

Identificación de virus en camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) empleando la técnica de PCR

Grace Yorlenis Castillo Arauz

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Identificación de virus en camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) empleando la técnica de PCR

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Grace Yorlenis Castillo Arauz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Identificación de virus en camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) empleando la técnica de PCR

Grace Yorlenis Castillo Arauz

Resumen. Las infecciones virales en la actualidad son considerados un factor limitante en la producción de hortalizas a nivel centroamericano. Existe poco conocimiento de la etiología de los virus fitopatógenos ya que estos solo son detectados en campo por el cambio de apariencia de la planta. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: identificar los virus TMV y ToMV que afectan el cultivo de tomate y SPCSV, SPFMV y SPVC en el cultivo de camote, mediante la técnica de PCR; e implementar un protocolo de identificación para ser empleado en el diagnóstico de infecciones virales. Entre los meses de julio a septiembre de 2019 se recolectaron 20 muestras; 10 de tomate y 10 de camote. Se emplearon diversos protocolos para la identificación entre los cuales están: extracción de ARN, cuantificación y calidad de ARN, PCR y electroforesis en gel. Se logró identificar la presencia de TMV y ToMV en el cultivo de tomate empleando iniciadores específicos TMVF/TMVF logrando amplificar bandas de 550 pb y ToMVF/ToMVR amplificando bandas de 145 pb, respectivamente. En el cultivo de camote se identificó la presencia SPCSV, SPFMV mediante el empleo de iniciadores específicos SPCSV-CL43L/SPCSV-CL43U, observándose una banda de 500 pb y PVD-2/108204 amplificando un fragmento específico de 1,800 pb. Se identificó en siete muestras de tomate la presencia de TMV y en tres muestras la presencia ToMV; en camote se identificaron ocho muestras positivas para SPFMV y en dos muestras la presencia de SPCSV empleando el protocolo establecido.

Palabras clave: ARN viral, iniciadores, infección viral.

Abstract. Viral infections are current considered a limiting factor in vegetable production in the Central American region. Etiology of the viruses is unknown and they are generally detected in the field by plant change appearance. Therefore, the objectives of this study were to identify TMV and ToMV viruses affecting tomato and SPCSV, SPFMV and SPVC in sweetpotato, using the PCR technique; and implementing an identification protocol for the diagnosis of viral infections. Between July and September 2019, 20 samples were collected; 10 from tomato and 10 from sweetpotato. Several protocols were used for identification, including RNA extraction, RNA quantification and quality, PCR and electrophoresis gel. The presence of TMV and ToMV in tomato was identified using specific TMVF/TMVF primers, amplifying a PCR product of 550 bp and ToMVF/ToMVR amplifying 145 bp product, respectively. In sweetpotato, the presence of SPCSV, SPFMV was identified using specific primers SPCSV-CL43L/SPCSV-CL43U, amplifying a band of 500 bp and PVD-2/108204 amplifying a specific fragment of 1,800 bp. TMV was identified in seven tomato samples and ToMV in three samples. Eight sweetpotato samples were positives to SPFMV and two positives to SPCSV using the established protocol.

Key words: Primers, viral infection, viral RNA.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4. CONCLUSIONES	26
5. RECOMENDACIONES	27
6. LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Iniciadores específicos empleados para la identificación de virus en los cultivos de camote y tomate.....	3
2. Reactivos empleados para la extracción y purificación de ADN y ARN y su función específica dentro del protocolo.....	7
3. Contenido de reactivos y cantidad a utilizar para un volumen final de 25 μ L, en cada muestra procesada por PCR.....	8
4. Secuencia de los iniciadores empleados, temperatura de hibridación y temperatura promedio de hibridación de cada pareja de marcador.....	9
5. Contenido, función y concentración de los reactivos que contiene el APEX utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa.....	10
6. Temperaturas específicas de hibridación para cada cebador utilizado en la PCR..	10
Figuras	Página
1. Hojas de camote y tomate con síntomas de virus. (A) y (B) Amarillamiento; (C) aclaramiento de nervadura; (D) y (E) mosaico clorótico; (F), (G) y (H) mosaico, (G) enrollamiento y mal formaciones.	5
2. Hojas de tomate con sintomatología de virus. (A) Hojas cloróticas, mosaico de verde oscuro a verde claro; (B) hojas cloróticas y malformaciones; (C) mosaico amarillo, mal formaciones de hojas y clorosis.....	11
3. Hojas de camote con síntomas de virus. (A) Amarillamiento en hojas jóvenes; (B) mosaico clorótico, aclaramiento de nervadura; (C) mosaico clorótico; (D) mosaico amarillo en hojas nuevas; (E) manchas amarillas y decoloración de hojas.....	12
4. Resultados de cuantificación y pureza realizados por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop ND-1000 utilizando el kit comercial.....	14
5. Muestras de tomate donde se comprobó la presencia de TMV. Sintomatología característica: (A) y C) Mosaico de verde oscuro a verde claro; (B) y (D)	

amarillamiento; (E) deformaciones en la parte apical de la panta; (F) y (G) mosaico.....	18
6. Amplificación de un fragmento de 550 pb del genoma TMV usando cebadores TMVF / TMVR y marcadores moleculares adicionales de 1kb, observado mediante electroforesis en gel agarosa al 1% en tampón TAE.....	19
7. Muestras de tomate donde se comprobó la presencia de ToMV. Sintomatología característica: (A) mosaico de verde oscuro; (B) clorosis; (C) deformaciones en hojas jóvenes de la panta.	20
8. Amplificación de una banda de 145 pb utilizando los iniciadores ToMV F/ToMV R específicos para el virus del mosaico del tomate. Observada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñida con bromuro de etidio.	21
9. Muestras de camote donde se comprobó la presencia de SPFMV. Sintomatología característica: (A) y (B) mosaico de verde oscuro; (C) decoloración de hojas; (D) clorosis; (E) y (F) amarillamiento.	22
10. Amplificación de bandas de 1,8000 pb lo cual confirma la presencia del virus del moteado plumoso (SPFMV). Observado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Utilizando Bromuro de etidio para teñir las bandas.....	23
11. Genoma del virus del moteado plumoso del camote (SPFMV).....	23
12. Muestras de camote donde se comprobó la presencia de SPCSV. Sintomatología característica: (A) y (B) amarillamiento en hojas, deformaciones y clorosis.....	24
13. Amplificación de bandas de 500 pb mediante el uso de iniciadores específicos CL43L/SPCSV-CL43U para la región HSP70h de SPCSV, observadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñida con bromuro de etidio.....	25
14. Representación de la organización del genoma del virus SPCSV compuesto por el ARN SPCSV1 en el carril superior y medio y el ARN2 en el carril inferior.....	25

1. INTRODUCCIÓN

En la Escuela Agrícola Panamericana el tomate manzano y el camote son considerados cultivos de gran importancia para los módulos de Olericultura Intensiva y Agricultura Orgánica, respectivamente. El tomate representó en el 2018 el 15.95% de la producción interna de la EAP (Bolaños González 2018). Estos cultivos fueron seleccionados debido a la importancia económica y la disponibilidad de primers dentro del Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular. Las infecciones virales son las principales causantes de pérdidas no registradas en la producción en estos cultivos.

Los virus son microorganismos que no pueden ser observados en el microscopio óptico debido a que poseen formas simples las cuales están compuestas por una pequeña porción de ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica (envoltura proteica o cápside). Son partículas biótropas ya que se propagan en el interior de células vivas y tienen la capacidad de producir enfermedades. Difieren ampliamente de todos los demás fitopatógenos no sólo en tamaño y forma, sino también en la sencillez de su constitución química y estructura física. Se dificulta su detección y observación mediante métodos convencionales debido a su tamaño y estructura (Hull 2014).

Al igual que otros organismos, los virus portan información genética en sus ácidos nucleicos, los cuales típicamente codifican tres o más proteínas. Todos los virus son parásitos obligados que dependen de la maquinaria celular de sus hospedantes para reproducirse. No son microorganismos activos fuera de su huésped, por lo cual en la actualidad se ha llegado a pensar que no son organismos vivos (Ortiz y Mujica 2015).

Las enfermedades virales en plantas tienen un gran impacto económico y social sobre la seguridad alimentaria. Sin embargo, las pérdidas por virus van más allá de las cifras que se le atribuyen. La falta de reconocimiento se debe especialmente a su naturaleza, ya que su presencia se determina por efectos de cambios en la apariencia normal de la planta. En algunos casos las plantas no presentan cambios, debido a que estas pueden ser portadoras de enfermedades virales, sin que se presenten síntomas. Esto aplica principalmente en cultivos perennes y de propagación vegetativa (Hull 2014).

Los virus predominantes en el cultivo de tomate pertenecen a la familia *Virgaviridae*, género *Tobamovirus* en el cuál se encuentran el virus del mosaico del tomate (ToMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV). Estos virus están constituidos por ARN monocatenario (ssRNA +). El virión del virus del mosaico del tabaco es una varilla rígida de 18 nanómetros × 300 nanómetros que consisten en aproximadamente 2,130 subunidades idénticas de proteína de capa apiladas en una hélice alrededor de una sola hebra de ARN de sentido positivo, 6,395 nucleótidos de longitud. El genoma del virus codifica alrededor de cuatro proteínas (Goelet *et al.* 1982).

Los virus que afectan mayormente en el cultivo de camote pertenecen a la familia Closteroviridae, género Crinivirus encontrándose el virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV) y la familia Potyviridae, género Potyvirus, encontrándose los virus del moteado plumoso del camote (SPFMV) y el virus C del camote (SPVC). Estas familias están constituidas por ARN monocatenario (ssRNA +), poseen la característica de replicar su genoma dentro del citoplasma gracias a la síntesis de proteínas (Urcuqui-Inchima *et al.* 2001).

Las técnicas utilizadas para la identificación de virus los identifica por grupo, siendo los procedimientos más comunes pruebas de ELISA, inmunocromatografía y PCR. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada en 1986, por el Dr. Kary Mullis. Esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos de un organismo o partícula. Para sintetizar estos amplicones de ADN se utiliza una enzima llamada Taq ADN polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, por su característica principal de sobrevivir a temperaturas elevadas entre 79 °C a 85 °C (Asuar 2007). La velocidad, la especificidad y la versatilidad de la técnica de PCR la hacen la más adecuada y utilizada en muchas áreas de Biología Molecular debido a que es la más eficaz en el diagnóstico de las enfermedades virales (Rodríguez y Barrera 2004).

