



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN MOLECULAR DE
VIRUS EN PLANTAS DE HIGO
(*Ficus carica* L.)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ABRIL PATRICIA LÓPEZ PARRA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RODOLFO DE LA TORE ALMARÁZ
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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 AUTÓNOMA DE MÉXICO POR HABERME PERMITIDO PERTENECER A LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS, Y QUE CON ORGULLO Y HONOR LLEVAMOS EL SÍMBOLO DE LA UNAM Y DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.

AL DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARÁZ, GRACIAS POR HABER CREIDO EN MI, POR LA CONFIANZA, LA PACIENCIA, EL TIEMPO Y TODO EL APOYO BRINDADO, ASÍ COMO POR LA OPORTUNIDAD DE HABERME PERMITIDO TRABAJAR EN SU LABORATORIO, POR TODAS LAS ENSEÑANZAS QUE ME LLEVE EN EL DESARROLLO DE ESTA TESIS. ASÍ COMO LOS BUENOS TIEMPOS Y RISAS JUNTO CON LOS DEMÁS COMPAÑEROS.

A LA DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA, POR SU GRAN APOYO, SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS, POR LA ASESORÍA BRINDADA Y POR EL TIEMPO BRINDADO.

AL DR. BENITO ESTRADA MENA, POR EL TIEMPO Y APOYO BRINDADO, ASI COMO SU AYUDA EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA M. EN C. WENDY BEATRIZ PÉREZ BAÉZ, POR EL TIEMPO, LOS COMENTARIOS, POR LA ASESORIA Y LA CONFIANZA BRINDADA.

A LA BIOL. MARIA ELENA GARCÍA GRANADOS, POR SU VALIOSO TIEMPO, POR LA ASESORIA BRINDADA, ASÍ COMO POR AMPLIAR MI PANORAMA EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

AL M. EN C. RAMIRO CRUZ DURAN POR EL APOYO Y SU GENEROSIDAD AL AYUDARME PARA TENER UN REGISTRO DE ESTE TRABAJO EN EL HERBARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, QUE SE ENCUENTRA A SU CARGO.

A LA TEC. PATRICIA ALEY MEDINA POR SU GRAN AYUDA PARA PROCESAR Y PREPARAR LAS MUESTRA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, GRACIAS POR SU TIEMPO Y COMPARTIR SU CONOCIMIENTO.

AL DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCIA POR SUS COMENTARIOS Y SU VALIOSO TIEMPO, ASÍ COMO SU APOYO PARA PODER PROCESAR Y OBTENER LAS IMAGENES EN MISCROSCOPIA ELECTRÓNICA.

DEDICATORIA

ESTA TESIS VA DEDICADA A MIS PADRES, GUADALUPE Y OSCAR.

GRACIAS POR AYUDARME A CONCLUIR MI SUEÑO DE TERMINAR LA UNIVERSIDAD, POR EL APOYO INCONDICIONAL, POR HABER ESTADO AHÍ SIEMPRE SIN IMPORTAR NADA, POR APURARME Y ALENTARME A CONTINUAR, AL IGUAL QUE A LAS NIÑAS DE LA CASA QUE SIEMPRE ESTABAN AHÍ PARA ANIMARME. POR QUE USTEDES SON MI FAMILIA Y ME HAN ENSEÑADO EL CAMINO DE LA SUPERACIÓN.

GRACIAS FAMILIA.

ÍNDICE

<u>TEMA</u>	<u>PÁGINA</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	6
Características Generales de <i>Ficus carica</i>	6
Características Generales de los Virus	9
Clasificación de Virus	10
Virus en Plantas	12
Síntomas Causados por Virus en Plantas	13
Diseminación de Virus	14
Métodos de Diagnóstico en Virus Fitopatógenos	15
Transmisión Mecánica	16
Transmisión por Vectores	16
Microscopía Electrónica	17
Serología	17
Análisis Molecular de Ácidos Nucleicos	18
Patrón Electroforético de ARN Replicativo Viral (dsRNA)	18
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19

Patógenos Virales en <i>Ficus carica</i>	19
<i>Fig Mosaic Virus</i> (FMV)	21
<i>Fig leaf motle-associated virus</i> (FLMaV-1)	23
<i>Fig leaf motle-associated virus</i> (FLMaV-2)	25
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Recolecta de Muestras	28
Análisis Electroforético en gel de Poliacrilamida no Desnaturalizante al 6% (PAGE) de ARN de Origen Viral	29
Transcripción Reversa Ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	29
RT-PCR para FMV	30
RT-PCR para FLMaV-1	31
RT-PCR para FLMaV-2	31
Microscopía Electrónica	32
Secuenciación de los Productos de RT-PCR de FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2	32
Análisis de Secuencias	32

RESULTADOS	33
Análisis Electroforético en gel de Poliacrilamida no Desnaturalizante al 6% (PAGE) de ARN de Origen Viral (ds RNA)	33
Transcripción Reversa Ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	34
Microscopía Electrónica	35
Secuenciación de los Productos de RT-PCR de FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2	36
Análisis de Secuencias	38
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
Perspectivas	44
Literatura Citada	44

RESUMEN

En recorridos por jardines públicos y privados de la ciudad de México se observan numerosas plantas de higo (*Ficus carica* L.), con daños como clorosis, moteado y manchas anulares, así como reducción del tamaño de las hojas y deformación. Con el objeto de identificar a los agentes causales involucrados en los daños descritos, se realizó un análisis el cual incluyó electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE) de ARN de doble cadena de origen viral. Se observaron bandas de ARN que corresponden al genoma de *Fig mosaic virus* (FMV), así como de sus correspondientes componentes subgenómicos, pero no para *Fig leaf mottle-associated virus* FLMaV-1 y FLMaV-2. Además se realizaron cortes de muestras de hojas con síntomas, que se visualizaron por microscopio electrónico y se lograron observar e identificar cuerpos de doble membrana (DMB) característicos de FMV. Para determinar la identidad de los virus FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2 se secuenciaron productos de ensayos de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, del tamaño esperado para FMV (300pb), FLMAV-1 (420pb) y FLMAV-2 (352pb). Para el virus FMV se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (300pb), sin embargo para FLMaV-1 y FLMaV-2 no se obtuvieron varios amplicones. La secuenciación directa de los amplicones obtenidos confirmó la identidad del virus FMV, con un porcentaje alto, por alineamiento y comparación con secuencias disponibles en el GenBank/NCBI. En este trabajo se reporta la presencia del virus FMV, pero no la presencia de FLMAV-1 y FLMAV-2 en *Ficus carica*. Aunque ya existe un reporte anterior, este es el primero donde se confirma la presencia y la identidad del virus FMV en *Ficus carica* para México, por medio de técnicas moleculares como patrón electroforético de ARN, microscopía electrónica, RT-PCR y secuenciación.

INTRODUCCIÓN

La horticultura ornamental es una de las actividades con más rentabilidad en la agricultura en nuestro país. Cerca de 270 especies de plantas se producen con fines ornamentales principalmente en los estados de México, Morelos, Puebla Veracruz y el Distrito Federal. Desde hace tiempo se utiliza una gran variedad de especies de plantas para adorno de parques y jardines públicos o privados (INEGI, 1998; Lepiz, y Rodríguez, 2006).

Una de las plantas ornamentales presentes en México es el higo (*Ficus carica* L.) que se encuentra dentro del grupo de las dicotiledóneas y pertenece a la familia *Moraceae* y al género *Ficus*, que cuenta con más de 1000 especies (Flores et al., 2007). *Ficus carica* es utilizado en jardinería y para delimitar áreas verdes, así como cultivo en el sector agrícola. Es un árbol o arbusto de 5 a 10 m de altura, de hojas simples, alternas ovales, acorazonadas y palmadas con 3 a 7 lóbulos y su fruto característico es el sicono, se propaga por estaca, acodo aéreo, por semilla e injerto.

Ficus carica es una especie importante que crece en varias áreas geográficas, mas notablemente en la zona litoral del Mediterráneo. Es nativo de zonas tropicales, y subtropicales de Europa, Asia, África y el Pacífico, pero se encuentra adaptada a diferentes zonas y climas. Países como España, Turquía, Portugal y Brasil destinan gran parte de su territorio en su cultivo, por su ascendente valor económico (Flores y Jiménez 2007).

La mayoría los ejemplares de *Ficus carica* se encuentran comúnmente afectados por daños foliares que se describen como mosaico, este tipo de daños fueron descritos hace

aproximadamente 80 años, y la identidad del agente causal por mucho tiempo fue difícil de esclarecer, aunque siempre se encontraba implicado el ácaro eriofido *Aceria ficus* (Figura 1) como el probable vector (Caglayan et al., 2012).



Figura 1. Vista dorsal de *Aceria ficus*, microscopía electrónica.
(Tomado de Caglayan et al., 2012)

En el país, la higuera la podemos encontrar en Baja California Norte y Sur, en el Distrito Federal, Hidalgo, Michoacán, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, se cultiva de forma aislada y se considera una especie marginal (CONABIO, 2014); sin embargo, en cuanto a valor económico de exportación México se encuentra dentro de los primeros lugares según la FAO (2011) (Cuadro 1), además se encuentra distribuida aleatoriamente en las áreas verdes del Valle de México de forma ornamental.

En jardines públicos, jardines privados y viveros comerciales de la Ciudad de México, es común observar plantas de higo con daños como: clorosis, mosaicos y manchas anulares, así como reducción del tamaño de las hojas y su deformación (Figura 2).

En México se han observado estos síntomas, el análisis visual de las plantas de higo sugiere que estos podrían ser causados por virus o viroides.

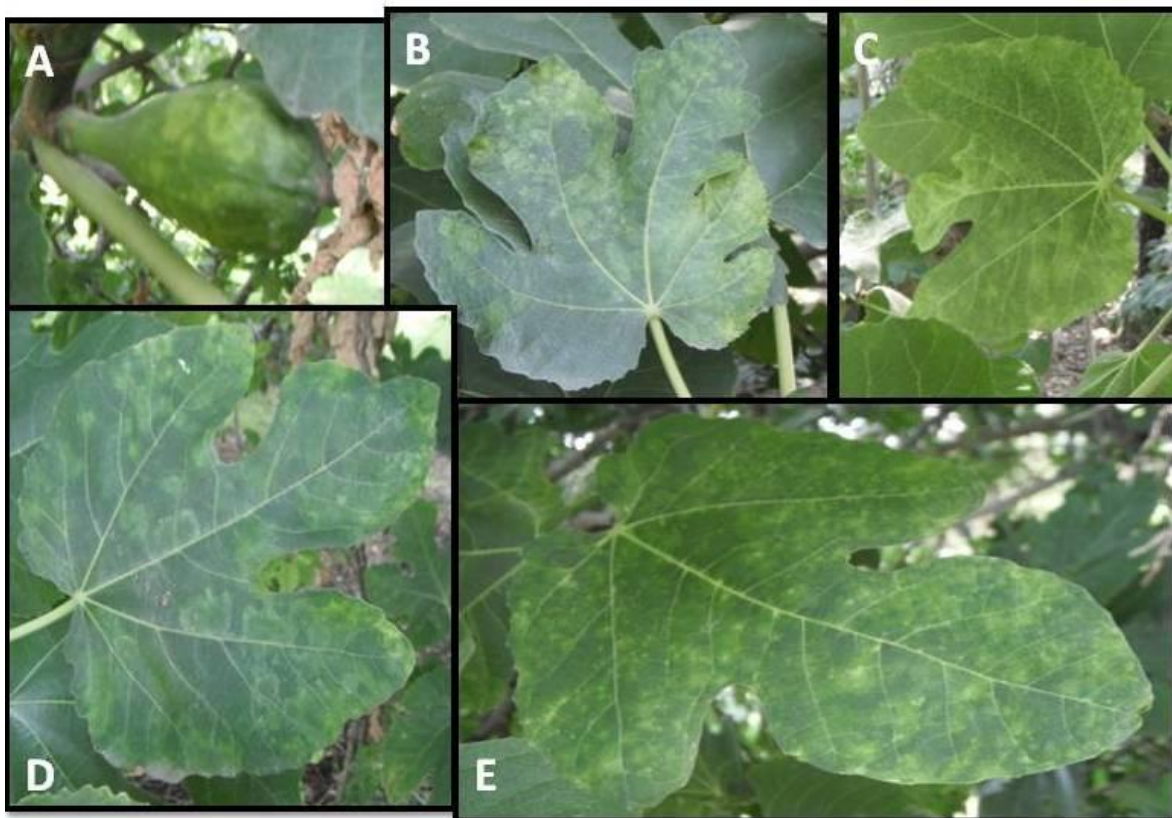


Figura. 2. Síntomas observados en higo A) manchas anulares en fruto, B) manchas cloróticas, C) reducción en el tamaño de la hoja y deformación, D) manchas anulares y E) mosaicos. Fotos tomadas de los ejemplares de diferentes lugares de recolección de muestra

Posición	Región	Cantidad (tonnes)	Símbolo	Valor (1000\$)
1	Turquía	44821	46	151546
2	Estados Unidos de América	5393	224	21284
3	Irán (República Islámica del)	5012	64	18726
4	Alemania	2549	232	13106
5	México	673	164	6817
6	Grecia	1878	101	6654
7	Afganistán	2107	16	5591
8	Países Bajos	1999	256	5378

Cuadro 1. Posición de México referente a valor económico de exportación de higo seco (FAO, 2011)

El diagnóstico de este tipo de patógenos es difícil de realizar por técnicas tradicionales comunes como la observación de síntomas, debido a su tamaño ultramicroscópico y a su composición química, además se puede encontrar la presencia de más de un virus infectando la planta. En este trabajo se utilizaron diferentes técnicas de diagnóstico de virus, como el análisis de ARN de doble cadena (dsRNA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de productos de la PCR y microscopía electrónica para precisar la identidad de los agentes causales de los daños o síntomas observados en el higo ornamental.

