Mosaic Virus* satellite RNA at novel secondary structures. Journal of Virology. 81: 9142-9151.
- ESCRIU, F.; FRAILE, A.; GARCIA, A. F. 2000. Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of *Cucumber mosaic virus*. Phytopathology 90(8): 480-485.
- FISHER, J. R. y NAMETH, S. T. 2000. Virus Assessment of *Ajuga reptans* Cultivars Reveals Alfalfa Mosaic, Tobacco Streak, and Cucumber Mosaic (CMV) Viruses, and a CMV Satellite RNA. HortScience 35(2): 230-234.
- FLORES, R. 2003. Descendiendo por la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida: Los Viroides. Traducido al castellano de: Descendent l'escala biològica cap a la frontera i l'origen de la vida: els viroides. Omnis Cellula 3: 11-18.
- FLORES, R.; GAS, M. E.; MOLINA, S. D.; NOHALES, M. A.; CARBONELL, A.; GAGO, S.; DE LA PEÑA, M.; DAROS, J.A. 2009. Viroid replication: Rolling-circles, enzymes and ribozymes. Viruses 1: 317-334.
- GALLITELLI, D.; VOVLAS, C.; MARTELLI, G.; MONTASSER, M. S.; TOUSIGNANT, M. E.; KAPER, J. M. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against Cucumber Mosaic Virus: II. Field test under natural epidemic conditions in Southern Italy. Plant Disease 75: 93-95.

- GARCÍA, L. I.; KAPER, J. M.; DÍAZ, J. R. R.; RUBIO, M. H. 1984. Emergence and Characterization of Satellite RNAs Associated with Spanish Cucumber Mosaic Virus Isolates. *Journal of General Virology* 65: 539-547.
- GRUMET, R. 1990. Genetically engineered plant virus resistance. *HortScience*. 25(5): 508-513.
- GUTIÉRREZ, C. V.; RUIZ, R. M.; PIEDRA, E. I.; DE LA TORRE, R. A. 2004. Caracterización de una variante del Virus Mosaico del Pepino (CMV) asociada con los síntomas de moteado amarillo de la Azucena (*Hippeastrum × hybridum* Leopoldii) en México. *Agrociencia* 38: 343-354.
- HAYAKAWA, T.; MIZUKAMI, M.; NAKAJIMA, M.; SUZUKI, M.; 1989. Complete Nucleotide Sequence of RNA 3 from Cucumber Mosaic Virus (CMV) Strain O: Comparative Study of Nucleotide Sequences and Amino Acid Sequences among CMV Strains O, Q, D and Y. *Journal of General Virology* 70: 499-504.
- INEGI, 1998. La Horticultura Ornamental en México. INEGI. México. pp. 1-81.
- INSTITUTO DE BIOINFORMATICA DE SUIZA. 2014. ViralZone. Revisado en: <http://viralzone.expasy.org>.
- KAPER, J. M.; TOUSIGNANT, M. E.; STEEN, M. T. 1988. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. XI. Comparison of 14 CARNA 5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 163(2): 284-92.
- LEPIZ, I. R. y RODRIGUEZ, G. E. 2006. Los Recursos Fitogenéticos de México. pp. 13-29. *In: Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura: Informe Nacional 2006*. MOLINA, M. J. C. y CÓRDOVA T. L. (eds.). Secretaría de Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.

MATTHEWS, R. E. F. 1991. Plant Virology. Academic Press Inc. 3° Edition. USA. 815 p.

MCGARVEY, P. B.; MONTASSER, M. S.; KAPER, J. M. 1994. Transgenic tomato plants expressing satellite RNA are tolerant to some strains of Cucumber Mosaic Virus. Journal of American Society Hort. Sci. 119(3): 642-647.

MONTASSER, M. S.; TOUSIGNANT, M. E.; KAPER, J. M. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: 1. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. Plant Disease 75:86-92.