El principal desafío que se presenta en la identificación de virus fitopatógenos es la manipulación de su material genético y su requerimiento de células vivas para replicarse, manipular el ARN conlleva un gran esfuerzo debido a su fragilidad. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es establecer protocolos para la identificación de virus de tomate y camote.

Los objetivos de este proyecto fueron:

- Implementar un protocolo para la identificación de enfermedades causadas por los virus TMV, ToMV, SPCSV, SPFMV y SPVC, mediante el empleo de la técnica de PCR.
- Identificar mediante la técnica de PCR la presencia de los virus TMV, ToMV SPCSV, SPFMV y SPVC, que afectan los cultivos de tomate y camote establecidos en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular, en la Escuela Agrícola Panamericana en Zamorano, Honduras.

Material experimental. Se utilizaron 10 muestras de cultivo de camote y 10 de tomate. El criterio de selección de estas muestras fue que las mismas mostraran síntomas de virus. En el laboratorio se utilizaron cinco parejas de iniciadores específicos para la identificación de virus en camote y tomate (Cuadro 1).

Cuadro 1. Iniciadores específicos empleados para la identificación de virus en los cultivos de camote y tomate.

Pareja de Iniciadores	Virus a identificar
TMV F - TMV R	Virus del Mosaico del Tabaco (TMV)
ToMV F – ToMV R	Virus del Mosaico del Tomate (ToMV)
WAR1- AF1	Virus del Enanismo Clorótico del Camote. (SPCSV)
SPCSV-CL43L-SPCSV-CL43V	Virus del Enanismo Clorótico del Camote. (SPFMV)
108204-PVD-2	Virus C del Camote y Virus del Moteado Plumoso del Camote (SPVC)

Fuente: Kashif 2012

La metodología de este estudio se dividió en dos fases.

Fase 1. Se realizó la implementación de un protocolo de identificación de enfermedades virales, el cual consta de seis etapas entre las cuales están: selección de plantas; recolección, transporte y procesamiento de muestras; extracción de genoma viral; evaluación de concentración y calidad del material genético extraído; amplificación de ácidos nucleicos virales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); análisis de los productos de PCR.

Fase 2. Fue la evaluación de los productos obtenidos de PCR, para la identificación de los virus TMV, ToMV, SPCSV, SPFMV y SPVC obtenidos de cultivos de áreas de producción de Zamorano. A continuación, se detallan cuáles fueron los procedimientos a seguir en cada una de las etapas del presente proyecto.

Fase de Implementación de protocolo de identificación.

Selección de plantas. La selección de plantas se desarrolló según el cambio de apariencia observando en las plantas. Se eligió el tomate ya que es el cultivo de mayor producción dentro del área de Olericultura intensiva de la misma forma el camote es un cultivo de gran importancia en la unidad de Agricultura Orgánica dentro del campus, Zamorano. Estos cultivos fueron seleccionados debido a la importancia económica y la disponibilidad de iniciadores dentro del Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular.

Recolección de muestras. Se llevó a cabo entre los meses de julio, agosto y septiembre. Los virus analizados expresan sintomatología muy parecida, lo que dificulta el reconocimiento del ataque en campo (Figura 1). Se seleccionaron muestras del cultivo de tomate que presentaran sintomatología acorde a los virus a evaluar; el virus del Mosaico del Tomate (ToMV) y el Mosaico del Tabaco (TMV).

Los síntomas clásicos de la exposición al virus del mosaico del tabaco de acuerdo con Moreno *et al.* (2004) son: mosaico ligero, hasta un mosaico amarillento, deformación de hojas, necrosis en los tallos, hojas y frutos, moteado de color verde oscuro o claro en hojas, encrespamiento y malformaciones en hojas. Los síntomas notorios en una planta de tomate con presencia de virus del mosaico del tomate de acuerdo a Moreno *et al.* (2004) son: color verde oscuro en hojas, enanismo de la planta, manchas decoloradas amarillas, alteraciones necróticas, reducción en tamaño de los frutos.

La recolección de muestras del cultivo de camote se realizó en el área de Agricultura Orgánica, Zamorano; donde se tomó muestras de plantas que presentaron sintomatología acorde a cada uno de los virus a evaluar, virus del enanismo clorótico (SPCSV), virus C del camote y virus del moteado plumoso la batata (SPFMV). Los síntomas clásicos de la exposición del virus del enanismo clorótico según Moncayo (2018) son: enanismo, mal formaciones de hojas, estrechez y distorsión de hojas, aclaramiento de nervadura, mosaico clorótico, tonalidades purpúreas.

El virus C del camote (SPVC), presenta la siguiente sintomatología según Moncayo (2018): distorsión de las hojas, retraso de crecimiento, clorosis, coloraciones púrpuras, amarillamiento, mosaico. Los síntomas característicos de una planta infectada por el virus del moteado plumoso de la batata según Moncayo (2018) son: patrón purpura plumoso en hojas, necrosis de la raíz, clorosis en las hojas, decoloración en la raíz.



Figura 1. Hojas de camote y tomate con síntomas de virus. (A) y (B) Amarillamiento; (C) aclaramiento de nervadura; (D) y (E) mosaico clorótico; (F), (G) y (H) mosaico; (G) enrollamiento y mal formaciones.

Transporte y procesamiento de muestras. Las muestras recolectadas en la unidad de Olericultura Intensiva; y Agricultura Orgánica, fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular para ser procesadas bajo técnicas de PCR.

Extracción de genoma viral. Para la extracción del genoma viral se utilizó el kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit, al cual se le modificó las instrucciones del fabricante acorde al protocolo a elaborar. Cada uno de los reactivos proporcionados por el kit, cumplen funciones específicas en el proceso de obtención de ARN de calidad (Cuadro 2). Para esta extracción de ADN y Purificación de ARN de los virus se siguieron los siguientes pasos los cuales forman parte del protocolo de identificación:

1. En la cámara de gases se mezcló en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 1 mL de RLT Plus con 10 μ L de B-mercaptoetanol (β -ME). El tampón RLT Plus que contiene β -ME se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por un mes.
2. Se cortaron las muestras del tejido con síntomas de virus en trozos pequeños utilizando tijeras estériles y fueron colocadas en papel filtro estéril.
3. Luego se pesaron las muestras cortadas con ayuda de una balanza. No se pesaron más de 2 g de tejido. Después de pesar se colocaron en un mortero rotulado con el número de la muestra a procesar.
4. Con ayuda de un mortero y un pistilo de mortero se maceraron con nitrógeno líquido las muestras que fueron pesadas con anterioridad.
5. Utilizando las pinzas se colocó el tejido en un tubo eppendorf de 1.5 mL con ceramic beads estéril.
6. En la cámara de gases se agregó al tejido 600 μ L del Buffer RLT Plus que contiene β -ME.
7. Posteriormente las muestras fueron colocadas en el disruptor por 20 minutos.
8. Se centrifugó el lisado durante 10 minutos a 12,000 rpm. Se retiró con cuidado el sobrenadante mediante pipeteo.
9. Se transfirió el sobrenadante a una columna de centrifugación de ADN AllPrep (Columna de color morado) colocada en un tubo de recolección de 2 mL, se centrifugó durante 30 segundos a 10,000 rpm.
10. Se le agregó 600 μ L de etanol al 70% al sobrenadante de la columna ADN AllPrep resultante del paso anterior lego se mezcló bien pipeteando.
11. Posteriormente se transfirió 600 μ L de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una columna de centrifugado RNAsas (columna de color rosada) colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el flujo continuo del tubo colector.
12. Se agregó 700 μ L de Buffer RW1 a la columna de centrifugado RNAsas. Se cerró la tapa y centrifugue durante 15 segundos a 10,000 rpm. Se desechó el flujo continuo del tubo colector.
13. Luego se agregó 500 μ L de Buffer RPE a la columna de centrifugado RNAsas. Se centrifugó durante 15 segundos a 10,000 rpm se desechó el flujo continuo del tubo colector.
14. Se agregaron 500 μ L del Buffer RPE a la columna de centrifugado RNAsas y se centrifugó durante 2 minutos a 10,000 rpm.
15. La columna de centrifugado RNAsas se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2mL, se desechó el tubo de recolección viejo con el flujo continuo. Se centrifugó a 14000 rpm durante un minuto para secar la membrana de la columna del hilado.
16. La columna de centrifugado RNAsas se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 50 μ L de agua libre de RNase directamente a la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa con cuidado y centrifugue durante un minuto a $\geq 10,000$ rpm para diluir el ARN.

Otro método empleado para la lisis celular en este estudio fue un tampón preparado en el laboratorio, para un volumen de 50 mL se utilizó: 5 mL de TRIS, cinco mililitros de EDTA, 5 mL de Cloruro de Sodio y 35 mL de agua destilada. A este tampón se le agregó 0.5 g de PVD y 2 mL de B-mercaptoetanol.

Cuadro 2. Reactivos empleados para la extracción y purificación de ADN y ARN y su función específica dentro del protocolo.

Reactivos	Función
RLT Plus	Utilizado para para lisar células y tejidos antes del aislamiento de ARN / ADN.
B-mercaptoetanol	Su función principal es eliminar ribonucleasas liberadas durante la lisis celular.
Etanol al 70%	Evita la co-precipitación de las sales. Elimina el exceso de sales.
Buffer RW1	Tampón de lavado riguroso que elimina de manera eficiente biomoléculas como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc., que están unidas no específicamente a la membrana de sílice.
Buffer RPE	Tampón de lavado concentrado para ARN unido a la membrana. Elimina los rastros de sales, que todavía están en la columna debido a los tampones empleados para la purificación de ARN.
Agua libre de RNasas	Agua libre de impurezas biológicamente activas, medio de resuspensión de ARN.

Fuente: QIAGEN 2013

Evaluación de calidad y concentración del material genético extraído. Para cuantificar la concentración y calidad del ARN obtenido se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, mediante la evaluación de pureza del ARN por rangos de ratio de A260/A280. Para la evaluación se siguió el protocolo establecido en el laboratorio guiando los pasos a evaluación de ARN.