Es importante realizar un diagnóstico de manera oportuna de los virus fitopatógenos presentes en *Ficus carica*, ya que es fundamental para la comercialización y distribución de plantas de ornato y comestibles, porque cuenta con un valor económico importante, por ello es necesario contar con elementos que permitan certificar que el producto esté libre de virus, que puede afectar la economía agrícola de los países receptores de estas plantas, por lo que se ve imposibilitada la exportación y por consiguiente la prospección de abrirse a nuevos mercados.

ANTECEDENTES

Características Generales de *Ficus carica*

La familia *Moraceae*, comprende más de 60 géneros y más de 1500 especies tropicales y subtropicales, es la familia más grande del Orden *Urticales* en la Subclase *Hamamelidae*, dentro de esta familia se encuentra el género *Ficus*, que cuenta con más de 1000 especies y todas ellas se caracterizan por la forma cerrada de las inflorescencias. Entre las especies de *Ficus* se pueden encontrar árboles, arbustos y trepadoras (Flores y Jiménez, 2007).

Ficus carica (Cuadro 2) es un árbol o arbusto, caducifolio o perennifolio, de 5 hasta 10 m de altura, de hojas simples alternas ovales, rugoso pubescentes acorazonadas y palmadas con 3 a 7 lóbulos, a veces lobuladas una segunda vez, irregularmente dentadas; miden de 10 a 20 cm de longitud y casi igual de ancho (Figura 3). La corteza por el exterior es lisa, de forma interna tiene una gran cantidad de células laticíferas que producen latex, que al entrar en contacto con el aire se espesa. La inflorescencia donde se arreglan las flores se conoce como sicono, que es blando ovoide o elipsoide. Las semillas son numerosas y pequeñas pudiendo ser fértiles o no ((Flores y Jiménez 2007; SEMARNAT, 2014).

Ficus carica tiene su origen en Asia Sudoccidental, de zonas tropicales y subtropicales, actualmente se le puede encontrar en la cuenca mediterránea, en los trópicos, a altitudes relativamente elevadas de 900 a 1800m. Esta adaptada a diferentes regiones o climas, pero su crecimiento es óptima en zonas templadas (CONABIO, 2014).

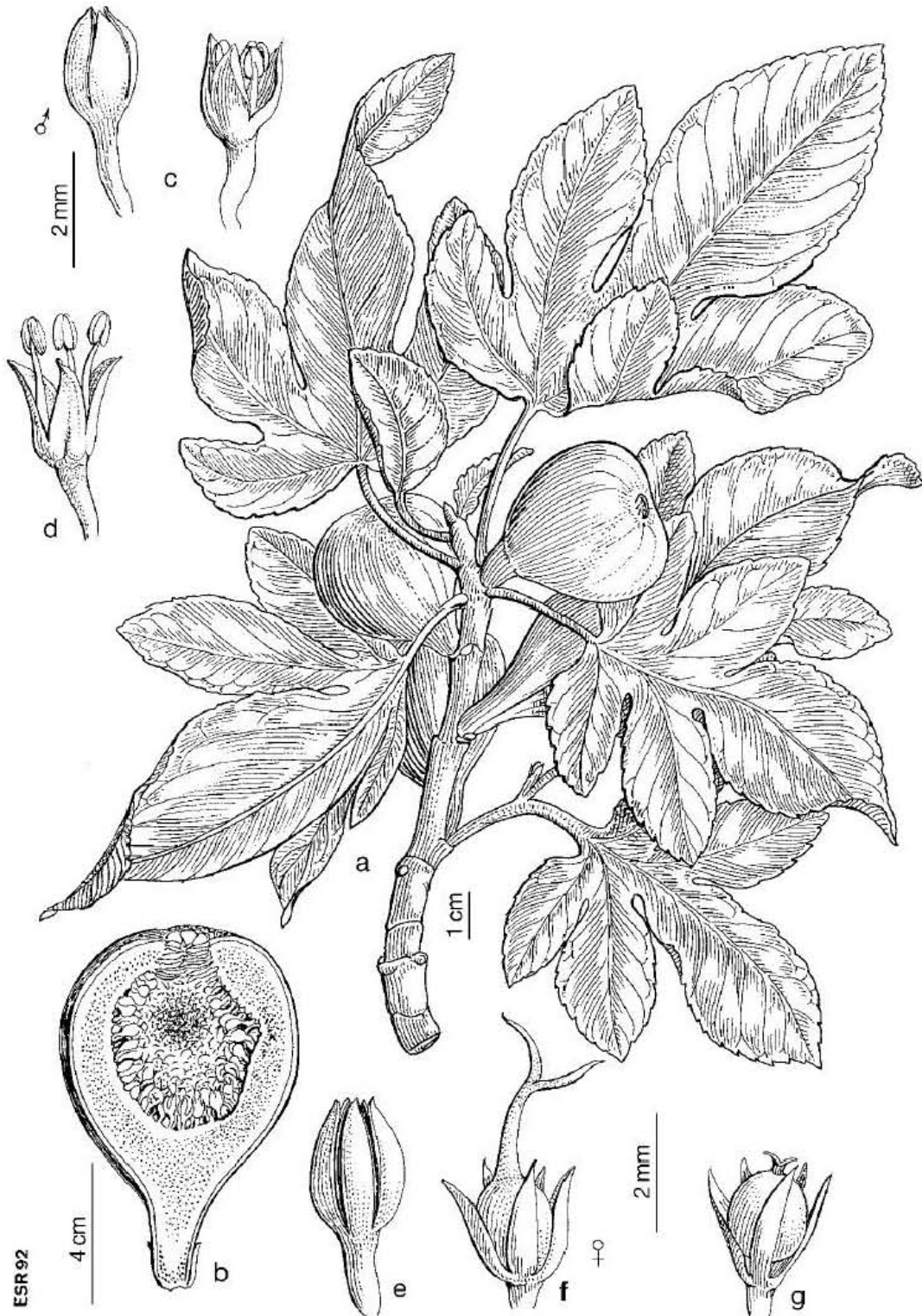


Figura 3. *Ficus carica*: a) rama fructifera; b) sección longitudinal de un sicono; c) flores masculinas inmaduras; d) flor masculina madura; e) flor femenina inmadura; f) flor femenina longistila; g) flor femenina galigena. Imagen tomada y modificada de la red.

En el país se cultiva de forma aislada y es considerada una especie marginal, se le puede encontrar Baja California Norte, Baja California Sur, Distrito Federal, Hidalgo, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Sonora, Zacatecas, a altitudes de 1000 a 2000m. En México requiere una temperatura media anual de 17 a 19 °C y una precipitación anual de 90-120 m, es un árbol poco exigente en cuanto a suelos.

Su reproducción es mayormente asexual mediante estacas, esquejes o división de los retoños, es el más usado comercialmente; el material vegetal se obtiene de ramas laterales por ser más productivas que las conseguidas de chupones. Por su parte la reproducción sexual se da mediante la polinización que es asegurada por la avispa *Blastophaga psenes*, que cuida de transmitir el polen fecundado a las flores femeninas (SEMARNAT, 2014).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Hamamelidae
Orden	Urticales
Familia	Moraceae
Género	<i>Ficus</i>
Especie	<i>Ficus carica</i> L.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Ficus carica*, Cronquist 1981.

Características Generales de los Virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados, submicroscópicos, su genoma está compuesto por uno o más componentes de ácido nucleico ya sea de ARN o ADN de cadena sencilla o doble, se encuentran dentro de una cápside y algunos poseen envolturas que pueden ser de naturaleza lipoproteica y glicoproteica (Figura 4). Las partículas virales infectan a todo tipo de células procariotas y eucariotas. Los virus utilizan la maquinaria celular para su replicación y posterior producción de partículas virales (Carter y Saunders, 2007).

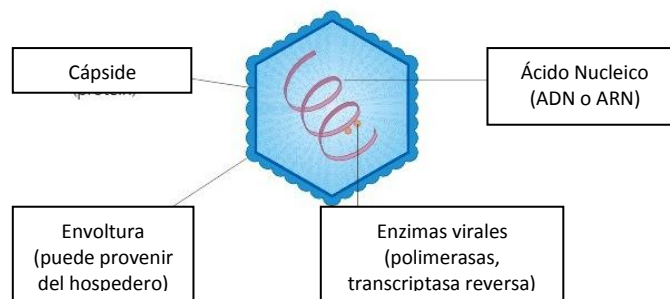


Figura. 4. Estructura básica de un virus.

La manera en que los virus van a replicarse varía dependiendo de la naturaleza de su genoma (Figura 5), el cual está basado en la clasificación propuesta por Baltimore, donde se toma en cuenta el material genético presente en el virión.

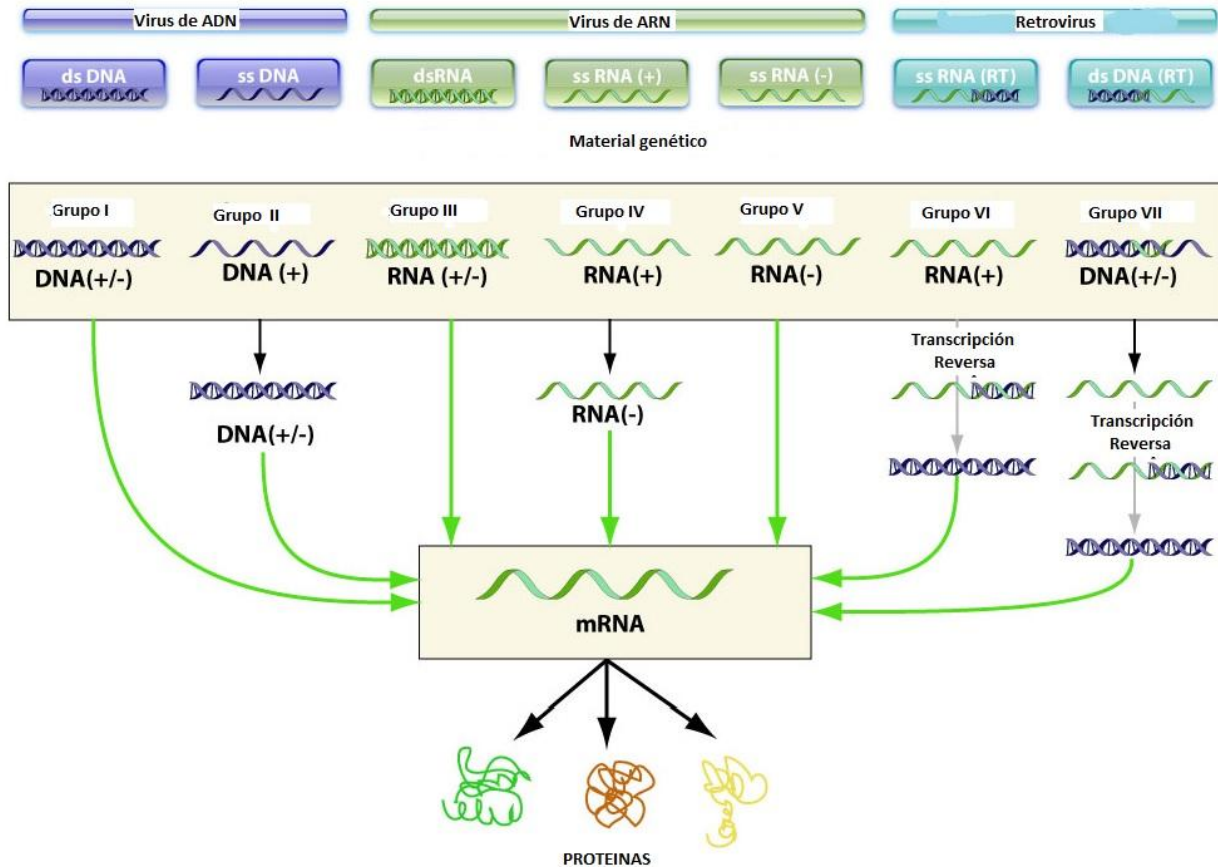


Figura 5. Esquema de replicación de virus por tipo de genoma propuesto por Baltimore (Tomado y modificado de ViralZone, 2014).

