



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635



Diseño y validación de iniciadores para la detección molecular del Virus Anular de la Papaya de diferente origen

**Dr. Juan Gabriel Ramírez Pimentel,
Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas**

Email: drjgrp2004@yahoo.com.mx

¹Instituto Tecnológico de Roque

Coautores:

Pedro Oliveros Rosas², Elias Ubias Serafin², Audon Gomez Mendoza², Juan Carlos Raya Pérez¹, Cesar L. Aguirre Mancilla¹, Jorge Covarrubias Prieto¹ y Francisco Chablé Moreno¹

. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas. Celaya, Gto. C.P. 38110

²Instituto Tecnológico de Ciudad Altamirano. Av. Pungarabato pte. S/N. Col. Morelos. Altamirano, Gro. C.P. 40660



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635



Diseño y validación de iniciadores para la detección molecular del Virus Anular de la Papaya de diferente origen

Juan Gabriel Ramírez Pimentel¹, Pedro Oliveros Rosas², Elias Ubias Serafin²,
Audon Gomez Mendoza², Juan Carlos Raya Pérez¹, Cesar L. Aguirre
Mancilla¹, Jorge Covarrubias Prieto¹ y Francisco Chablé Moreno¹

Email: drjgrp2004@yahoo.com.mx

¹Instituto Tecnológico de Roque. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas. Celaya, Gto. C.P. 38110

²Instituto Tecnológico de Ciudad Altamirano. Av. Pungarabato pte. S/N. Col. Morelos.

Altamirano, Gro. C.P. 40660

Resumen

El virus Anular de la Papaya es un retrovirus que afecta gravemente la producción del cultivo, la detección oportuna es crucial para el control de la enfermedad. Para ello se ha utilizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa, acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR), sin embargo los oligonucleótidos iniciadores que se han utilizado estaban basados en una secuencia obtenida desde 1997. Con el avance de las técnicas de secuenciación ahora se dispone de múltiples secuencias obtenidas de diferentes aislados de todo el mundo; en el presente trabajo, se realizó una comparación de secuencias correspondientes al gen de la cápside del virus y se diseñaron oligonucleótidos cuya secuencia está presente en la mayoría de los aislados, reportados en la base de datos del NCBI, por lo que se



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635



espera que sean útiles para la detección del virus, sin importar su origen geográfico.

Abstract

Papaya Ring Spot Virus (PRSV) is an RNA virus, which affects the papaya fruit production; detection on time is determinant for disease control. For this reason, it has been used Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). However, primers used in that reaction were designed since 1997, based on sequences available on that time. With recent advances on sequencing techniques, now are many sequences included in database of the National Center of Biotechnology Information, obtained from isolates from over all the world; in this work, we designed new oligonucleotides as primers directed against capsid protein of PRSV present in different regions, being useful for detecting PRSV without taking care of the place where they were obtained.

Palabras clave: RT-PCR, retrovirus, primers o iniciadores de PCR.

Key words: RT-PCR, RNA virus, PCR primers.

I. Introducción.

El virus Anular de la papaya, PRSV (Papaya Ring Spot Virus) es un retrovirus que afecta la producción de papaya; ha sido responsable de pérdidas de hasta el 85 % de la producción en los estados de Colima, Veracruz y Guerrero (Hernandez, 2003). El principal síntoma es la aparición de manchas en forma de anillo en frutos, hojas y tallos (Figura 1). El virus se transmite a través de áfidos y su control se ha realizado principalmente por prácticas culturales,





“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

como aspersión de aceites, protección con mallas antiáfidos y eliminación de plantas enfermas.

Para la oportuna eliminación de plantas enfermas es necesario contar con un método confiable y eficiente de detección, que además permita la identificación del virus incluso antes de que aparezcan los síntomas.

Fig. 1. Fruto de papaya infectado con PRSV

En la presente investigación, se realizó un análisis de las secuencias del PRSV de distinto origen geográfico y se diseñaron oligonucleótidos para usarse como iniciadores en reacciones RT-PCR que permitan identificar la presencia de distintos aislados del PRSV.

II. Metodología

Se realizó un análisis de secuencias en la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, EEUU) utilizando como criterio de búsqueda, el nombre del virus PRSV, Papaya Ringspot Virus. De igual manera se comparó la secuencia de iniciadores diseñados por Ruiz Castro, 1997. Estos iniciadores estaban dirigidos al gen de la proteína de la cápside; sin embargo, no se encontró homología con la mayoría de las secuencias presentes en la base de datos; por ello se procedió al diseño de un nuevo par de iniciadores, utilizando los criterios estándar de diseño: secuencia entre 17 y 23 nucleótidos, aproximadamente 50% de contenido CG, nula formación de dímeros consigo mismo ni con el otro iniciador, nula o débil formación de estructuras secundarias, temperaturas de alineamiento semejantes y, homología sólo con la secuencia blanco (Sambrook, 2001), que en este caso corresponde a una región conservada



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplingrio

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

del gen la proteína de la cápside del PRSV, presente en aislados de China, India, Brasil, Cuba y México. El producto de PCR a obtener, con estas condiciones es de aproximadamente 200 pares de bases (pb).