Etapas de amplificación de ácidos nucleicos virales mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Durante la realización de la PCR, se estableció un protocolo para la mezcla de los iniciadores empleados. El coctel final para la muestra de PCR se preparó utilizando el APEX™, H₂O doble destilada, muestras de ARN, RT- enzima e iniciadores específicos para cada una de las muestras (Cuadro 3). Para replicar las hebras de ADN se siguieron cuatro pasos:

- Desnaturalización: En esta etapa las cadenas de ADN son calentadas a una temperatura de 95 °C para separar las hebras del ADN.
- Hibridación: En esta etapa se da el anillado de los dos primers a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN y cuya temperatura depende del tamaño y

composición nucleotídica del primer. Los iniciadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para lograr la especificidad y estabilidad del complejo templado-cebador es importante conocer la temperatura de hibridación para cada pareja de cebador (Cuadro 4).

- **Extensión:** En esta etapa de extensión intervienen la Taq Polimerasa cuya función es actuar sobre el complejo templado-cebador empezando su función catalítica a una velocidad muy rápida; se agregan dNTP's. La dirección de extensión se realiza de 5' a 3', la temperatura adecuada para la reacción es de 72 °C, la extensión final se realiza durante 5 ó 10 minutos con la misma temperatura (Naidu y Hughes 2003). En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los nuevos ciclos por lo que repitiendo los primeros tres pasos 30 ó 40 veces en un termociclador, la cantidad de nuevas hebras de ARN amplificadas suman millones (Asuar 2007). El producto final de la PCR fue analizado en un gel de agarosa tiñendo el ARN con bromuro de etidio que revela la amplificación realizada.
- **Mantenimiento:** Durante esta etapa la temperatura baja gradualmente a 8 °C, para darle mantenimiento al material duplicado. Esta temperatura es constante y termina hasta que las muestras sean retiradas del termociclador y guardadas en una nevera a 4 °C

Cuadro 3. Contenido de reactivos y cantidad a utilizar para un volumen final de 25 µL, en cada muestra procesada por PCR.

Contenido de PCR	
Reactivo	Cantidad (25µL)
APEX	12.50 µL
dd H ₂ O	6.00 µL
ARN	3.00 µL
Iniciadores F	1.25 µL
Iniciadores R	1.25 µL
RT- Omniscript	1.00 µL

Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores empleados, temperatura de hibridación y región amplificada en pares de bases.

Iniciadores	Secuencia	T °C	RA[§]
TMVF	5'CGA CAT CAG CCG ATG CAG C-3	59.3	500pb
TMVR	5'ACC GTT TTC GAA CCG AGA CT-3	56.5	
ToMV F	5'CGA GAG GGG CAA CAA ACA T-3	55.5	143 pb
ToMV R	5'ACC TGT CTC CAT CTC TTT GG-3	54.0	
WAR1	5'CTC TAG GAT ACA AAC ATT AAT-3	44.6	1400 pb
WAF1	5' GAA AAT TCT GTC CCA TAT TTC-3	47.0	
SPCSV- CL43L	5'GCA GCA GAA GGC TCG TTT AT-3	55.5	500 pb
SPCSV- CL43U	5'ATC GGC CTA TGT TGG TGG TA-3	56.3	
108204	5'GGC TCG ATC ACG AAC CAA-3	55.1	1800 pb
PVD-2	5' GGB AAY AAY AGY GGD CAR CC-3	56.2	

C: Citosina, A: Adenina; T: Timina, G: Guanina; B: GTC; Y: T; D: GAT; R: G A;
pb: pares de bases.

[§] RA: Región Amplificada; pb: pares de bases

Fuente: IDT Inc. 2015.

La Reacción en Cadena de Polimerasa, se desarrolló utilizando un master mix comercial APEX™ (Cuadro 5). Para el proceso de PCR se utilizó un termociclador PTC-100™ en el cual se siguió un programa de desnaturalización, hibridación, extensión y mantenimiento específico para cada una de las muestras según la temperatura de hibridación de los iniciadores a utilizar. Para el ciclo inicial se uso 95 °C por un minuto, para la desnaturalización se uso 95 °C por 30 segundos, la hibridación se realizó durante 30 segundos con temperaturas específicas para cada cebador (Cuadro 6), para la extensión se uso 72 °C por un minuto y para la extensión final se uso 72 °C por cinco minutos, repitiendo el ciclo 35 veces. El programa de PCR se evaluó de dos formas: con temperaturas de hibridación promedios para realizar la PCR por grupos de primers y con temperaturas específicas por muestras separadas tomando en cuenta la temperatura de hibridación.

Cuadro 5. Contenido, función y concentración de los reactivos que contiene el APEX utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa.

APEX™	
Contenido	Función
Buffer 10x	Regulador de pH
dNTP's	Nucleótidos que sirven para generar nuevas cadenas de ADN
MgCl ₂	Iones cargados positivamente necesario para la realización de la Polimerasa.
Taq Polimerasa	Enzima que duplica el ARN molde

Fuente: 2019 Genesee Scientific Corporation[©]

Cuadro 6. Temperaturas específicas de hibridación para cada cebador utilizado en la PCR.

Cebadores	TMVF/ TMVR	ToMVF/ ToMVR	WAR1/ WAF1	SPCSV-CL431/ SPCSV-CL43U	108204/ PVD-2
Temperatura	57.9 °C	54.8 °C	45.8 °C	55.9 °C	55.65 °C

Etapas de Análisis de los productos de PCR. Se cargaron 8 µL de producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con 7.5 µL bromuro de etidio. Luego se sometió a electroforesis a 100 Voltios por 40 minutos, utilizando agua ultra pura libre de RNasas. La cámara de electroforesis utilizada fue Thermo scientific, OWL EASYCAST™ B2-BP. Los productos de PCR se visualizaron mediante la tinción en gel con bromuro de etidio (7.5 µL) se observaron con luz ultravioleta utilizando SPECTROLINE, Ultraviolet transilluminator.

Fase de la evaluación de los productos de PCR, para la identificación de los virus.

Esta fase comprende la evaluación de los protocolos implementados mediante el empleo de productos obtenidos de la técnica de PCR para la identificación de virus. Los protocolos empleados fueron evaluados utilizando 10 muestras de tomate recolectadas en los invernaderos de la unidad de Olericultura Intensiva y 10 muestras de camote recolectadas en la unidad de Agricultura Orgánica. Los protocolos fueron evaluados mediante PCR y su posterior amplificación para confirmar la presencia de virus y validar el protocolo de identificación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de Implementación de protocolo de identificación.

Síntomas de la enfermedad. Las muestras de tomate recolectadas para el establecimiento del protocolo de identificación de virus con técnicas de PCR, mostraron sintomatología referente a la presencia de virus fitopatógenos (Figura 2). Estos síntomas son los característicos de una probable infección viral tales como amarillamiento, deformación de hojas, mosaico, clorosis (Moreno *et al.* 2004; Moncayo 2018). La sintomatología producida por los virus fue considerada la primera forma de detectar e identificar los virus que afectaban a las plantas de esta manera fueron nombraron de acuerdo a la sintomatología que producían (González-Garza 2017). Estos síntomas descritos anteriormente son representativos de los virus de mosaico del tomate y el tabaco (TMV-ToMV).

Las muestras de camote mostraron la sintomatología descrita a continuación la cual hace referencia a la presencia de virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV), virus del moteado plumoso del camote (SPFMV) y el virus del camote C (SPVC), (Figura 3).

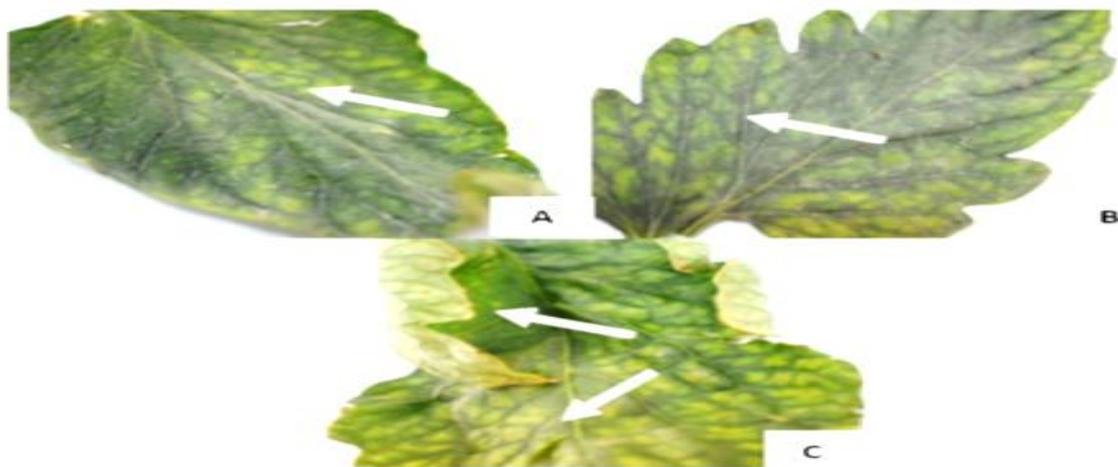


Figura 2. Hojas de tomate con sintomatología de virus. (A) Hojas cloróticas, mosaico de verde oscuro a verde claro; (B) hojas cloróticas y malformaciones; (C) mosaico amarillo, malformaciones de hojas y clorosis.