Clasificación de Virus

Se pueden clasificar por su composición química, características morfológicas (tamaño, simetría de la cápside) y biológicas (modo de transmisión, el huésped al que infectan o los daños que causan). David Baltimore propuso un sistema para clasificar a los virus de acuerdo con el ácido nucleico con el que cuentan así como el mecanismo de replicación; cada especie de virus tiene un nombre oficial que permite su identificación por reconocimiento de algunas de sus características generales (Cuadro 3). Este nombre es en

inglés, la primera palabra describe al hospedero o al lugar geográfico donde históricamente fue encontrado; la segunda describe el síntoma principal; y finalmente la tercera incluye la palabra virus (Shors, 2009).

Un total de 43 familias tienen miembros que infectan plantas.

Clase	Especificaciones
I	Virus de DNA bicatenario (dsDNA)
II	Virus de DNA monocatenario (ssDNA)
III	Virus de RNA bicatenario (dsRNA)
IV	Virus de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA+)
V	Virus de RNA monocatenario de sentido negativo (ssRNA-)
VI	Virus de RNA de transcripción inversa
VII	Virus de DNA de transcripción inversa.

Cuadro 3. Clases de virus y sus especificaciones generales.

Los virus interrumpen las funciones normales de las plantas al utilizar sus fuentes estructurales y químicas para elaborar partículas virales, que alteran el metabolismo vegetal y resultan en enfermedades.

Virus en Plantas

Los virus son un grupo importante de patógenos que afectan diversas especies de plantas, algunos causan enfermedades silenciosas, incurables y altamente contagiosas, y en ocasiones son difíciles de detectar, lo cual ha generado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos.

Los virus dañan desde hojas, tallos, frutos, raíces, flores hasta semillas. Aunque se desconoce el número de pérdidas ocasionadas por virus en plantas, se reconoce su presencia y los daños que causan, ya que son numerosos los virus que se pueden encontrar causando infecciones en estas.

Encontramos varios géneros de virus que afectan plantas (Figura 6) tanto de ADN como de ARN, entre los más comunes podemos mencionar: *Cucumber mosaic virus* (Bromoviridae), *Alfalfa mosaic virus* (Bromoviridae), *Broad bean wilt virus* (Comoviridae), *Tomato spotted wilt virus* (Bunyaviridae), *Hibiscus chlorotic ringspot virus* (Tombusviridae), *Hydrangea ringspot virus* (Bromoviridae), *Dahlia mosaic virus* (Caulimoviridae), *Broad bean wilt virus* (Comoviridae), entre otros (De la Torre, 2012).

No se tiene suficiente cultura sanitaria que procure utilizar material libre de virus, por lo que la principal forma de diseminación de estos patógenos es la utilización de material infectado, que en ocasiones se ve favorecida por insectos vectores

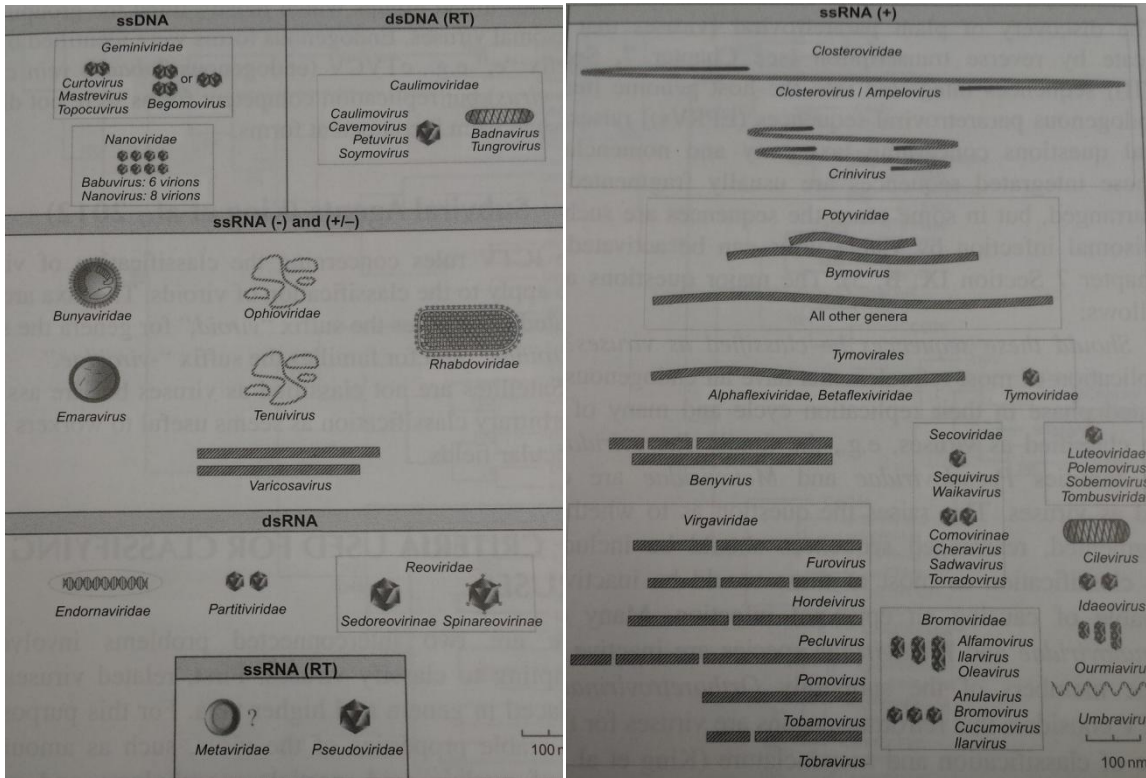


Figura 6. Géneros de virus que infectan plantas (Tomado de Hull, 2014).

Síntomas Causados por Virus en Plantas

Aunque los síntomas que puede presentar una planta no están estrictamente relacionados con los que inducen los virus, ayudan a realizar un diagnóstico inicial de la presencia de este tipo de patógenos

Los síntomas más comunes son manchas anilladas necróticas o cloróticas, mosaicos, moteados, marchitez, clorosis, deformación, enanismos, sin embargo, también pueden ser causados por la infección de otros patógenos como protozoarios, hongos, nematodos y bacterias (Pérez *et al.*, 2004).

Las plantas que se encuentran infectadas por virus pueden manifestar un síntoma o una variedad de ellos, lo cual depende de la severidad y ocasionan diferentes niveles de pérdidas en plantas enfermas (Matthews, 1991).

Los síntomas relacionados a la presencia de virus pueden afectar a la totalidad de la planta o centrar sus efectos en algunos órganos específicos; se producen principalmente mosaicos, que se manifiestan en hojas con áreas alternadas de color diferente al que caracteriza a una hoja sana. De acuerdo con la intensidad y forma de los mosaicos, se describen como moteados o manchas cloróticas, rayados, bandeados o con aclaramiento de nervaduras. Otro síntoma son las manchas anulares, donde pequeñas manchas cloróticas se convierten en manchas o anillos cloróticos o necróticos tanto en tallos, hojas o frutos. Otro síntoma es el enanismo, donde se reduce de forma considerable el tamaño de la planta, con acortamiento de entrenudos y proliferación de hojas. También se presentan deformaciones, que son alteraciones severas de la forma de hojas, tallos, flores o frutos (De la Torre, 2012).

La gravedad de los síntomas depende de numerosos factores, que están relacionados con la naturaleza del huésped y con las condiciones en las que ésta se encuentra.

Diseminación de Virus

Las partículas virales penetran en las plantas por medio de heridas, picaduras o mordeduras de insectos u otros vectores, por injertos, incluso de forma menos frecuente por el polen o a través de semillas procedentes de plantas infectadas (Bovey, 1977).

Los virus se pueden diseminar al pasar de una planta enferma a una sana por el roce de sus hojas, donde se generan pequeñas heridas en su epidermis; que una vez expuestas al

contacto se da el intercambio de jugos en el que los virus infectan a las células epidermales, allí se multiplican para después distribuirse al resto de la planta, lo cual es muy común en los cultivos o parques por el contacto de una planta con otra. La infección también es favorecida por contacto con animales, labores de cultivo, herramientas o bien por eventos meteorológicos como granizo, lluvia, viento, entre otras.

El método más común de diseminación es por la acción de insectos durante sus actividades de alimentación. Los organismos que transmiten virus son variados, podemos encontrar desde áfidos, chicharritas, ácaros, nematodos ectoparásitos, moscas blancas, piojos harinosos, chinches verdaderas, hongos, escarabajos, hasta saltamontes. Los vectores de importancia cuentan con un aparato bucal que perfora la epidermis y succiona la savia de las plantas infectadas, algunos llevan dentro de sus estiletes a los virus (no persistentes) y otros se acumulan en su cuerpo para después introducirlos en otras plantas (persistentes).

Sin embargo, también es común la transmisión por reproducción vegetativa, ya sea por injertos, esquejes, acodos, hijuelos, entre otras, procedentes de plantas infectadas (Llacer et al., 2000)

Los virus se mantienen activos en toda la planta, por lo que pueden encontrarse en ramas, tubérculos, rizomas, cormos, bulbos, estolones, o en otras estructuras que pueden utilizarse como injertos, esquejes, que son capaces de infectar a otras plantas.

Métodos de Diagnóstico de Virus Fitopatógenos

Para la identificación de un virus se toman en cuenta diferentes criterios donde prevalece el de los síntomas observados, dado que es altamente orientativo para establecer la etiología

de una nueva enfermedad, pero no siempre son efectivos dado que puede ser resultado de la presencia de un virus o varios de ellos causando síntomas similares, por lo cual se han implementado diversos métodos de diagnóstico por el reconocimiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Algunos métodos tienen ventajas inmediatas por la rapidez con la que permiten obtener resultados; sin embargo, hay otros que aunque son de gran utilidad por facilitar el conocimiento de algunas de las propiedades de los virus, pero tienen desventajas por el tiempo de obtención de resultados además del equipo especializado y el costo.

La correcta identificación de un virus en una planta constituye el inicio de un proceso para adoptar medidas adecuadas de combate y llevar a cabo estudios epidemiológicos (Conti et al., 2001).

Transmisión Mecánica

Se lleva a cabo mediante la separación del virus de la planta enferma para transmitirlo a una planta sana, que se conoce como rango de hospedantes, puede realizarse a través de una técnica que consiste en frotar macerados de hojas enfermas contra hojas de plantas sanas; en un plazo de 15 a 30 días se observa el tipo de daños presentes en las hojas inoculadas.

La transmisión artificial de virus también puede realizarse por injerto de ramas o yemas de una planta enferma a una sana. Otro método es la biobalística en la que se inoculan virus o viroides, aunque se trata un método barato es tardado y no siempre seguro.

Transmisión por Vectores

Esta se da más de forma natural y común principalmente por insectos, este método se puede utilizar para realizar la separación o inoculación artificial de virus a plantas sanas y determinar, así, la forma de diseminación de determinados virus, permitiendo conocer algunas de sus propiedades biológicas y las posibles implicaciones ecológicas.

Aunque es un método barato, es difícil de establecer, ya que se requiere del cultivo y manejo de insectos sanos, que no siempre se encuentran disponibles.

Microscopia Electrónica

Con este método se puede observar la forma de las partículas virales en las células de los tejidos infectados o en macerados de hojas de plantas enfermas. Sin embargo, no se siempre se encuentran partículas virales en los tejidos enfermos. Además otra desventaja es que se trata de un método de difícil acceso, que sólo se encuentra disponible en algunos laboratorios especializados.

Serología

El ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) es una prueba serológica donde el antígeno o un primer anticuerpo se fija en un soporte donde se le hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente marcado con una enzima. Este método es relativamente barato y se encuentra disponible en cualquier lugar. La ELISA es una prueba sensible y puede detectar bajas concentraciones de proteína viral (cápside viral) y es reproducible en un amplio rango de condiciones. Sin embargo, tiene sus limitaciones, ya que es muy específica para el virus que se desea detectar, y pueden darse reacciones inespecíficas en función de la relación entre dos virus o del proceso de elaboración de los anticuerpos (Horst, 1992).