MONTASSER, M. S.; TOUSIGNANT, M. E.; KAPER, J. M. 1998. Viral satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. Plant Disease. 82: 1298-1303.

NIE, X.; SINGH, P. R.; BOSTAN, H. 2005. Molecular cloning, secondary structure, and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plants. Canadian Journal of Plant Pathology. 27: 592-602

PANTOJA, S. J.; CECILIA, R. N.; AGUDELO, H. C. A., 2011. Estudio citogenético de *Iresine herbstii* Hook. e *Iresine retusifolia* Agudelo (Amaranthaceae) de Colombia. Rev. Asoc. Col. Cienc. 23: 19-30.

PÉREZ, M. L.; RICO, J. E.; SANCHEZ, P. R. J.; ASCENSIO, I. J. T.; DIAZ, P. R.; RIVERA, B. R. F. 2004. Identificación de virus patógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (2): 187-197.

- RAMÍREZ, J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. Biodiversitas 5:1-5.
- RIVERA, R. F. B.; GIN, R.; SEMANCIK, J. S. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. *Analytical Biochemistry* 156: 91-95.
- ROOSINCK, M. J.; SLEAT, D.; PALUKAITIS, P. 1992. Satellite RNAs of Plant Viruses: Structures and biological effects. *56(2)*: 265-279.
- SCHULZ, F. T. y SPIRE, B. 1993. Molecular analysis of immunodeficiency viruses. pp. 139-164. *In: Molecular Virology. A practical approach.* DAVISON, J. A.; ELLIOTT, R. M. (Eds.). OIRL Press. USA.
- SPIEKER, R. L., 1996. The molecular structure of *Iresine* viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii* ('beefsteak plant'). *Journal of General Virology* 77: 2631-2635.
- SINGH, R. P. y DILWORTH, A. D. 2006. Detection of *Citrus exocortis* viroid, *Iresine* viroid, and *Tomato chlorotic dwarf* viroid in new ornamental host plants in India. *Plant Disease* 90: 1457.
- SOSA, M. C.; PERDOMO, R.; BRATHWAIT, 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.
- STOMMEL, R. J.; TOUSIGNANT, M. E.; WAI, T.; PASINI, R.; KAPER J. M. 1998. Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to Cucumber Mosaic Virus. *Plant Disease* 82(4): 391-396.

- TABLER, M. y TSAGRIS, M. 2004. Viroids. Petit RNA pathogens with distinguished talents. Trends in Plant Science 9: 339-348.
- TAMURA, K.; STECHER G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
- VALVERDE, R. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease 74:255-258.
- VALVERDE, R.; SABANADZOVIC, S.; HAMMOND, J. 2012. Viruses that enhance the aesthetics of some ornamental plants: Beauty or Beast?. Plant Disease. 96(5): 600-611.
- VERHOEVEN, J. T. J.; JANSEN, C. C. C.; BOTERMANS, M.; ROENHORTS, J. W. 2010. First report of *Iresine viroid 1* in *Celosia plumosa* in Netherlands. Plant Disease. 94 (7): 920.
- WALKEY, D. G. A. 1991. Applied Plant Virology. Chapman & Hall. 2º Edición. London. 338p.
- WU, G.; KAPER, J. M.; TOUSIGNANT, M. E.; MASUTA, C.; KUWATA, S.; TAKANAMI, Y.; PEÑA, L.; DIAZ, R. J. R. 1993. Tomato necrosis and the 369 nucleotide Y satellite of cucumber mosaic virus: factors affecting satellite biological expression. Journal of General Virology. 74: 161-168.
- YIE, Y.; ZHAO, S. Z.; LIU, Y. Z.; LIU, Y. L.; TIEN, P. 1992. High resistance to Cucumber Mosaic Virus conferred by satellite RNA and Coat Protein in transgenic commercial Tobacco cultivar G-140. Molecular Plant-Microbe Interactions 5(6): 460-465.