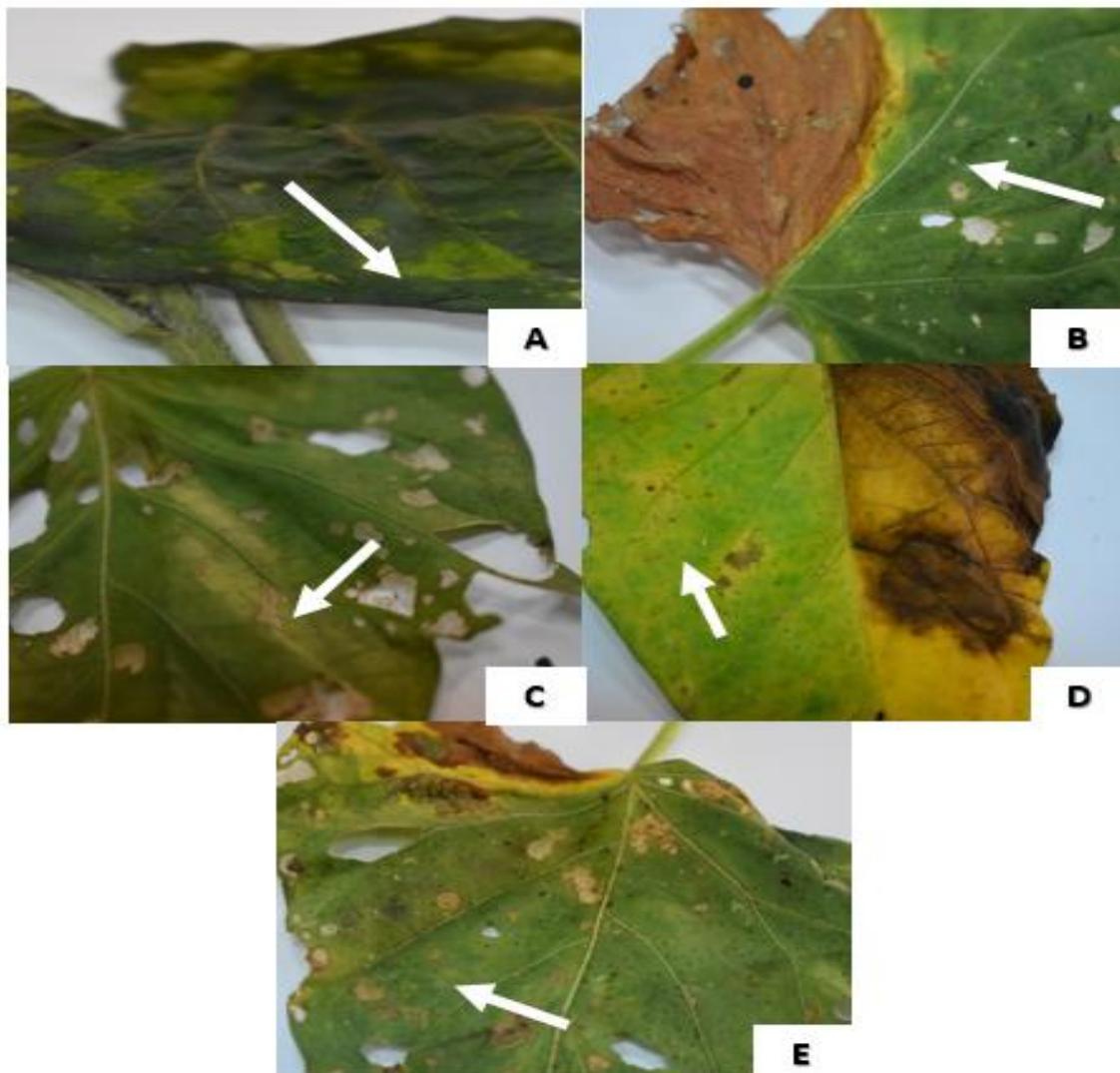


Figura 3. Hojas de camote con síntomas de virus. (A) Amarillamiento en hojas jóvenes; (B) mosaico clorótico, aclaramiento de nervadura; (C) mosaico clorótico; (D) mosaico amarillo en hojas nuevas; (E) manchas amarillas y decoloración de hojas.

Extracción y evaluación del genoma viral. La extracción de ARN se realizó para todas las muestras de camote y tomate. La cuantificación y calidad del ARN se utilizó el método de espectrofotometría por medio del equipo NanoDrop ND-1000, el cual mostro un rango de concentración de muestras extraídas de ARN con el kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit de 3.02 ng/ μ L y 163.78 ng/ μ L para camote. En tomate el rango de concentración fue de 2.0 ng/ μ L y 55.11 ng/ μ L. Mediante el método de espectrofotometría por medio del equipo NanoDrop ND-1000, el cual mostró un rango de concentración de muestras extraídas de ARN con buffer de extracción rangos de 2.02 ng/ μ L y 59.6 ng/ μ L para camote. En tomate el rango de concentración fue 1.0 ng/ μ L y 45.11 ng/ μ L.

Según Orfao (2012), con el uso de espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ARN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. La pureza del ARN fue obtenida por medio de relaciones de absorbancia los rangos de ratio de 260/280, Leninger (1975) indica que para cada nucleótido puro se obtiene una pureza de: Guanina 1.15, Citosina 1.51, Adenina 4.50 y Uracilo 1.47. Para cada muestra analizada en las cuales se utilizó el kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit se obtuvo una pureza que va desde 1.0 a 2.18. Las muestras en las cuales se utilizó el buffer de extracción se obtuvieron rango de pureza de 1.0 a 8.0. Estos rangos no son los óptimos ya que en ARN debería ser de 2.0 (Figura 5). La diferencia de pureza puede otorgarse a la contaminación por proteínas o fenoles y sales provenientes de reactivos que se utilicen en el proceso de extracción de material genético. Los resultados de las diferentes concentraciones se obtienen de las columnas tituladas para las muestras analizadas como “Sample ID”, la concentración se presenta como ng/μL y la pureza observada en la relación de rangos de ratio en la columna que se muestra con el título 260/280 (Figura 4).

La diferencia en cuanto a la pureza y concentración de ARN entre los dos métodos empleados se debe a la utilización de nitrógeno líquido para macerar las muestras de tejido foliar lo cual permite que los reactivos que se utilizaron con el kit comercial tengan más contacto con las células que contienen el material genético del virus. Según Alejos *et al.* (2014), el nitrógeno líquido, permite que el tejido se congele de inmediato y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen.

Al momento de utilizar soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Una de estas soluciones de lisis es la utilizada en el buffer de extracción EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg²⁺ e impide el funcionamiento de las RNasas (Sambrook *et al.* 1989).

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
T-1	Default	22/08/2019	08:37 a.m.	40.39	1.010	0.791	1.28	0.55	40.00	230	1.844	2.305
T-2	Default	22/08/2019	08:39 a.m.	55.11	1.378	0.750	1.84	1.08	40.00	230	1.273	0.353
T-3	Default	22/08/2019	08:40 a.m.	15.77	0.394	0.274	1.44	0.10	40.00	230	3.951	0.184
C-1	Default	22/08/2019	08:42 a.m.	9.02	0.225	0.154	1.47	0.06	40.00	230	3.763	0.175
C-2	Default	22/08/2019	08:43 a.m.	59.69	1.492	1.101	1.36	0.46	40.00	230	3.256	3.204
C-3	Default	22/08/2019	08:44 a.m.	12.87	0.322	0.259	1.24	0.10	40.00	230	3.306	0.269
C-5	Default	22/08/2019	08:46 a.m.	6.73	0.168	0.132	1.28	0.05	40.00	230	3.404	0.171
C-4	Default	22/08/2019	08:48 a.m.	24.93	0.623	0.512	1.22	0.37	40.00	230	1.663	0.836
T-3.1	Default	22/08/2019	08:50 a.m.	16.34	0.409	0.309	1.32	0.10	40.00	230	4.004	0.300
C-1.1	Default	22/08/2019	08:52 a.m.	6.14	0.154	0.120	1.28	0.04	40.00	230	3.677	0.110
tmv-v	Default	22/08/2019	08:56 a.m.	20.77	0.519	0.270	1.92	0.18	40.00	230	2.870	0.020
tomv-n	Default	22/08/2019	08:57 a.m.	8.25	0.206	0.095	2.18	0.17	40.00	230	1.194	-0.169

Figura 4. Resultados de cuantificación y pureza realizados por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop ND-1000 utilizando el kit comercial.

Evaluación de los productos de PCR, para la identificación de los virus.

Se estableció el siguiente protocolo para identificación de Virus fitopatógenos:

Extracción de ARN.

1. En la cámara de gases mezclar en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 1 mL de RLT Plus con 10 μ L de B-mercaptoetanol (β -ME). El tampón RLT Plus que contiene β -ME se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por 1 mes.
2. Cortar las muestras del tejido con síntomas de virus en trozos pequeños utilizando tijeras estériles y colocarlas en papel filtro estéril.
3. Pesar las muestras cortadas con ayuda de una balanza. No pesar más de 2 g de tejido. Después de pesar colocar las muestras en un mortero rotulado con el número de la muestra a procesar.
4. Con ayuda de un mortero y un pistilo de mortero macerar con nitrógeno líquido las muestras que fueron pesadas con anterioridad.
5. Utilizando las pinzas introducir el tejido en un tubo eppendorf de 1.5 mL con ceramic beads estéril.
6. En la cámara de gases agregar al tejido 600 μ L del Buffer RLT Plus que contiene β -ME.
7. Colocar las muestras en el disruptor por 20 minutos.
8. Centrifugar el lisado durante 10 minutos a 12,000 rpm. Retirar con cuidado el sobrenadante mediante pipeteo.
9. Transferir el sobrenadante a una columna de centrifugación de ADN AllPrep (Columna de color morado) colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Cerrar la tapa suavemente, centrifugar durante 30 segundos a 10,000 rpm.
10. Agregar 600 μ L de etanol al 70% al sobrenadante de la columna ADN AllPrep resultante del paso anterior. Mezclar bien pipeteando. No centrifugue.
11. Transferir 600 μ L de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una columna de centrifugado RNAsas (columna de color rosada) colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm. Deseche el flujo continuo del

tubo colector. Repetir este paso con el sobrenadante restante. Nota: Reutilice el tubo de recolección en los pasos 8-9-10.

12. Añadir 700 μL de Buffer RW1 a la columna de centrifugado RNAsas. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a 10,000 rpm. Deseche el flujo continuo del tubo colector.
13. Agregue 500 μL de Buffer RPE a la columna de centrifugado RNAsas. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a 10,000 rpm. Deseche el flujo continuo del tubo colector.
14. Agregar 500 μL del Buffer RPE a la columna de centrifugado RNAsas. Cerrar la tapa y centrifugue durante 2 minutos a 10,000 rpm.
15. Coloque la columna de centrifugado RNAsas en un nuevo tubo de recolección de 2mL, Deseche el tubo de recolección viejo con el flujo continuo. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto para secar la membrana de la columna del hilado.
Coloque la columna de centrifugado RNAsas en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Agregue 50 μL de agua libre de RNAsas directamente a la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa con cuidado y centrifugue durante 1 minuto a $\geq 10,000$ rpm para diluir el ARN.

Fase de evaluación de calidad y concentración del material genético extraído.