ANÁLISIS MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El análisis molecular de ácidos nucleicos incluye diferentes técnicas de laboratorio, y aunque en su mayoría son muy precisas, algunas son caras, difíciles de utilizar y no resultan prácticas para el diagnóstico de virus. Las técnicas que se utilizan comúnmente para el diagnóstico de virus son el análisis electroforético de ARN replicativo viral, la reacción en cadena de la polimerasa y sus variantes, así como la hibridación de ácidos nucleicos.

Patrón Electroforético de ARN Replicativo Viral (dsRNA)

Durante el proceso de replicación se forman cadenas dobles de RNA, que es generado como un producto intermedio, sirve como templado para la formación de nuevas y múltiples copias del ARN viral (Valverde, 1990), las cuales generan un patrón de bandas electroforético único para cada especie, el cual es visible en un gel de poliacrilamida, lo que permite su identificación con cierto grado de certeza (De la Torre, 2012). Este método detecta los ARNs que son muy resistentes a la degradación enzimática y no es normal su presencia en plantas sanas.

Este método de diagnóstico es barato y relativamente rápido y puede servir como un análisis presuntivo, sin embargo, para esto se requiere tener conocimiento previo de los patrones electroforéticos de los virus más comunes que afectan a plantas para determinar con precisión el patrón del virus que se está procesando.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Permite la amplificación de regiones específicas y altamente conservadas del genoma del virus, por lo regular, son regiones ubicadas dentro del gen de la proteína de la cápside viral (CP), aunque no en todos los casos (Llacer et al; 2000). En este método el efecto de la temperatura de alineamiento del oligonucleótido, el número de ciclos y la concentración de MgCl₂ juegan un papel importante para optimizar las condiciones en la detección del virus en cuestión. Esta técnica puede ser complementada con clonación y/o secuenciación para confirmar la identidad por comparación con secuencias similares disponibles en el Gen Bank, lo que lo hace un método muy específico y sensible. Este método es específico y muy sensible, aunque es relativamente caro, ya que requiere de equipo y reactivos especializados. Además, la PCR no es exclusiva de ADN, también se utiliza para el diagnóstico de virus del tipo ARN, añadiendo un paso intermedio (De la Torre, 2012).

Patógenos Virales en *Ficus carica*

Como se mencionó anteriormente, *F. carica* es una planta de cultivo y ornamental de reciente introducción en México, y ha crecido mucho su uso en jardines públicos y privados. En el caso de esta planta, los daños denominados como mosaico del higo (FMD) se describieron por primera vez en 1933 en California (Gaglayan et al., 2012) y desde los primeros reportes hechos por Condit en 1922 y Swingle en 1928 (Hafez et al., 2012) se han reportado varios virus (Cuadro 4) en diferentes países, como: *Fig leaf mottle-associated virus 1 y 2* (FLMaV 1 y 2) en Italia; el virus multipartita ARN de cadena sencilla y de sentido negativo *Fig mosaic-associated virus* (FMaV) en California. A su vez se han

reportado en Italia otros virus conocidos como filamentosos *Fig latente virus 1* (FLV-1) perteneciente a la familia Flexiviridae y *Fig mild mottle-associated virus* (FMMAV) de la familia Closteroviridae.

En Arkansas se reportaron 2 nuevos Closterovirus, *Arkansas fig closterovirus 1 y 2* (AFCV 1 y 2). Y recientemente en Italia ha sido reportado el nuevo virus biparita de doble cadena llamado *Fig cryptic virus* (FCV) (Elci et al., 2012).

Además en Japón también se han reportado virus que podrían pertenecer al grupo Carlavirus y en Croacia al grupo Potyvirus (Elbeshehy et al., 2011).

Y más recientemente se ha descrito el *Fig mosaic virus* (FMV) que es el principal agente de la enfermedad del mosaico del higo (FMD), el cual al ser secuenciado mostro tener un grado significativo de identidad con *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV), presentando homologías en la secuencia de la proteína de la nucleocapside, FMV y EMARaV se encuentran muy cercanamente relacionados (Ishikawa et al., 2012), por lo que se han agrupado en el mismo género recientemente denominado *Emaravirus* .

De igual manera, casi siempre asociado a la FMD se encuentran dentro de las células los denominados cuerpos de doble membrana (DMBs), que pueden ser de dos tipos: ovoides con un tamaño de 100 a 160 nm o alargadas rectas ligeramente flexibles de 100nm de diámetro (Castellano et al., 2007) las cuales son muy parecidas a las partículas virales encontradas en frijol de palo cuando se encuentra infectado por *Pigeonpea sterility mosaic*

virus (PPSMV) y al virus del maíz *Maize red stripe virus* (MRSV) que son representantes del género *Emaravirus*.

Virus	Familia	Género
Fig leaf mottle associated virus 1 (FLMaV-1)	<i>Closteriviridae</i>	<i>Closterovirus</i>
Fig leaf mottle associated virus 2 (FLMaV-2)	<i>Closteriviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>
Fig mosaic virus (FMV)	No asignada	<i>Emaravirus</i>
Fig mild mottle associated virus (FMMaV)	<i>Closteriviridae</i>	<i>Closterovirus</i>
Fig latent virus 1 (FLV-1)	<i>Flexiviridae</i>	<i>Tichovirus</i>
Arkansas fig closterovirus 1 (AFCV-1)	<i>Closteriviridae</i>	<i>Closterovirus</i>
Arkansas fig closterovirus 2 (AFCV-2)	<i>Closteriviridae</i>	<i>Closterovirus</i>
Fig badnavirus 1 (FBV-1)	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>
Fig cryptic virus (FCV)	<i>Partiviridae</i>	<i>Alphacriptivirus</i>

Cuadro 4. Principales virus identificados infectando *Ficus carica* (Tomado y modificado de Elci et al; 2012)

Todos los estudios anteriores nos muestran que diferentes virus pueden infectar al higo incluso en diferentes regiones geográficas (Elci et al., 2012).

Los virus que principalmente afectan la producción y la calidad del higo son *Fig mosaic virus* (FMV) y *Fig leaf mottle-associated virus 1 y 2* (FLMaV 1 y 2), que son lo más prevalentes y económicamente importantes.

Fig mosaic virus (FMV)

El virus FMV, pertenece al grupo V, es decir, virus de cadena sencilla de ARN de sentido negativo. Aun no cuenta con una familia asignada, pero pertenece al género *Emaravirus*.

Los viriones de FMV son partículas esféricas con envoltura (Figura 7); su genoma es de

12.2 kb de tamaño, conformado por 4 componentes (Cuadro 5) y recientemente se ha descubierto que cuenta con 2 más (Yu et al., 2013).

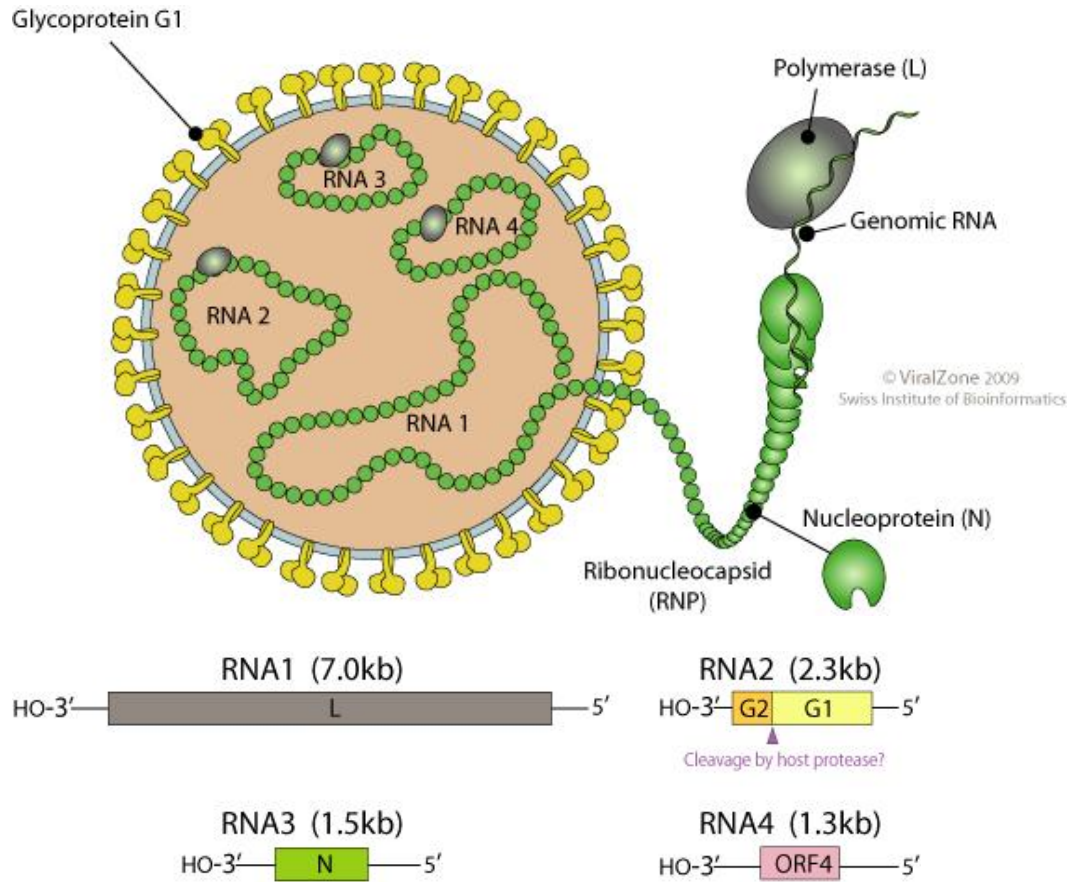


Figura 7. Representación del virión y del genoma multipartita de FMV (tomado del ViralZone Instituto Suizo de Bioinformática)

FMV	7093 nt P1: 264 kDa RdRp	2252 nt P2: 73 kDa Precursor de Glicoproteínas	1490 nt P3: 35 kDa Nucleocapside	1472 nt P4: 40.5 kDa Desconocido	1752 nt P5: 59 kDa Desconocido	1212 nt P6: 22 kDa Desconocido
-----	--------------------------------	---	--	--	--------------------------------------	--------------------------------------

Cuadro 5. Representación del virión y del genoma multipartita de FMV (tomado del ViralZone Instituto Suizo de Bioinformática)

El virus se une a los receptores de la célula hospedera, dando lugar a la fusión de membranas, dentro de la célula los segmentos de ribonucleocapside son liberados en el citoplasma, donde la transcripción de ARNm es llevada a cabo. Cuando hay suficiente nucleoproteínas para encapsidar los genomas virales se lleva a cabo la replicación. Para que finalmente los segmentos de ribonucleocapside se encapsulen con ayuda de la membrana celular y puedan ser liberados los nuevos viriones.

Fig leaf mottle-associated virus (FLMaV-1)

El virus FLMaV-1 pertenece al grupo IV, es decir, virus de ARN de cadena sencilla lineal de sentido positivo. Pertenece a la familia *Closteroviridae* y al género *Closterovirus*. Los viriones de FLMaV-1 son partículas sin envoltura (Figura 8), filamentosas y flexibles de aproximadamente 1250 a 2200nm de largo por 10 a 13nm de diámetro. Su genoma es de 15.5 a 19.3 kb.

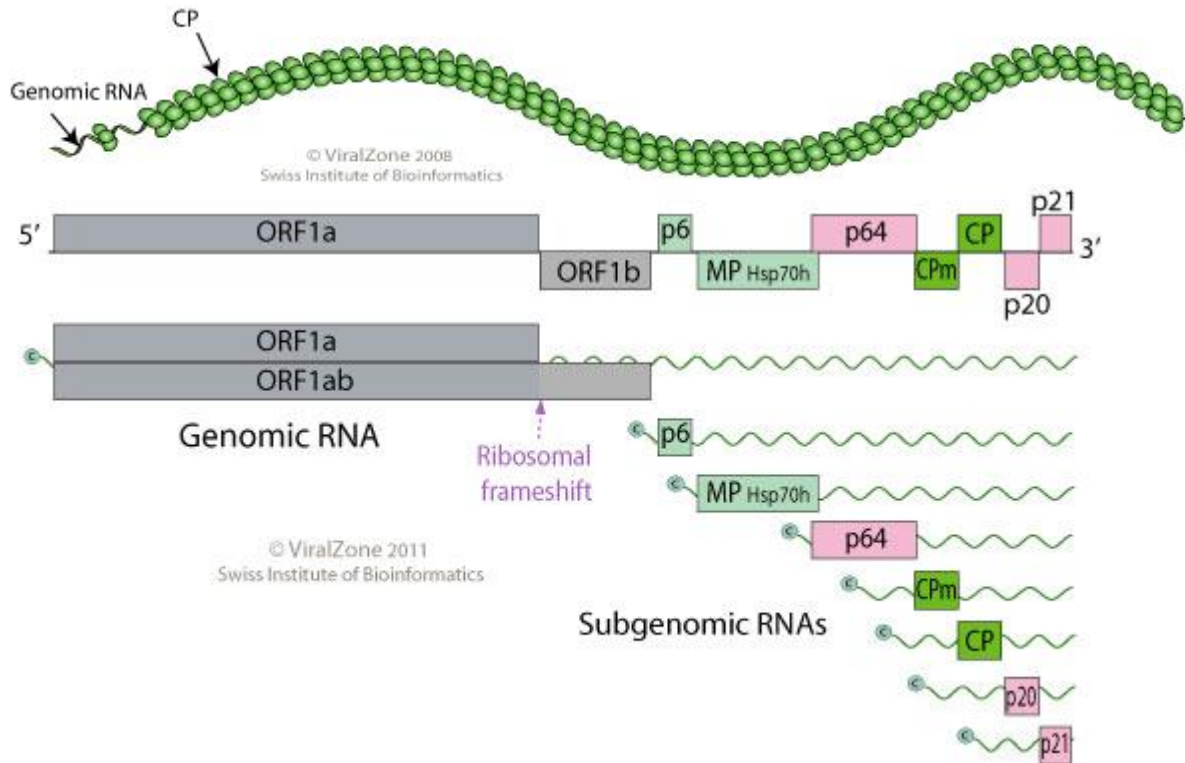


Figura 8. Representación del virión y del genoma de FLMaV-1 (tomado del ViralZone Instituto Suizo de Bioinformática)

El virus penetra en la célula hospedera, donde pierde su envoltura para liberar el ARN en el citoplasma, donde es traducido para poder llevar a cabo la replicación de proteínas. La replicación se da en la denominadas fabricas virales donde es sintetizado un ARN de doble cadena a partir del ARN de cadena sencilla. Este ARN de doble cadena es transcrito y replicado para producir ARNm y nuevos genoma de ARN de cadena sencilla. Por su parte, la traducción de ARN subgenomico da lugar a otras proteínas virales. Finalizando con el ensamblaje de nuevas partículas virales. Las proteínas de movimiento son las encargadas de mediar la transferencia de un virión de una célula a otra.

El proceso es similar en el género Ampelovirus.

Fig leaf mottle-associated virus (FLMaV-2)

El virus FLMaV-2 pertenece al grupo IV, es decir, virus de ARN de cadena sencilla lineal de sentido positivo. Pertenece a la familia *Closteroviridae* y al género *Ampelovirus*. Los viriones de FLMaV-2 son partículas sin envoltura (Figura 9), filamentosas y flexibles de aproximadamente 1400 a 2200nm de largo por 10 a 13nm de diámetro. Su genoma es de 16.9 a 17.9 kb.

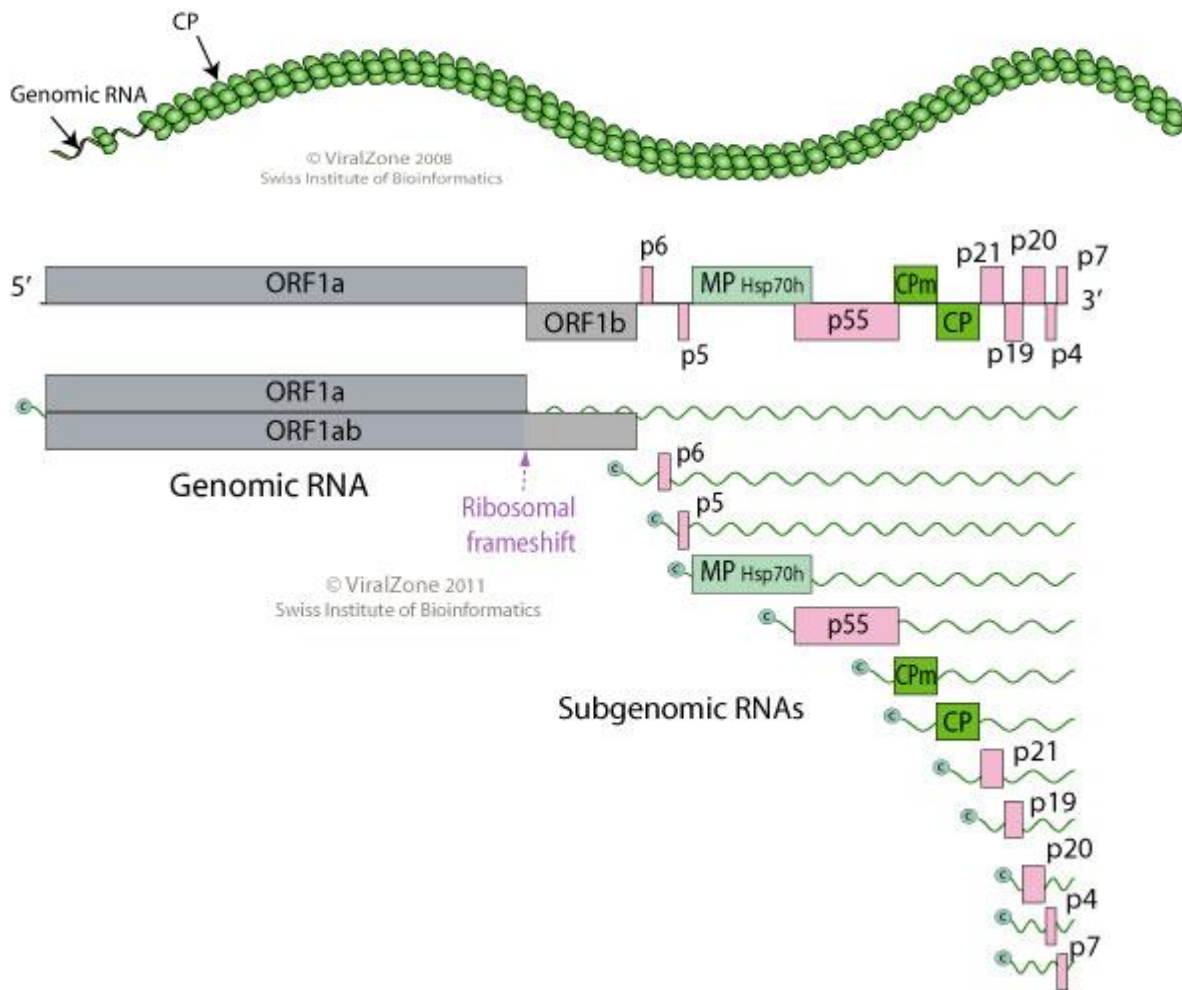


Figura 9. Representación del virión y del genoma de FLMaV-2 (tomado del ViralZone Instituto Suizo de Bioinformática)

JUSTIFICACIÓN

La agricultura tiene gran importancia en el ámbito comercial, al ser una alternativa en el sector agricultor mexicano en un ambiente de crisis generalizadas. Por esto, los países de América Latina y el Caribe se encuentran involucrados en diferentes grados a un proceso de modernización en materia agrícola, que favorece su comercialización internacional. El Área de Libre Comercio de las Américas (ALCA) ha integrado a todos los países que conforman América del Sur, para que pueda darse un comercio sin barreras, dentro del territorio que conforman. En este proceso lo primordial y para asegurar una agricultura sana, es el uso de medidas sanitarias, fitosanitarias y de salud alimentaria, así como el uso por todos los países de una serie de procesos y técnicas relacionadas, como un análisis de riesgo de introducción de plagas y enfermedades de un país infectado a uno que no lo está. De igual forma para generar y dar a conocer distintas metodologías de diagnóstico de plagas, patógenos, malezas y enfermedades (Sosa-Moss et al., 1997).

La detección e identificación temprana de virus fitopatógenos es un aspecto fundamental en la comercialización y distribución de plantas de ornato y comestibles, donde el higo tiene un valor importante en ambos rubros, por lo que es necesario contar con elementos que permitan certificar que el producto esté libre de virus, que puede ser peligroso para la economía agrícola de los países receptores de estas plantas, por lo que se ve imposibilitada la exportación y por consiguiente la prospección de abrirse a nuevos mercados.

HIPÓTESIS

Si los síntomas observados en *Ficus carica* tales como: clorosis, moteado, manchas anulares, reducción del tamaño de las hojas y su deformación, están relacionados a la presencia de virus, entonces se espera encontrar los virus FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2, a través de diferentes técnicas moleculares.

OBJETIVOS

Objetivo General

- La identificación y detección de los virus FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2 que están asociados a los daños de clorosis, moteado, manchas anulares, reducción del tamaño de las hojas y su deformación de la planta ornamental *F. carica* de ejemplares obtenidos de jardines y/o parques públicos del Distrito Federal y Estado de México.

Objetivos Particulares

- Detección de los patrones correspondientes de FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2, en electroforesis de ARN de doble cadena (RNAds).
- Detección de la presencia de agentes virales a través de un análisis de RT-PCR.
- Caracterización de los agentes virales denominados cuerpos de doble membrana (DMB) por microscopía electrónica.
- Identificación molecular de los principales virus a partir de productos de secuenciación y análisis comparativo de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolecta de Muestras

Se recolectaron hojas y frutos de 23 ejemplares de la planta *Ficus carica*, que presentaban los daños antes descritos, localizadas en las áreas verdes de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y en jardines públicos a lo largo del Distrito Federal (Figura 10), sin embargo, en todos los recorridos no se encontraron ejemplares de *Ficus carica* sano.

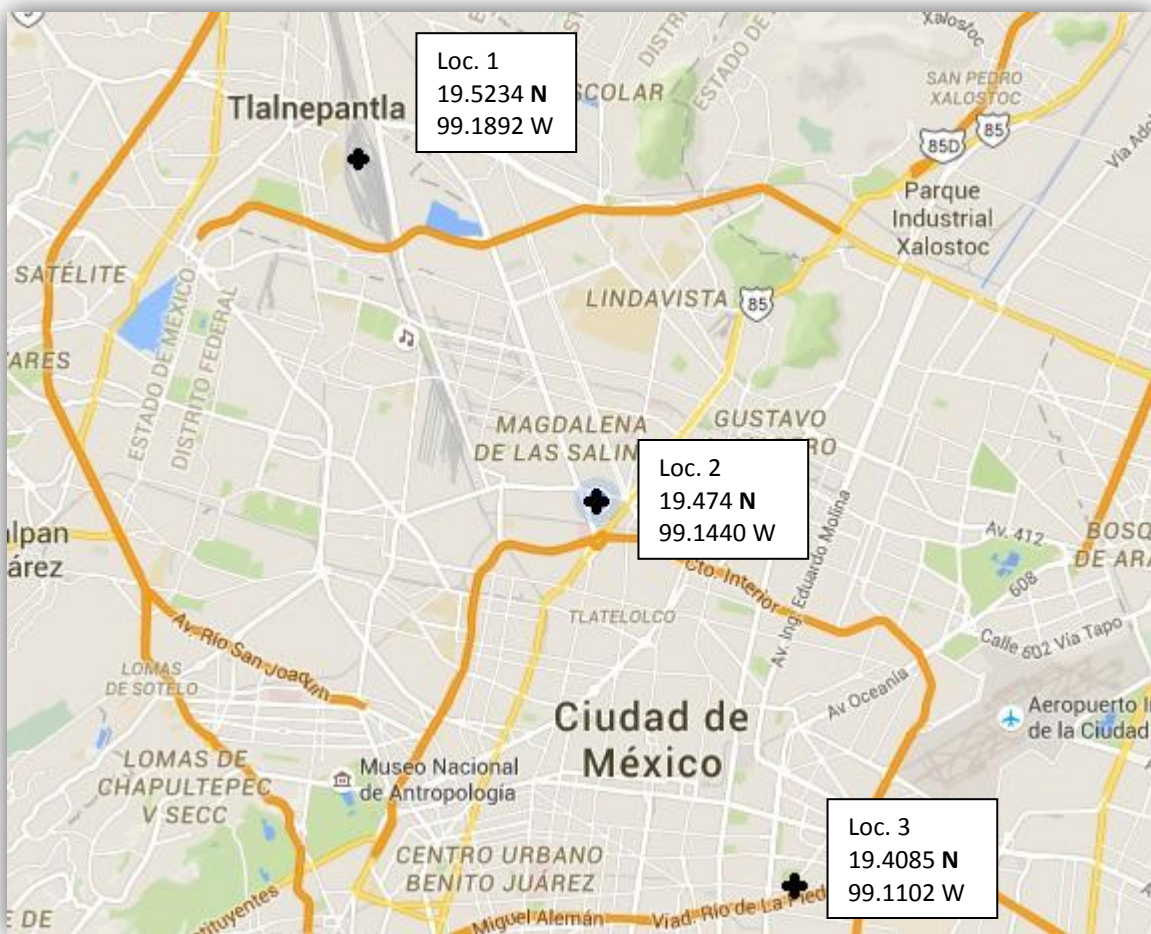


Figura 10. Mapa que muestra las zonas de colecta a lo largo de Distrito Federal y el Edo. de México. La cruz marca el lugar donde fueron recolectadas las muestras (Tomado y modificado de GoogleMaps).