1. Encienda la computadora y corra el programa ND-1000.
2. Seleccionar en la pantalla el método a aplicar nucleótidos ARN.
3. Para inicializar el equipo limpie el brazo y el pedestal. Coloque 2 μL de agua destilada estéril en el lente LED ubicado en el pedestal.
4. Baje el brazo cuidadosamente. En la pantalla presione “Ok” para inicializar el equipo.
5. Asegúrese que la opción “Recording” esté activada.
6. Limpie el brazo y el pedestal nuevamente y coloque 2 μL de agua libre de RNAsas.
7. Baje el brazo cuidadosamente y en la pantalla presione “Blank” para calibrar el equipo.
8. Limpie el brazo y el pedestal
9. Coloque 2 μL de la muestra de ARN.
10. Baje el brazo cuidadosamente.
11. En el espacio “Sample ID” coloque el nombre de la muestra.
12. Presione el botón “Measure” para obtener el resultado de la muestra. La concentración aparecerá en la esquina inferior derecha, en un recuadro color verde.
13. Limpie el brazo y el pedestal. Repita los pasos 8-12 para cada una de las muestras que requiera analizar.
14. Al finalizar corra nuevamente la solución en la cual está suspendida la muestra, agua libre de RNAsas como control.
15. Finalmente limpie el brazo y el pedestal.
16. Presione el botón “Show report” para observar los resultados de las muestras.
17. Presione en la ventana “File” y seleccione en el menú “Save window”. Escriba el nombre del archivo y guárdelo en el escritorio.
18. Cierre el programa y extraiga el archivo con una memoria USB.
19. Apague la computadora

Electroforesis en gel de agarosa.

1. Tomar 20 mL de la solución 50X TAE y mezclar en 980 mL de agua ultra pura libre de RNAsas.
2. Colocar en un Erlenmeyer de 500 mL, 150 mL de 1X TAE.

3. Añadir 1.5 g de agarosa (1% gel de agarosa en 1X TAE).
4. Calentar la mezcla en el microondas durante 3 minutos.
5. Sellar los bordes de la bandeja para gel con tape de rotulación.
6. Colocar los peines sobre las hendiduras de la bandeja para gel.
7. Esperar que se enfríe parcialmente la mezcla para añadir 7.5 μL de bromuro de Etidio.
8. En la cámara de gases verter la mezcla del gel de agarosa en la bandeja para gel y dejar reposar hasta que se solidifique.
9. Retirar el tape de los bordes y colocar el gel en la unidad de electroforesis.
10. Verter los 850 mL del 1X TAE restante en la cámara de electroforesis hasta que el gel quede completamente sumergido
11. Retirar cuidadosamente los peines del gel.

Siembra del gel.

1. En un pedazo de parafina coloque 2 μL de loading Dye 6X para cada muestra a sembrar.
2. Mezclar el loading Dye con 5 μL de amplicón y siembre en los agujeros del gel de agarosa.
3. Mezcle el loading Dye con 5 μL de 1 kb y siembre en los agujeros del gel de agarosa.

Corrido en la unidad de electroforesis.

1. Tapar el tanque de electroforesis y conectar los cables de acuerdo a su color conectados a la fuente de poder BioRad.
2. Ajuste el voltaje a 100 voltios y corra las muestras por 40 minutos.
3. Coloque el gel en el UV y tome una fotografía rápidamente.
4. Limpie y elimine los residuos.

PCR. Para el establecimiento de la PCR se debe emplear el perfil térmico establecido y los siguientes reactivos y volumen específico, para llevar a una concentración 1X en cada volumen de 25 μL .

Reactivo	Cantidad (25 μL)
APEX	12.5 μL
dd H_2O	7.00 μL
ARN	3.00 μL
Iniciadores F	1.25 μL
Iniciadores R	1.25 μL
RT- Omniscript	1.00 μL

Amplificación de ácidos nucleicos virales mediante PCR. Al momento de realizar la técnica de PCR con temperaturas de hibridación promedios para realizar la PCR por grupos de primers para camote SPCSV-CL43L/SPCSV-CL43U y 108204/PVD-2, donde se utilizó una temperatura promedio entre iniciadores de 55.7 $^{\circ}\text{C}$ en el paso tres del perfil térmico utilizado en el termociclador no se obtuvieron resultados de amplificación mostrados en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (7.5 μL).

Ibarra *et al.* (2013) indican que para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima. Por lo tanto, para la identificación de virus se decidió trabajar con el kit comercial y utilizar temperaturas específicas de hibridación en el perfil térmico utilizado en el termociclador.

Mediante la utilización del protocolo establecido utilizando el método de extracción del kit comercial y el perfil térmico acorde a cada primers a utilizar se identificaron las infecciones virales en los cultivos de tomate y camote. Se determinó la presencia de virus en tomate como lo es el virus del mosaico del tabaco TMV y el virus del mosaico del tabaco ToMV.

De igual manera se comprobó la presencia de virus en camote por medio de PCR, entre los cuales se encuentra el virus del moteado plumoso el cual se confirmó mediante su secuenciación de 3'-extremo proximal (1,800 pb) del genoma. El virus del enanismo clorótico del camote se determinó mediante PCR donde se amplificó un producto de 500 pb.

La presencia de estos virus se muestra más detalladamente en la amplificación de productos de PCR que se muestra a continuación. Estudios realizados en el 2002 sobre la identificación de las infecciones virales en los principales cultivos hortícolas y malezas en 3 regiones de honduras comprueban la presencia de los virus del mosaico del tabaco y el virus del mosaico del tomate, registra que las afectaciones virales varían de acuerdo a la época del año y la región.

Estos virus identificados fueron comprobados mediante pruebas moleculares de PCR utilizando iniciadores específicos (Doyle 2002). De igual manera se tiene registro de estudios realizados en Honduras y Guatemala para la detección y caracterización de virus en camote en cual se confirmó la presencia de los virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV), el virus del moteado plumoso del camote (SPFMV), la presencia de estos virus fue comprobada mediante pruebas serológicas y luego se realizaron pruebas de PCR. Para el virus C del camote no se tiene registros en Honduras debido a que no se logró observar la banda esperada de 1.4 kb en el estudio realizado por Kashif (2012), al igual que en este estudio no se logró observar bandas correspondientes al virus. A continuación, se muestran las amplificaciones en bandas de pares de bases que confirman la presencia de virus en los cultivos de tomate y camote.

Amplificación del virus del mosaico del tabaco (TMV). La presencia de TMV en los invernaderos de la unidad de Olericultura intensiva se confirmó mediante la técnica de PCR utilizando el ARN extraído y evaluado de 10 muestras recolectadas en la unidad de las cuales en siete muestras se logró identificar el virus (Figura 5). Se amplificó utilizando una pareja de iniciadores específicos TMV F / TMV R y bandas de marcadores adicionales de 1 kb. Detección del virus del mosaico del tabaco TMV, por medio de la extracción de ssARN de hojas de tomate donde se observaron bandas claras con buena calidad, el tamaño de banda esperado de 550 pb que codifica la proteína específica de este virus (Figura 6).

Estudios realizados en la detección y aislamiento del virus TMV en canavalia mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando marcadores de peso molecular y los siguientes oligonucleótidos TMV-CP-R y TMV-CP-F los cuales dirigieron exitosamente la amplificación de un segmento de ADN de 500 pb en la reacción de PCR (Ortega *et al.* 2007).

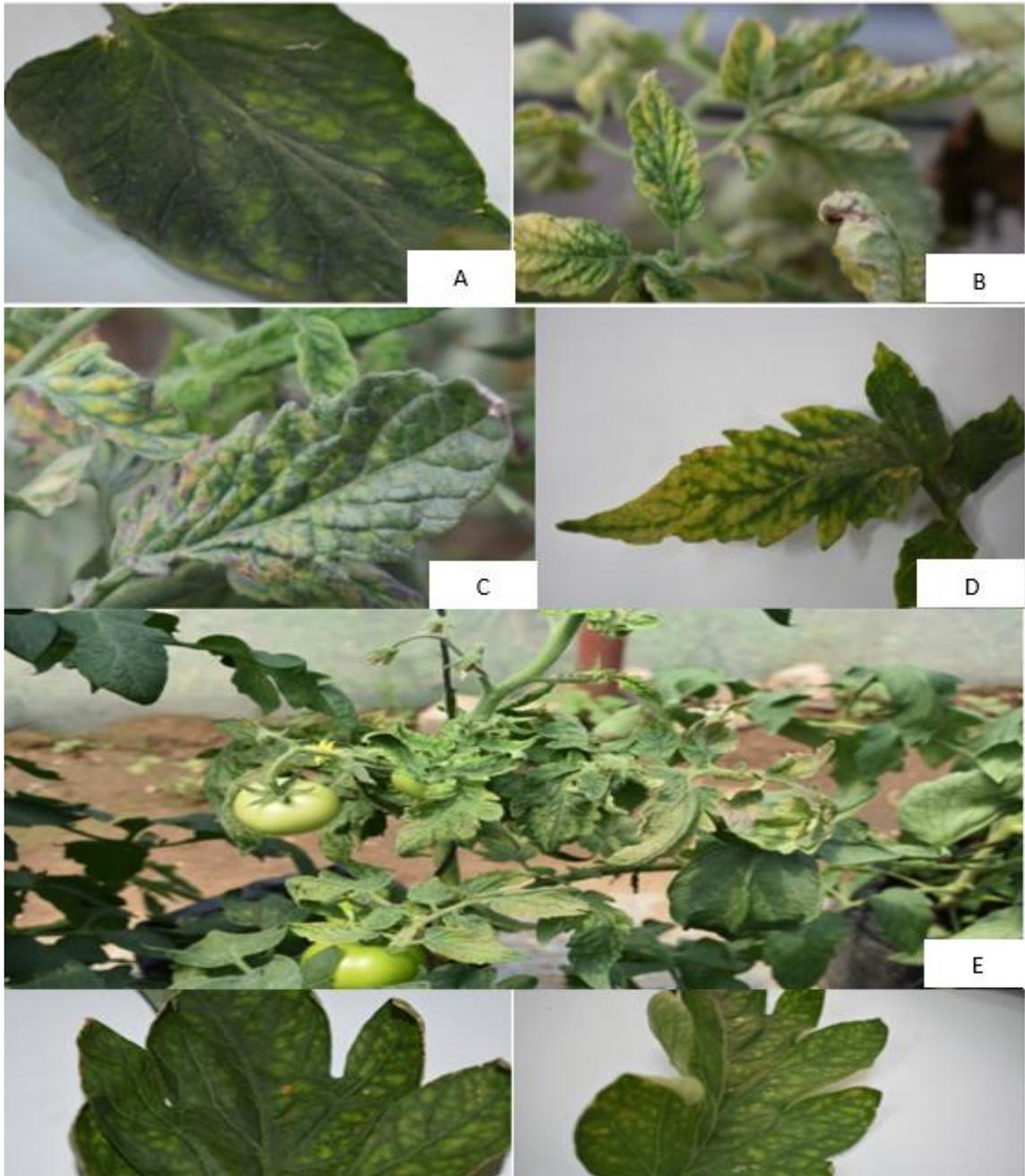


Figura 5. Muestras de tomate donde se comprobó la presencia de TMV. Sintomatología característica: (A) y (C) mosaico de verde oscuro a verde claro; (B) y (D) amarillamiento; (E); deformaciones en la parte apical de la planta; (F) y (G) mosaico