El material vegetal recolectado se almacenó a -70°C para su posterior análisis. Siendo de la localidad 1, 6 ejemplares; de la localidad 2, 4 ejemplares; y de la localidad 3, 13 ejemplares.

Además se identificó y se designaron ejemplares de herbario con los números de acceso 154032, 153960 y 153495 en el Herbario de la Facultad de Ciencias (F.C. M. E.), UNAM, quedando a disposición para su posterior consulta.

Análisis Electroforético en gel de Poliacrilamida no Desnaturalizante al 6% (PAGE) De ARN De Origen Viral

Para la detección de agentes virales, se extrajo el ARN de doble cadena (dsRNA) de origen viral de todas las muestras recolectadas mediante columnas de celulosa CF-11, utilizando 3.5 y 7 g de tejido vegetal con daños de manchas anulares, mosaicos y deformación foliar, el cual se almacenó hasta su uso.

Al ARN de doble cadena se le agregó DNAsa para descartar la posibilidad de observar bandas de ADN y se analizó por electroforesis de PAGE al 6 %, no desnaturalizante, utilizando $30\mu\text{L}$ por carril, corriendo a 100 volts por 2:30 h y teñido con bromuro de etidio (Valverde, 1990).

Transcripción Reversa 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 *Fig Mosaic Virus* (FMV), se realizó la RT-PCR para el virus del FMV; para los virus

FLMaV-1 y 2 no se obtuvo un patrón electroforético por lo que se realizó el RT-PCR para su identificación.

Los oligonucleótidos para FMV, FLMV1 y FLMV2; así como las condiciones (Elbeaino et al., 2007b; Elci et al., 2012; Castellano et al.; 2007-, Alhudaib et al., 2012), se validaron anteriormente en el laboratorio con resultados positivos en otras muestras.

Las reacciones se realizaron con el método de 3 pasos.

La primer mezcla se hizo por separado para cada virus, en una reacción de 2.2µL, donde se agregaron 0.2µL de mezcla de cebadores (10µM) y 2µL de muestra (ARN extraído de las hojas con síntomas). La reacción se hizo en termociclador a 92°C por 2 minutos.

La segunda mezcla se hizo de igual forma por separado para cada virus, en una reacción de 5µL, donde se agrego la mezcla del paso anterior, 1.2µL de agua libre de nucleasas, 0.4µL de mix dNTPs (10mM), 1µL de buffer 5X y 0.2µL de RT-Thermoscript (Invitrogen, USA).

La reacción se hizo en el termociclador a 50°C por 30 minutos, de acuerdo a las especificaciones del kit, esto para obtener ADN complementario a partir de ARN.

La tercer mezcla se hizo por separado para cada virus, en una reacción de 5µL, donde se agrego 0.5µL de la mezcla anterior, 3.15µL de agua libre de nucleasas, 0.25µL de MgCl₂ (50mM), 0.1µL de dNTPs, 0.4µL de mezcla de cebadores (10mM), 0.5µL de buffer 10X y 0.1µL de Taq polimerasa (Invitrogen, USA).

RT-PCR para FMV

Los ensayos de RT-PCR se realizaron usando como templado la muestra de ARN de doble cadena de origen viral de las muestras de higo y los oligonucleótidos que amplifican parte

del gen de ARN dependiente de la polimerasa de FMV (FMV RdRp: Forward: 5'- CGG TAG CAA ATG GAA TGA AA -3', Reverse: 5'- AAC ACT GTT TTT GCG ATT G -3'), que rinden un amplicon con un tamaño de 300 pb. Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización de 94 °C, temperatura de alineamiento de 56 °C, y de elongación de 72 °C; por 33 ciclos.

RT-PCR para FLMaV-1

Se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican parte del gen de la proteína de choque térmico 70 de FLMaV-1 (FLMaV1 hsp70: Forward: 5'- CGT GGC TGA TGC AAA GTT TA -3', Reverse: 5'- GTT AAC GCA TGC TTC CAT GA -3'), que rinden un amplicon con un tamaño de 420 pb. Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización de 94 °C, temperatura de alineamiento de 58 °C, y de elongación de 72 °C; por 33 ciclos.

RT-PCR para FLMaV-2

Se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican parte del gen de la proteína de choque térmico 70 de FLMaV-2 (FLMaV2 hsp70: Forward: 5'- GAA CAG TGC CTA TCA GTT TGA TTT G -3', Reverse: 5'- TCC ACC TCC TGC GAA GCT AGA GAA -3'), que rinden un amplicon con un tamaño de 352 pb. Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización de 94 °C, temperatura de alineamiento de 57 °C, y de elongación de 72 °C; por 33 ciclos.

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.

Microscopia Electrónica

Se realizaron cortes en diferentes zonas de la hoja que presentaba síntomas (Elbeaino et al., 2007b) y se prepararon las muestra de acuerdo al protocolo ya establecido en el laboratorio de Morfofisiología y Función de la UIICSE (UNAM), y las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico.

Secuenciación de los Productos de RT-PCR de FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2

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 de 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, en el laboratorio de Análisis y Química de ADN de la UBIPRO (UNAM).

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 el gen de la proteína de ARN dependiente de polimerasa de FMV obtenidas del GenBank.

RESULTADOS

Análisis Electroforético en gel de Poliacrilamida no Desnaturalizante al 6% (PAGE) de ARN de Origen Viral (dsRNA)

El análisis electroforético en PAGE del ARN de origen viral obtenido por columnas de celulosa mostró la presencia de varias bandas de ARN algunas visibles y otras tenues (Figura 11) para un total de 13 muestras, a algunas de las muestras se les agrego DNAsa para evitar confusión en los resultados.

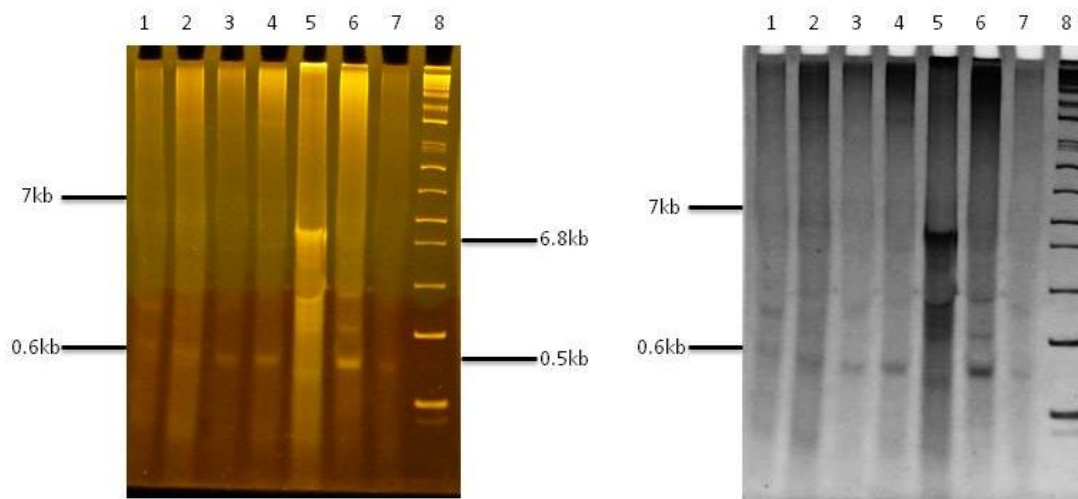


Figura 11. Patrón electroforético en PAGE de ARN de origen viral de plantas de higo con síntomas de mosaico, manchas anulares y deformación foliar. Carriles 1, 2s/p, 3, 4s/p y 7 se observan varias bandas, correspondientes a los componentes genómicos de FMV. Carril 6 corresponde a dsRNA de CMV, carril 5 a Iresine. Carril 8 marcador de peso. s/p: sin ADNasa.

Transcripción Reversa Ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Con los oligonucleótidos específicos para la ARNpolimerasa de FMV se detectaron 21 muestras infectadas por este virus (Figura 12). Ninguna planta se encontró infectada con los oligonucleótidos específicos para la HSP70 de los virus FLMaV-1 y FLMaV-2 (Figura 13 A y B), ya que se obtuvieron amplicones inespecíficos.

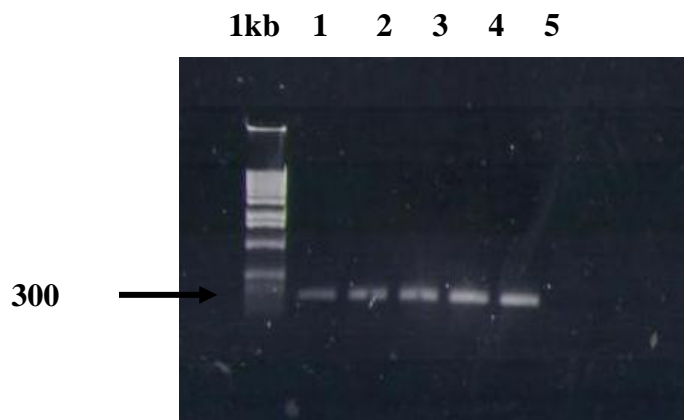


Figura 12. Análisis electroforético en agarosa 1%, se observaron las bandas correspondientes a FMV (300 pb) en todas las muestras

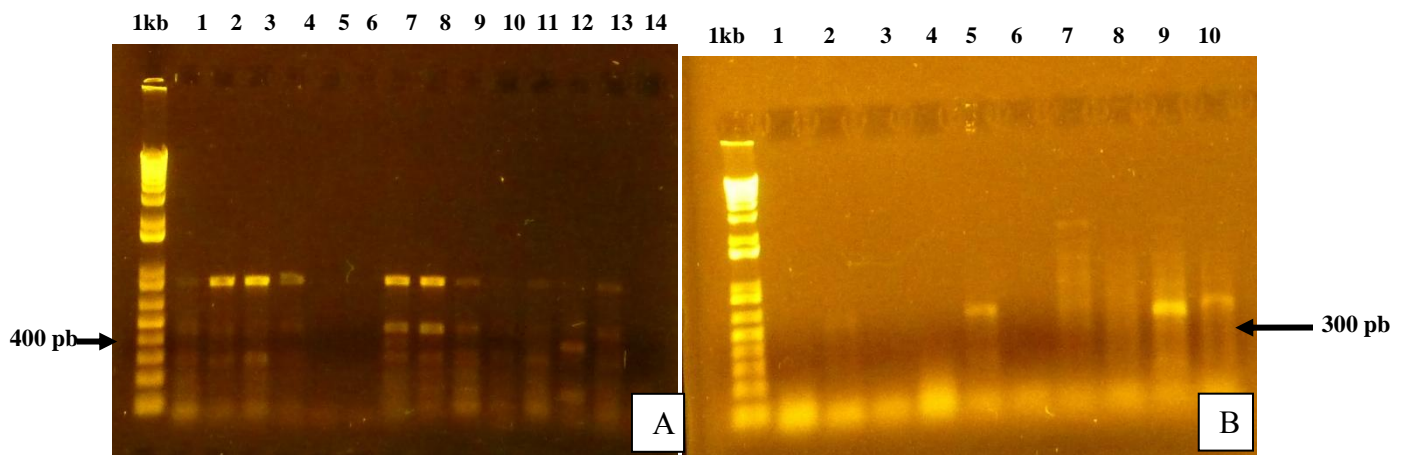


Figura 13. Análisis electroforético en agarosa 1%, se observaron un patrón de bandas inespecíficas en todas las muestras A) FLMaV-1, primer carril marcador de peso 1kb, carril 1-14 muestras; B) FLMaV-2 , primer carril marcador de peso 1kb, carril 1-10 muestras.