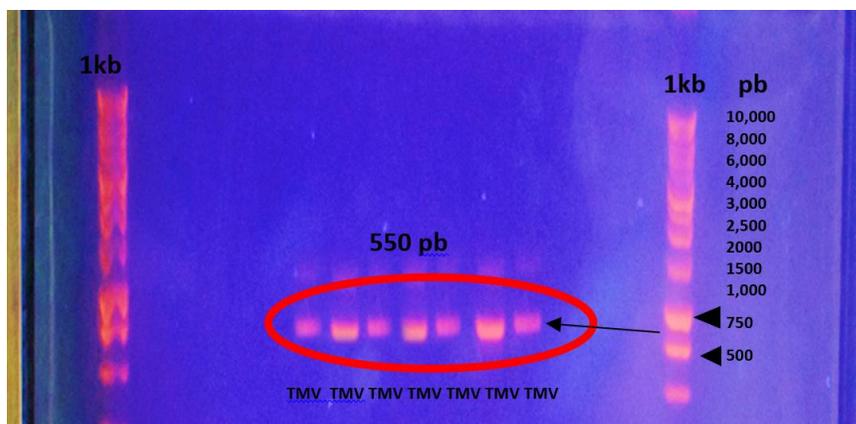


Figura 6. Amplificación de un fragmento de 550 pb del genoma TMV usando cebadores TMVF / TMVR y marcadores moleculares adicionales de 1kb, observado mediante electroforesis en gel agarosa al 1% en tampón TAE.

Amplificación del virus del mosaico del tomate (ToMV). La presencia del virus se confirmó en tres de las muestras recolectadas (Figura 7). Fue analizada con la técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos ToMV F/ ToMV R (Figura 8). El genoma de este virus constituye el 5% del peso del virión, está compuesto por una cadena sencilla de ARN en sentido positivo con 6384 nucleótidos (nt) y una caperuza metilada en su extremo 5' m7Gppp (G)37. El ARN codifica para proteínas estructurales y no estructurales y los viriones tienen solo un tipo de proteína de cápside. Komoda *et al.* (2007) indica que el genoma del ToMV codifica para cuatro proteínas: las proteínas de 130 kDa y 180 kDa las cuales son sintetizadas desde el ARN genómico y están involucradas en la replicación, supresión del silenciamiento y movimiento de célula a célula.

La proteína 180K es sintetizada por supresión del codón de terminación del marco abierto de lectura (ORF) de la proteína 130 K54. De las cuatro proteínas que codifica ToMV, la proteína 180K es necesaria para la replicación del ARN. Sin embargo, en el ORF que codifica para la proteína 130 K, el reemplazo del codón de terminación por una tripleta que codifica para tirosina o fenilalanina, inhibe la producción de la proteína 130K, lo cual reduce la eficiencia en la replicación del ARN viral. De esta manera ocurre el balance de la síntesis de ambas proteínas (130K y 180K) lo cual es necesario para una replicación eficiente del ARN (Komoda *et al.* 2007). El virus para su función de movimiento de célula a célula requiere de la proteína 30 kDa, junto con la CP son sintetizadas por traducción del ARN subgenómicos (Tasai *et al.* 2008).

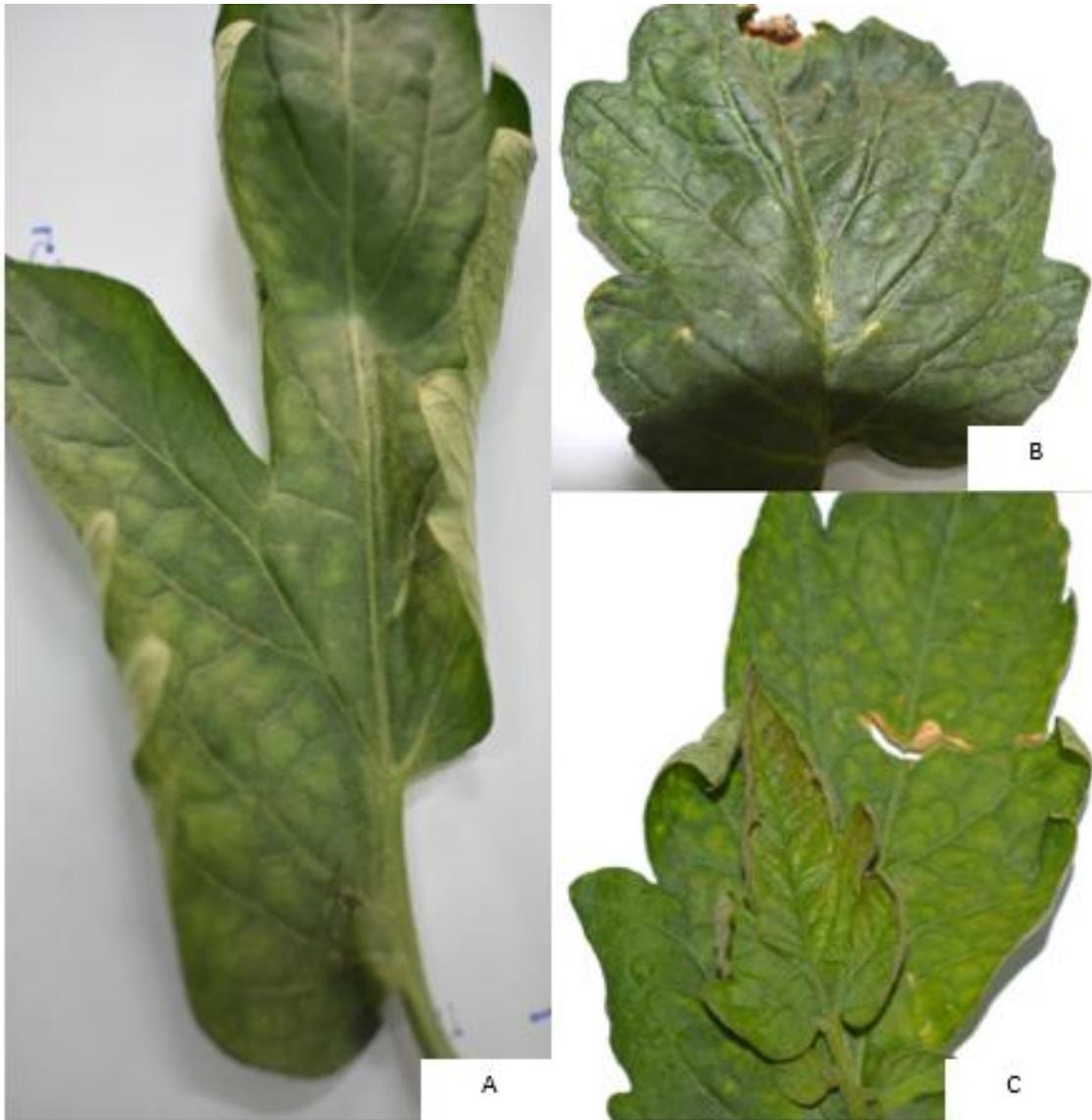


Figura 7. Muestras de tomate donde se comprobó la presencia de ToMV. Sintomatología característica: (A) mosaico de verde oscuro; (B) clorosis; (C) deformaciones en hojas jóvenes de la panta.

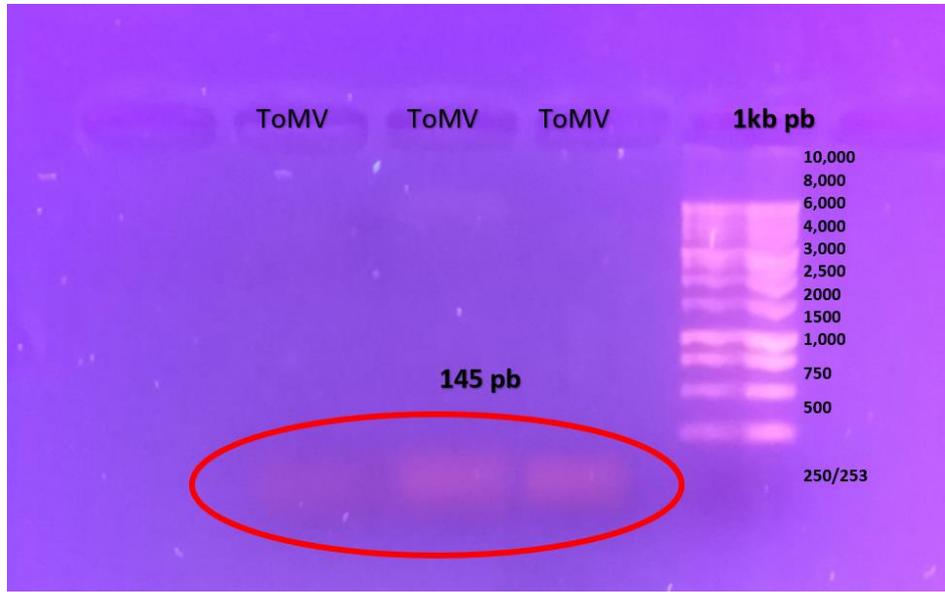


Figura 8. Amplificación de una banda de 145 pb utilizando los iniciadores ToMV F/ToMV R específicos para el virus del mosaico del tomate. Observada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñida con bromuro de etidio.