Microscopia Electrónica

Las fotografías obtenidas de secciones celulares revelaron la presencia de gran cantidad de cuerpos de doble membrana (DMB) (Figura 14) que son característicos de la presencia de FMV, estos cuerpos son de aproximadamente 80 nm.

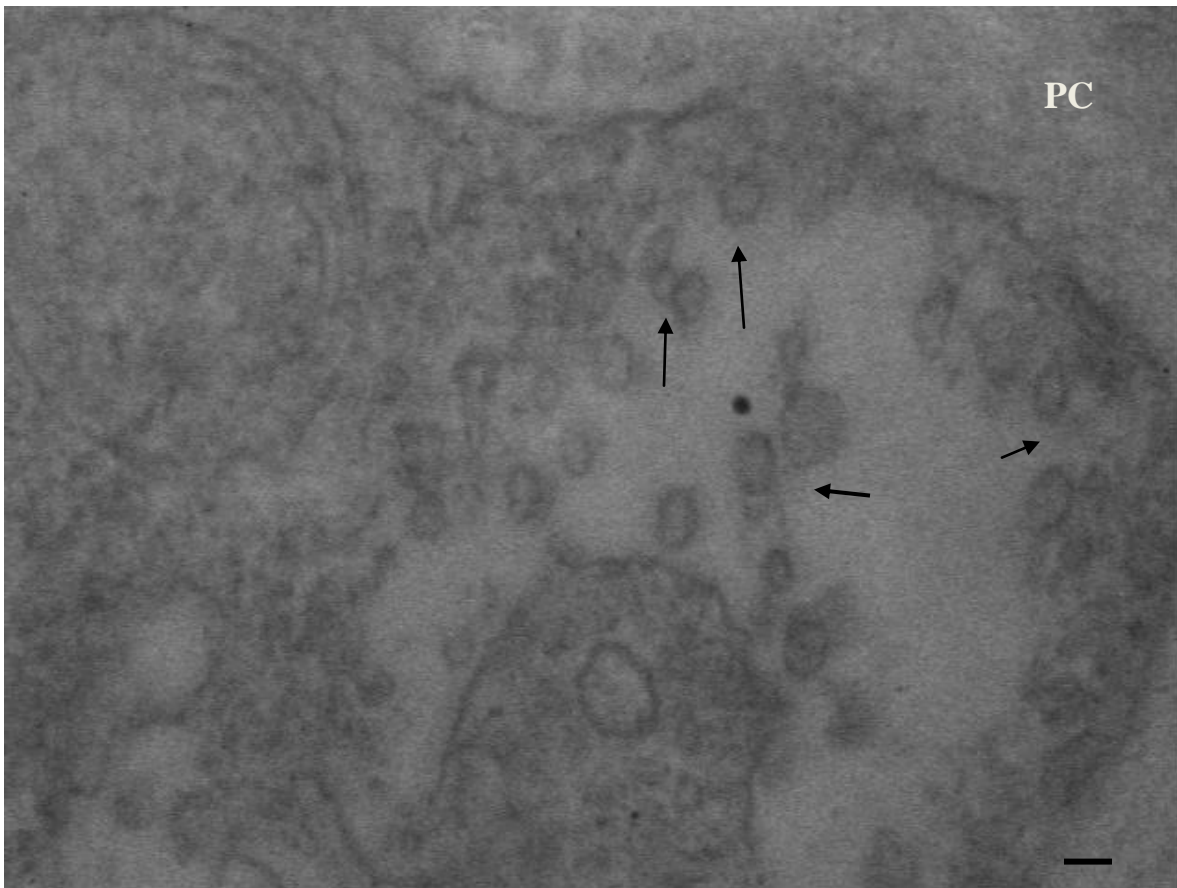


FIGURA 14. Grupos de cuerpos de doble membrana presentes en el citoplasma de la célula de higo infectado (380 K). Las flechas señalan los cuerpos de doble membrana, PC pared celular. Barra=200nm.

Secuenciación de los Productos de RT-PCR de FMV, FLMaV-1 y FLMaV-2

Se realizó la secuenciación de los productos de la RT-PCR de aislados de 5 muestras para FMV (Figura 15), que dieron resultados positivos por alineamiento de secuencias con lo reportado en el GenBank. Sin embargo, para FLMaV-1 y FLMaV-2, no se obtuvieron resultados positivos en el alineamiento de secuencias.

```

FMV-M6      34  ACTATTGAGAAGTTATTAGATGCCCCAAAGTTGTTATATCCAGATTGCTCAGATGGATAC  93
              |||
AB697841.1  48  ACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTTATATCAAGATTGTTTCCAGATAGATAC  107
              |||
              94  ATTGAAATCCACTCTCACTTAGAGAAAATTAAT-TGCATACTAAATCTTTAATAAGACT  152
              |||
              : 108  ATTGAATTCCAATCTCATTAGAAAAAATTATATGAATACTAATTCTTATAATAAGACA  167
              |||
              153  TATCTGATTGATTGTGATTGTCATAAATACGCGAGaaaaaaaaTGAATCCTTATAGAAT  212
              |||
              : 168  TATCTAAATGATTGTAATCTATCAAAATATTAGATAAAAAAATGAATCATTATATAAC  227
              |||
              213  TTTGTCAACACATATAAACCATCTATTTACATA  245
              |||
              : 228  ATTGTCAACACATATAAACCATCTATTTACATA  260

FMV-M5      13  AGTTTCGATATCCAACCCCTGAAGATACTGTTGAGAAGCTATTAGATGCTCAAAAGGTGTT  72
              |||
AB697832.1  24  AGTTT-GATATCCAACCCCTGAAGATACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTT  82
              |||
              73  ATATCAAGATTGTTTCCAGATAGATACATTGAATTCCAATCTCATTAGAAAAAATTATAT  132
              |||
              83  ATATCAAGATTGTTTCCAGATAGATACATTGAATTCCAATCTCATTAGAAAAAATTATAT  142
              |||
              133  GAATACTAATTCTTATAAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATATTAGA  192
              |||
              143  GAATACTAATTCTTATAAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATATTAGA  202
              |||
              193  TaaaaaaaaTGAATCTTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATTTACATA  250
              |||
              203  TAAAAAAATGAATCTTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATTTACATA  260
    
```

```

FMV-M4      6  AATAT -AGTTTGATATCC -ACCCTGAAGAGACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAG 63
AB697832.1 18  AATATAAGTTTGATATCCAACCCTGAAGATACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAG 77
           64  GTGTTATATCAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCTCATTTAGAAAAAAT 123
           78  GTGTTATATCAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCTCATTTAGAAAAAAT 137
           124 TATATGAATACTAATTCTTATAAATAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATA 183
           138 TATATGAATACTAATTCTTATAAATAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATA 197
           184 TTAGATAAAAAATGAATCCTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATTTAC 243
           198 TTAGATAAAAAAATGAATCCTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATTTAC 257
           244 ATA 246
           258 ATA 260

FMV-M3      17  TTGACATCC -ACCCTGTTGA -ACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTTATAT 74
AB697832.1 27  TTGATATCCAACCCTGAAGATACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTTATAT 86
           75  CAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCTCATTTAGAAAAAATTAATGAAT 134
           87  CAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCTCATTTAGAAAAAATTAATGAAT 146
           135 ACTATCTCTTATAAATAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATATTAGATaaa 194
           147 ACTAATCTTATAAATAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATATTAGATAAA 206
           195 aaaaaTGAATCTTTATATAATATTGCCGACACATATAAACCATCTATTTACATA 248
           207 AAAAATGAATCTTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATTTACATA 260

FMV-M2      14  TTGATATCCAACCCTGTTG - TACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTTATAT 72
AB697832.1 27  TTGATATCCAACCCTGAAGATACTATTGAGAAGTTATTAGATGCTCAAAAGGTGTTATAT 86
           73  CAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCCCATTTAGAAAAAATTAATGAAT 132
           87  CAAGATTGTTTCAGATAGATACATTGAATCCAATCTCATTTAGAAAAAATTAATGAAT 146
           133 ACTAATCTTATAACAAGACATACCTAACAGATTGGG - TTTATCAAAAATATTAGAGaaa 191
           147 ACTAATCTTATAAATAAGACATATCTAAATGATTGTAATTTATCAAAAATATTAGATAAA 206
           192 aaaaaGAATCTTTATATAACATTGTCGACACATATGAACATTTATT 239
           207 AAAAATGAATCTTTATATAACATTGTCGACACATATAAACCATCTATT 254

```

Figura 15. Secuencias del producto de RT-PCR de FMV alineadas con lo reportado en el Gen Bank, correspondientes a las diferentes muestras (Reportadas en Ishikawa et al., 2012).

Análisis de las Secuencias

Se realizó un análisis filogenético con las secuencias obtenidas para FMV (2-5) y las secuencias de FMV obtenidas del GenBank (Figura 16).

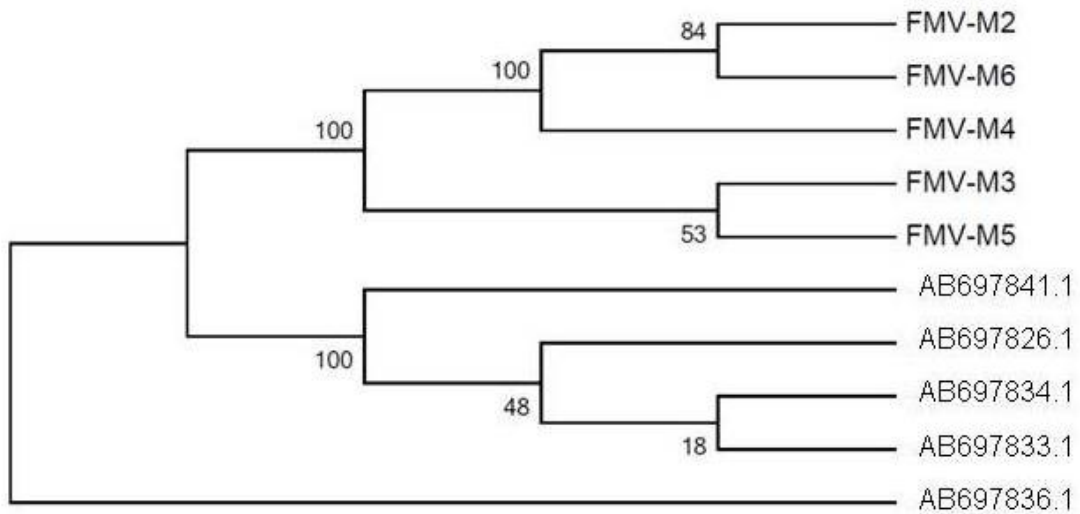


Figura 16. Árbol filogenético del FMV, los valores más cercanos a 100 son estadísticamente probables de que existan, se observan 2 grupos

DISCUSIÓN

En esta investigación se obtuvo un perfil de ARN, se trata de un patrón de bandas que van desde los 0.6kb a los 7kb, que es consistente con lo reportado en la literatura (Elci et al., 2012; Caglayan et al., 2012 y Elbeaino et al., 2009) (Figura 17), estas bandas corresponden a los componentes o segmentos del genoma del virus FMV (*Emaravirus*).

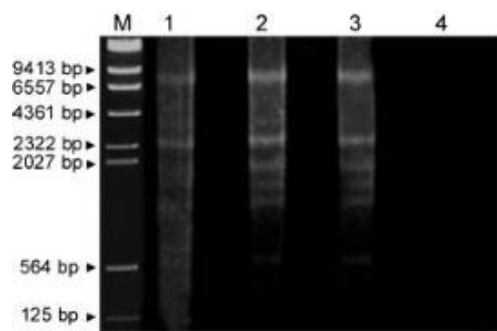


Figura 17. Patrón electroforético reportado para FMV, según Elbeaino y colaboradores en 2009. La línea 1, 2 y 3 corresponden a muestras de *Ficus carica* con síntomas.

Se determinó la presencia de FMV por medio de RT-PCR en 21 de 23 muestras, que representa el 91% de las muestras recolectadas obteniendo un producto esperado de 300pb como lo muestra la Figura 12 con los oligonucleótidos específicos para FMV, que corresponde a una región del gen de la ARNpolimerasa (Elbeshehy et al., 2011; Elci et al., 2012; Elbeaino et al., 2009a); para los virus FLMaV-1 y FLMaV-2 se obtuvieron amplicones inespecíficos como lo muestra la Figura 13 A y B, dentro de los cuales se lograron observar bandas de entre 300pb y 400pb, los cuales podrían corresponder a lo reportado para estos virus (Elci et al., 2012; Elbeaino et al., 2007b; Castellano et al., 2007) o bien que no se encuentren estos presentes, sin embargo se realizó la limpieza del

fragmento amplificado para cada virus (Figura 18) y la secuenciación para confirmar la identidad.