Amplificación del virus del moteado plumoso del camote (SPFMV). La presencia del virus se comprobó en ocho de las 10 muestras colectadas (Figura 9). Detección de virus por extracción de ssRNA de hojas jóvenes de camote las plantas mediante la técnica de PCR, empleando iniciadores específicos PVD2 / 1082014 en el cual se amplificó una banda de 1.8 kb (Figura 10). Kashif (2012) en su estudio realizado comprobó la presencia del virus del moteado plumoso del camote utilizando iniciadores específicos PVD-2/10820R, donde se amplifico una banda de 1.8 kb.

Los virus pertenecientes al género Potyvirus poseen viriones de partículas flexibles, no envueltas, filamentosas que van de 680 a 900 nm de largo y de 11 a 15 nm de ancho. (Urcuqui-Inchima, *et al.* 2001). La formación de cuerpos de inclusión cilíndrica citoplasmática (CI) serán codificados por virus en el citoplasma es su característica distinguida (Van Regermortel *et al.* 2000).

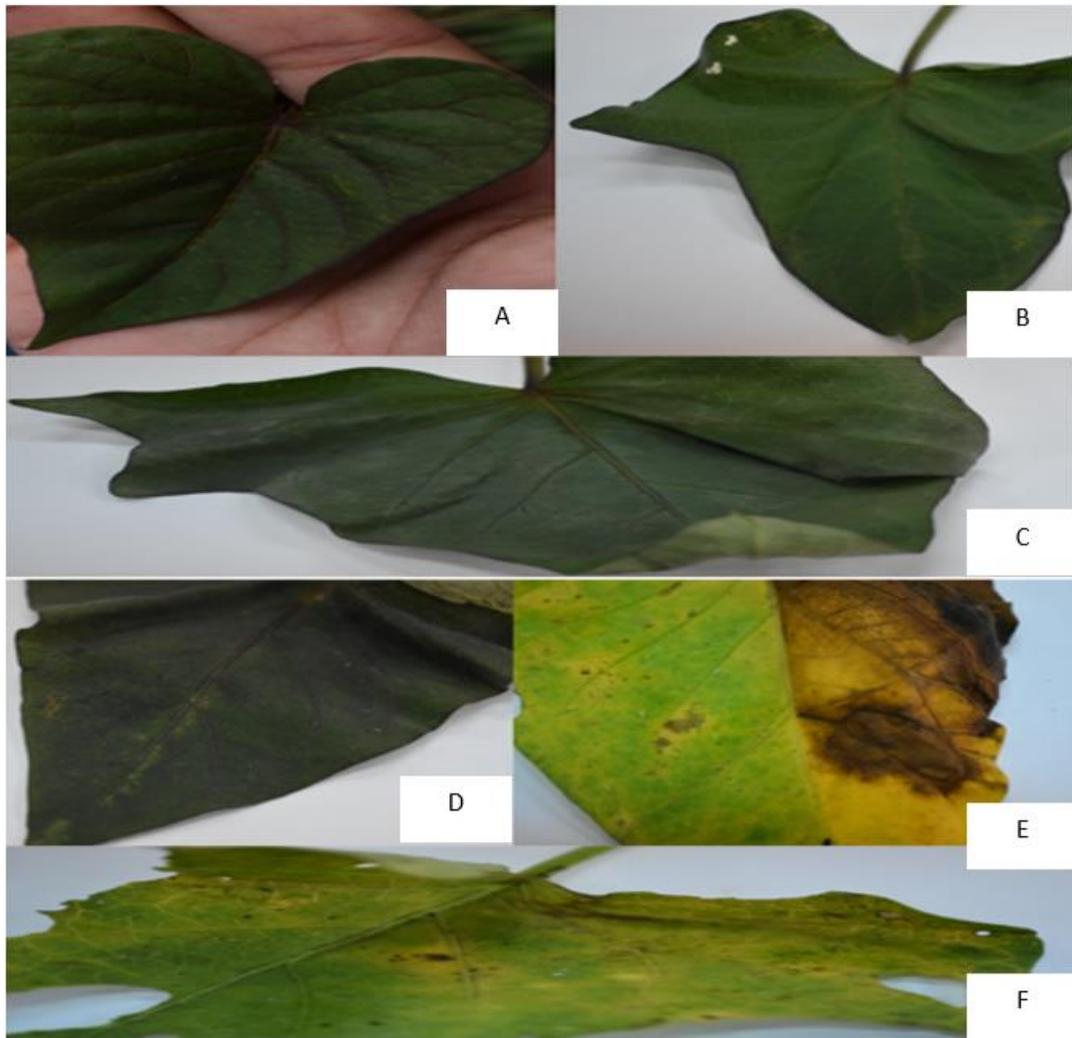


Figura 9. Muestras de camote donde se comprobó la presencia de SPFMV. Sintomatología característica: (A-B) mosaico de verde oscuro; (C) decoloración de hojas; (D) clorosis; (E-F) amarillamiento.

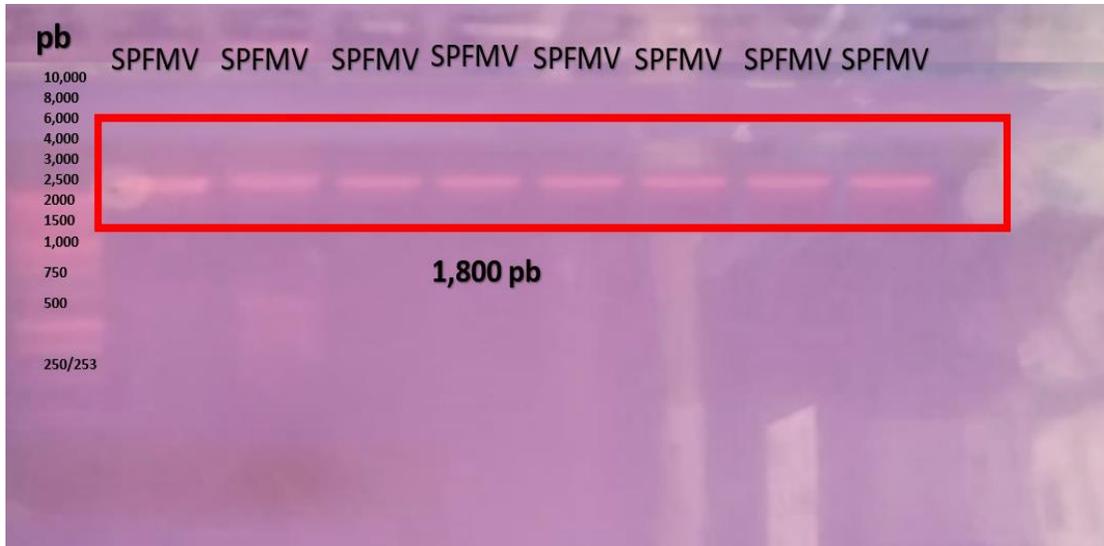


Figura 10. Amplificación de bandas de 1,800 pb lo cual confirma la presencia del virus del moteado plumoso (SPFMV). Observado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Utilizando Bromuro de etidio para teñir las bandas.

El virus del camote más común alrededor de todo el mundo es moteado plumoso (SPFMV). (Moyer y Salazar 1989). Sakai et al 1997 explica que el genoma de este virus es más grande que el promedio de 9.7 kb que generalmente poseen los virus pertenecientes al mismo género. La cubierta proteica (CP) que posee este virus es increíblemente muy grande (38 kDa) en comparación de otros virus. (Abad et al. 1992).

El genoma posee un ORF único, flanqueado por una región no descrita tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' que codifica una poliproteína muy grande. Kashif 2012 indica que *el* genoma del SPFMV presenta un marco de lectura abierto. Los productos proteicos finales sintetizados por el virus, P1 proteinasa (P1-Pro), proteína de componente auxiliar (Hc-Pro), tercera proteína (P3), proteína 6kDa 1 (6K1), proteína de inclusión cilíndrica que es un helicasa de ARN (CI), proteína 6kDa 2 (6K2), proteína de inclusión nuclear a (NIa), que puede transformarse en la proteína viral ligada al genoma (VPg) y a la NIa proteinasa (Pro) y la proteína de inclusión nuclear b (NIb) (Figura 11).

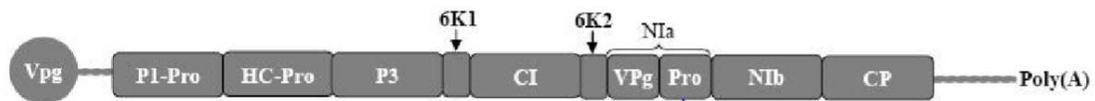


Figura 11. Genoma del virus del moteado plumoso del camote (SPFMV). Fuente: (Kashif 2012).

Amplificación del virus del enanismo clorótico del camote (SPCSV). La presencia del virus se comprobó en dos muestras de camote (Figura 12). Se empleó la técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos SPCSV-CL43L/SPCSV-CL43U los cuales son específicos para la región *HSP70h* de SPCSV (Figura 13). Según Kashif (2012) en su estudio comprobó la presencia del virus del enanismo clorótico mediante imprimaciones específicas de (CL43U/CL43L) para la región del *HSP70h* del genoma viral amplificando un producto de 500 pb.

Es considerado en la actualidad un patógeno agrícolamente significativo en el cultivo de camote, principalmente transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de manera semipersistente (Sim *et al.* 2000). Tiene una partícula flexible de 850-950 nm longitud y 12 nm de diámetro. SPCSV está constituido por un genoma bipartito con dos moléculas de ARN: ARN1 que consta de 9407 nt y el RNA2 con 8223 nt, en el cual el ARN1 incluye cinco ORF supuestos para proteínas relacionadas con la replicación y el ARN2 contiene siete ORF supuestos.

Kashif (2012) indica que el genoma del virus del enanismo clorótico del camote presenta una organización del genoma el cual presenta ORFs, proteínas putativas y sus funciones: (RNA1) P-Pro, cisteína proteinasa de tipo papaína supuesta; MTR, dominio de la metiltransferasa; HEL, dominio helicasa; RDRp, ARN dependiente del ARN polimerasa; (ARN2) Hsp 70h: homólogo proteico de la familia de choque térmico 70; CP: capa proteica, CPm: proteína de recubrimiento menor. Dos ORF adicionales ausentes de otros miembros de crinivirus: RNaseIII; endonucleasa específica de dsRNA; y p22, un supresor silenciador de proteína (Figura 14).