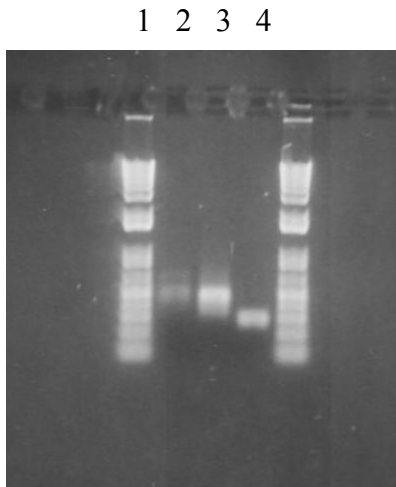


Figura 18. Productos de RT/PCR limpiados por WIZAR. Carril 1 corresponde al marcador de peso, carril 2 FLMaV-1 de *Ficus sp.*, carril 3 FLMaV-1 de *Ficus carica*, carril 4 FMV de *Ficus carica*.

De todas las muestras obtenidas se diagnosticaron 21 con FMV por medio de RT-PCR; y para FLMaV-1 y FLMaV-2 debido a la variedad de los amplicones no se logró determinar un porcentaje por medio de RT-PCR. Sin embargo, por medio de PAGE se observaron 14 muestras para FMV lo cual señala que el gel de PAGE no alcanzó a detectar el FMV en algunas muestras en igual porcentaje que el RT-PCR debido a su baja concentración, aun así, resultó buena técnica para identificar de forma preliminar los agentes virales aunque es necesario conocer el patrón electroforético de los virus. En el caso de FMV el patrón va de 0.6kb a 7kb; para FLMaV-1 una banda alrededor de 16.5 kb.

Por microscopía electrónica se lograron observar partículas características de FMV (Elbeshehy et al., 2011) conocidas como cuerpos de doble membrana (DMBs), que se reportaron por primera vez en 1970; por lo general se encuentran dentro del citoplasma de

la células del parénquima, sin embargo, las podemos encontrar en cualquier tipo celular a excepción del floema (Mielke-Ehret y Hans-Peter. 2012) y varían en su tamaño, que va desde los 100 a 200 nm (Alhudaib et al., 2012).

Las secuencias obtenidas confirmaron directamente la identidad del FMV, que corresponden al gen de la ARNpolimerasa de FMV, esto al ser comparadas con secuencias similares disponibles en el GenBank/NCBI, indicando una homología del 94-99% como lo muestra la Figura 15, pero con ninguna variedad descrita aquí en México; sin embargo, al ser productos de 280pb aproximadamente, no se dieron de alta en el Genbank, debido a que la plataforma sólo acepta fragmentos de arriba de 330pb. Para las secuencias de FLMaV-1 y 2, no arrojaron resultados positivos, los amplificados obtenidos correspondieron a otros casos diferentes a virus.

El análisis filogenético mostró, que la secuencias correspondientes a FMV (2-5) se encuentra agrupadas; al parecer no están tan emparentadas con la mayor parte de las secuencias de FMV obtenidas del GenBank, sin embargo al parecer todas las secuencias se agruparon con una variedad de FMV como lo muestra la Figura 16, 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.

El FMV así como los daños del mosaico del higo han sido observado en diferentes zonas geográficas como España, Inglaterra, Albania, Grecia, Turquía, Yemen, Egipto, Túnez, Algeria, Marruecos, Italia, California (Hafez et al., 2012) y ahora en México, en este trabajo ha sido detectado e identificado a través de diferentes técnicas moleculares ,por primera vez en

Ficus carica, a pesar de que ya existen reportes acerca de la enfermedad del mosaico, el virus FMV nunca fue reportado como tal.

El virus es transmitido mecánicamente de planta a planta por medio de vectores, especialmente se le ha relacionado con el ácaro eriofío *Aceris ficus* (Elbeshehy et al., 2011; Caglayan et al., 2012), la higuera al ser utilizada para decoración de jardines y en cultivos tiene alta incidencia de FMV debido a su forma de propagación, podría haber sido contagiada a través de transmisión mecánica por estos insectos, o por injerto o esqueje proveniente de una planta infectada (Elbeshehy et al., 2011).

En este trabajo no fue detectado FLMaV-1, así como FLMaV-2, por las diferentes técnicas moleculares. Estos virus han sido reportados con diferentes grados de incidencia. Elbeshehy y Elbeaino en 2011, reportaron que en algunas provincias de Egipto su prevalencia era alta por ensayos de RT-PCR, sin embargo siempre para FMV fue mayor, dado que la mayoría de las veces *Ficus carica* se encuentra infectado por más de un virus, lo cual es importante recalcar debido a que por lo general a los daños del mosaico del higo se encuentran asociados otros virus, lo cual genera una interacción virus-virus que puede ser crucial para el entendimiento de la patogenésis viral y su evolución, por consiguiente el desarrollo de estrategias eficientes de control.

Por otra parte Elbeaino y colaboradores en 2007 para FLMaV-1 no lograron su detección vía RT-PCR, pero los ensayos de microscopía electrónica y PAGE corroboraron la presencia del mismo, refiriéndolo a bajas concentraciones.

De igual forma Alhudaib en 2012 y Elci junto con sus colaboradores en el mismo año, encuentran que FLMaV-1 tiene baja incidencia, pero FLMaV-2 no es detectado, y corresponde a los reportes previos, de que FLMaV- 2 se encuentra limitado a ciertas regiones.

Por otra parte FMV generalmente se he encontrado relacionado en todos los casos reportados con un alto índice de incidencia, así como en este trabajo, por lo cual es considerado el principal agente de los daños del mosaico del higo.

CONCLUSIONES

Se logró la detección por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida de dsRNA de origen viral la presencia de FMV, y caracterizar por medio de microscopía electrónica la presencia de cuerpos de doble membrana específicos para FMV, así como detectarlo a través de RT-PCR y finalmente confirmar por secuenciación directa, la identidad del virus FMV.

Se confirmó la identidad del virus FMV por lo que podría ser el agente causante principal de los daños de mosaicos, clorosis, manchas anulares y reducción del tamaño de las hojas en *Ficus carica* presente en parques y jardines públicos a lo largo del Distrito Federal y Estado de México.

Perspectivas

Se recomienda realizar las pruebas de patogenicidad por inoculación de mecánica, para confirmar que el virus FMV es el único agente causante de los daños descritos anteriormente. Además de probar otros oligonucleótidos específicos para los virus ya reportados y verificar si no se trata de un complejo de virus.

LITERATURA CITADA

Alhudaib, K. 2012. Incidence of Fig Leaf Mottle-associated virus and fig mosaic Virus in Eastern Province of Saudi Arabia. *International Journal of Virology*. 8(1): 128-132 pp.

Bovey, R. 1977. *La defensa de las plantas cultivadas*. Barcelona. Omega. 883pp.

Caglayan, K., Medina, V., Gazel, M., Serce, C., Serrano, L., Achon, A., Soylu, S., Caliskan. O. y M., Gumus. 2009. Putative Agents of Fig Mosaic Disease in Turkey. *Turk J. Agric For*. 33: 469-476 pp.

Carter, J. B. Y Saunders, V. A. 2007. *Virology: Principles And Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. England. Pp. 2-10

Castellano, M., Gattoni, G., Minafra, A., Conti, M. y G., Martelli. 2007. Fig Mosaic in Mexico an South Africa. *Journal of Plant Pathology*. 89: 441-444 pp.

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.

CONABIO: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/50-morac5m.pdf

De la Torre, R. 2012. Enfermedades de Origen Viral en plantas cultivadas en México. Plaza y Valdes Editores. México. Universidad Autonoma de México. 1-89 pp.

Elbeaino, T., Choueiri, E., Hobeika C. y M., Digiario. 2007a. Presence of Fig Leaf Mottle. Associated Virus 1 and 2 in Lebanese Fig Orchards. Journal of Plant Pathology. 89(3): 409-411pp.

Elbeaino, T., Digiario, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M., A. y G., Martelli. 2009a. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of mosaic disease. Journal of General Virology. 90: 1281-1288 Pp.

Elbeaino, T., Digiario, M., De Stradis, A. y G., Martelli. 2007b. Identification of a second member of the Family *Closteriviridae* in Mosaic-Disease Figs. Journal of Plant Pathology. 89(1): 119-124pp.

Elbeaino, T., Digiario, M., Heimoun, K., De Stradis, A. y G., Martelli. 2010. Fig Mild Mottle-Associated Virus, A Novel Closterovirus Infecting Fig. *Journal of Plant Pathology*. 92: 165-172 pp.

Elbeaino, T., Nahdi, S., Digiario, M., Alabdullah, A. y G., Martelli. 2009b. Detection of FLMav-1 and FLMaV-2 in the Mediterranean Region And Study on Sequence Variation of HSP70 gene. *Journal of Plant Pathology*. 91(2): 425-431 pp.

Elbeshehy, E. y T., Elbeaino. 2011. Viruses infecting figs in Egypt. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 327-332pp.

Elci, E., Ulubas, C., Gazel, M. y K., Caglayan. 2012. Molecular detection and comparative sequence analysis of viruses infecting fig trees in Turkey. *Journal of Phytopathology*. Pp. 1-6.

FAO: <http://www.fao.org/search/es/>

Flock, A. y Wallace, J. 1957. Fig Mosaic Transmitted by Mite. *California Agriculture*. Pp.1-2.

Flores, D. y V., Jiménez. 2007. Desarrollo del cultivo de Higo (*Ficus carica*) para consumo fresco y procesado, como una alternativa de diversificación para el sector

agrícola. Instituto Tecnológico de Costa Rica Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Centro de Investigación en Biotecnología. Costa Rica. P.p 1-93

Gattoni, G., Minafra, A., Castellano, M., De Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M. y G., Martelli. 2010. Worldwide diffusion of Fig latent virus 1 in fig accessions and its detection by serological and molecular tools. 21st International Conference on Virus and other Graft TRansmissible Disease of Fruit Crops. 427: 83-86 pp.

Gattoni, G., Minafra. A., Castellano, M., De Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M. y G., Martelli. 2009. Some Properties of Fig Latent Virus 1, a New Member of The Family *Flexiviridae*. Journal of Plant Pathology 91(3): 555-564 pp.

Hafez, E., Abdelkhalek. A. y A., El-Morsi (2012). Molecular Characterization Of A Potyvirus Associated With A Fig Mosaic Disease In Egypt. The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity. 259-274 pp.

Horst, R.K. 1992. Production of Ornamental Plants free of Virus and Prevention of Reinfection. Revista Mexicana de Fitopatología 10 (1), pp. 1-10

Hull, R. 2014. Plant Virology. Elsevier Academic Press. Reino Unido. 1120 pp.

Inegi, 1998. La Horticultura Ornamental En México. Inegi. México. Pp. 1-81.

Ishikawa, K., Maejima, K., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Hashimoto, M., Takata, D., Yamaji Y. y S., Namba. 2012. Identification and characterization of two novel genomic RNA segments of fig mosaic virus, RNA 5 y RNA6. *Journal of General Virology*. 93: 1612-1619 pp.

Llacer, G; López, M.; Trapero, A. y A., Bello. 2000. *Patología Vegetal*. Tomo I; Sociedad Española de Fitopatología. España.

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, 29 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.

Mielke-Ehret, N. y M., Hans-Peter. 2012. *Emaravirus: A novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses*. *Viruses*. 4: 1515-1536 pp.

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.

SEMARNAT. 2014. *Ficus carica* L. Sistema Nacional de Información Forestal.
<http://www.semarnat.gob.mx/>

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.

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.

Tzanetakiz, I., Laney, A., Keller, K. y R., Martin. 2010. New Viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruits Crops. 79-82 pp.

Valverde, R. 1990. Analysis Of Double-Stranded Rna For Plant Virus Diagnosis. *Plant Disease* 74:255-258.

ViralZONE: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/771.html

Walia, J., Salem, N. y B., Falk. 2009. Partial Sequence and Survey Analysis Identify a Multipartite, Negative-Sense RNA Virus Associated with Fig Mosaic. *Plan Disease*. 93

(1): 4-10 pp.

Yu, C., Karlin, D., Lu, Y., Wright, K., Chen, J. y S., MacFarlane. 2013. Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 as a movement protein of the 30K superfamily. *Journal of General Virology*. 94:2117-2128pp.