Figura 12. Muestras de camote donde se comprobó la presencia de SPCSV. Sintomatología característica: (A-B) amarillamiento en hojas, deformaciones y clorosis.

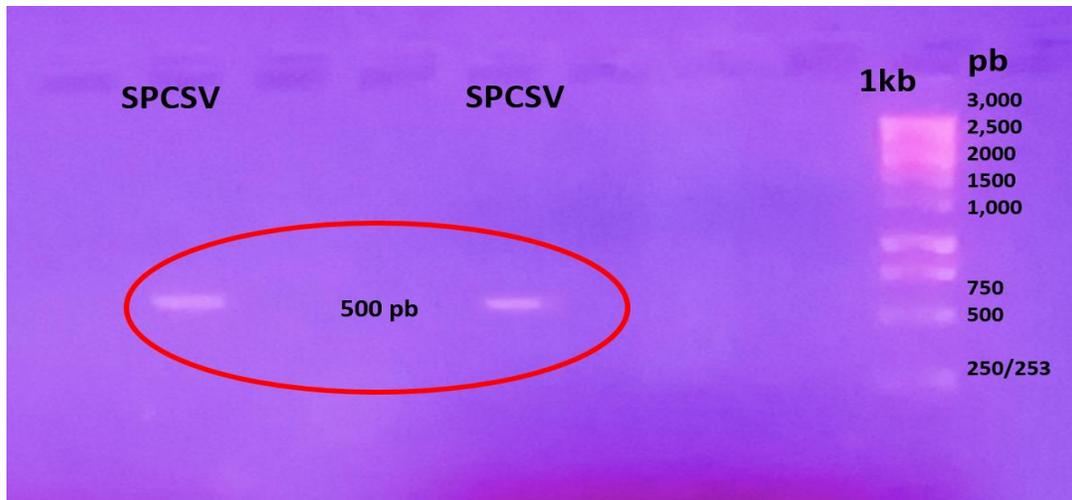


Figura 13. Amplificación de bandas de 500 pb mediante el uso de iniciadores específicos CL43L/SPCSV-CL43U para la región HSP70h de SPCSV, observadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñida con bromuro de etidio.

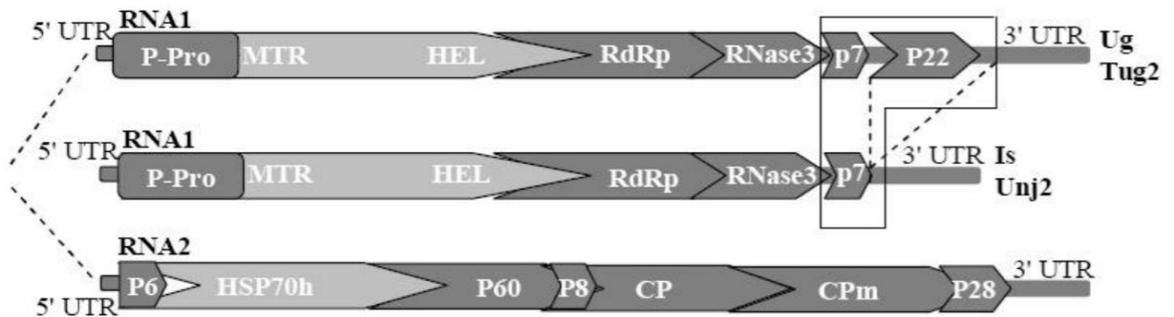


Figura 14. Representación de la organización del genoma del virus SPCSV compuesto por el ARN SPCSV1 en el carril superior y medio y el ARN2 en el carril inferior. Fuente: Kashif (2012).

4. CONCLUSIONES

- Se implementó un protocolo empleando la técnica de PCR para la identificación de los virus TMV, ToMV, SPCSV, SPFMV y SPVC el cual se empleará en futuros diagnósticos a realizar por parte del Laboratorio de Fitopatología.
- Se identificó la presencia de los virus del mosaico del tabaco (TMV) y del mosaico del tomate (ToMV), en las muestras recolectadas en la unidad de Olericultura Intensiva mediante la técnica de PCR.
- Se identificaron los virus del enanismo clorótico (SPCSV) y virus del moteado plumoso (SPFMV) en las muestras recolectadas de camote en el área de Agricultura Orgánica. No se logró identificar la presencia del virus C del camote (SPVC) en las muestras recolectadas.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar protocolos de extracción de ARN que no impliquen el empleo de un kit comercial.
- Realizar pruebas empleando un mayor número de muestras para corroborar la ausencia del virus C del camote.
- Analizar la presencia de virus DNA que afectan tomate y camote.
- Reconocer en campo la presencia de vectores específicos que transmiten los virus a las plantas que permitan establecer una estrategia de control.
- Realizar análisis en laboratorio para confirmar la presencia de los virus encontrados en campo y de esta manera establecer un plan de manejo.

6. LITERATURA CITADA

- Abad JA, Conkling MA, Moyer JW. 1992. Comparison of the capsid protein cistron from serologically distinct strains of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV). In Abad JA, Conkling MA, Moyer JW, editors. *Archives of Virology*. Springer Vienna. p. 147-157.
- Alejos L, Aragón MD, Cornejo A. 2014. Extracción y purificación de ADN. In: Alejos L, Aragón MD, Cornejo A. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. México. Vol 3: 1-26
- Asuar L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. In: Raúl Marcó del Pont Lalli. *Ecología molecular*. Ciudad de México (México): Raúl Marcó del Pont Lalli. p. 517-540.
- Bolaños Gonzáles FC. 2018. Desarrollo de un plan de producción hortícola para satisfacer la demanda interna 2019 de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 122 p.
- Doyle M. 2002. Identificación de las infecciones virales en los principales cultivos hortícolas y malezas en 3 regiones de Honduras 1998-2002. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 69 p.
- Goelet P, Lomonosoff GP, Butler PJ, Akam ME, Gait MJ, Karn J. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol 79(19). 5818-5822.
- González-Garza R. 2017. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*; [consultado 2018 nov 01]. 35(3):591-610. eng http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533092017000300591&script=sci_abstract&tlng=pt
- Hull R. 2014. *Plant Virology*. 5a ed. California (Estados Unidos): Academic Press; [consultado 2018 nov 01]. 42: 653-659. eng doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00023-6
- Ibarra C, Tamay de Dios L, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Kashif M. 2012. Detection and characterization of viruses of sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* L.) from Guatemala and Honduras. [Tesis]. University of Helsinki. 72 p.
- Kleczkowski A. 1965. A study of the effects of salt and pH on precipitation of antigen-antibody compounds. *Immunology*. Vol 8: 170-181
- Komoda K, Mawatari N, Hagiwara-Komoda Y, Naito S, Ishikawa M. 2007. Identification of a Ribonucleoprotein Intermediate of Tomato Mosaic Virus RNA Replication Complex Formation. *American Society for Microbiology*. Vol (81). 2584-2591.
- Leninger AL. 1975. *Biochemistry*. In: Leninger AL. *The Molecular Basis of Cell Structure and Function*. 2 ed. New York (USA): Worth Publishers. p. 287-298

- Mattews JC. 1970. Plant Virology. 1ra ed. Academic press, London (United Kingdom): Academic Press Limited; [consultado 2019 julio 15]. https://books.google.hn/books?hl=es&lr=&id=E_RYI9F3YB4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Mattews+1970.+Plant+Virology&ots=hP3THCpERf&sig=laCBXXGB2JU4cKsKqtpZa0cCopc&redir_esc=y#v=onepage&q=Mattews%201970.%20Plant%20Virology&f=false
- Moncayo Palacio EA. 2018. Caracterización molecular, diagnóstico y fitogeografía del potexvirus causante de síntomas de mosaico y manchas cloróticas en plantaciones de babaco (*Vasconcellea × heilbornii*. var. pentagona). [Tesis]. Universidad de las Fuerzas Armada ESPE.
- Moreno LP, Jaramillo ER, Pale JR, Ibáñez JT, Plaza RD, Bustamante RF. 2004. Identificación de virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. [consultado 2018 nov 01]. 22(2), 187-197. eng http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533092017000300591&script=sci_abstract&tlng=pt
- Naidu RA, Hughes JDA. 2003. Methods for the detection of plant virus diseases. In *Proceedings of a conference on Plant Virology in Sub Saharan Africa*. 4-8 June 2001. Ibadan, Nigeria. IITA.
- Orfao A. 2012. Controles de calidad para muestras biológicas. Evaluación de los métodos de control de calidad de ácidos nucleicos mediante electroforesis capilar y electroferogramas. Salamanca, 12 de Noviembre de 2014. Salamanca, España. Banco Nacional de ADN Carlos III- Universidad de Salamanca
- Ortega E, Zambrano K, Carballo O, Romano M, Edgloris M. 2007. Caracterización de un *tobamovirus* aislado de plantas de canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) En una parcela experimental del edo. Aragua, Venezuela. *Interciencia*. Vol (32).202-205.
- Ortiz MID, Mujica JLH. 2015. Los virus, ¿son organismos vivos? Discusión en la formación de profesores de Biología. *VARONA*. (61): 1-7.
- Owens RA, Diener TO. 1984. Spot hybridization for the detection of viroids and viruses. In: Maramorosch K, Koprowski H. *Methods in Virology* Vol. VII. New York (USA): Academic Press. p. 173-189.
- Rodríguez I, Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*; [consultado 2018 nov 01]. 7(3): 323-335. http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press.
- Sim J, Valverde RA, Clark CA. 2000. Whitefly transmission of sweetpotato chlorotic stunt virus. In: Sim J, Valverde RA, Clark CA. *Plant Disease*. (USA). p. 84-1250.
- Tasai JC, Chen TH, Chang CA. 2008. Identification and characterization of a Tomato mosaic virus isolate infecting *Ixora* (*Ixora duffii* cv. 'Super King'). *Plant Path*. Vol (17). 143-155.
- Temay DL, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. Vol. 2. [consultado 2019 ago 23]. 2:70-78. eng. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdisc/ir-2013/ir132d.pdf>
- Urcuqui-Inchima S, Haenni A, Bernadi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*. Vol 74: 157-175.

- Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. 2000. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. 2018 Jan 4. San Diego, CA.
- Velázquez LP, Martínez MD, Romero AC. 2014. Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Vol 1.