La extracción del RNA de tejido de plantas enfermas y sanas se realizó utilizando un buffer de Tris-Urea-Sarkosyl, limpieza con fenol: cloroformo y precipitación con etanol absoluto; se obtuvieron extractos de tejido de hoja, flor y fruto de plantas enfermas y de plantas sanas colectadas en la localidad de Tierra blanca y en el Instituto Tecnológico de Cd. Altamirano, en Cd. Altamirano, Gro.

Posteriormente se realizó transcripción inversa (RT) utilizando el kit de síntesis de cDNA (Protoscript, New England Biolabs™). Para efectos de obtener productos de amplificación por RTPCR y PCR que permitieran la identificación de virus empaquetados y de virus que estuvieran en proceso de replicación, se ensayó utilizar muestras sin eliminar el DNA. La Reacción de PCR se llevó a cabo en termociclador Techne™ (Modelo Techgene FTGENE5D) en volumen de reacción de 50 µL, utilizando enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen™) y con los iniciadores diseñados en el Instituto Tecnológico de Roque VAP5: 5'-ACACCTGATAGAGCTCGTGAACG-3' y VAP3: 5'-CACTGTATGGAGACTCAGAGAAC-3'. El programa utilizado fue el siguiente: 95°C, 3 min; inicio de ciclo, 95°C 1.5min; 53°C, 1.5min; 72°C, 1.5 min; 30 ciclos; 72°C, 5 min; almacenar a 4°C.

Para visualización de los productos de RTPCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.85%, teñido con Bromuro de etidio y se observó en transiluminador UV (UVPTM).

Resultados

La extracción de ácidos nucléicos con el método de urea (Liu, 1995) permitió una buena recuperación de RNA y DNA, en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo la detección (Figura 2).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Se observa que se obtuvo mayor rendimiento de RNA en fruto, menor en hoja y flor. La calidad obtenida no es óptima, ya que no se alcanzan a definir las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales, sin embargo fue suficiente para obtener productos específicos en los ensayos de amplificación. En ensayos para identificar o localizar mRNA de genes vegetales específicos, se requiere que todo el RNA se mantenga íntegro; en este caso, el RNA del virus es más estable y en mayor proporción, por lo que la probabilidad de encontrar las moléculas de su genoma de RNA es mayor y con un extracto de ácidos nucléicos como el obtenido, es posible la oportuna detección.

En el ensayo de RT-PCR, utilizando el par de iniciadores diseñados, se obtuvieron resultados positivos para el tejido de planta enferma correspondiente a hoja y flor, mientras que en el fruto no se logró detectar la banda correspondiente a la amplificación (Figura 3); en las muestras de tejido obtenido de plantas sanas, no se presentó producto de amplificación.

La ausencia de banda en el tejido de fruto pudo deberse a que la muestra ensayada corresponde a la pulpa del fruto, y posiblemente la cantidad de virus es menor o puede haber interferencia de las reacciones con los componentes de la pulpa, tales como carbohidratos y proteínas, incluyendo enzimas líticas. Resta probar si se puede detectar en fruto cuando sólo se utiliza el pericarpo o cáscara, donde es evidente el síntoma ocasionado por el virus.

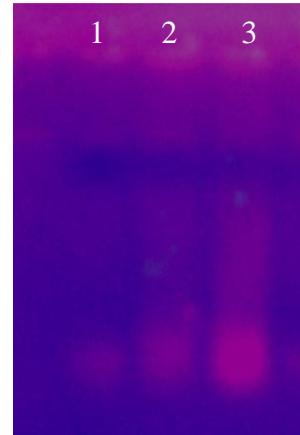
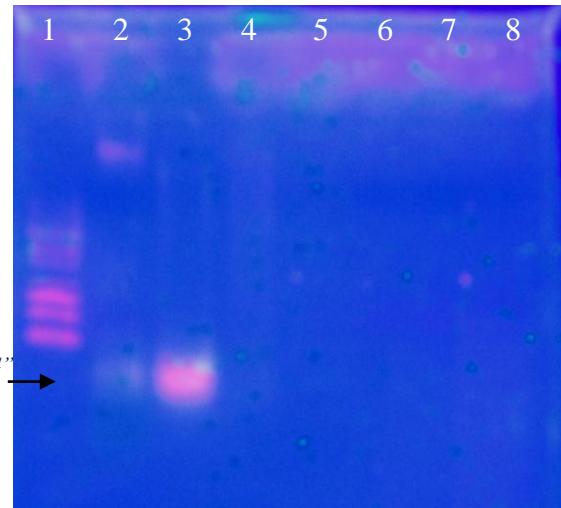


Fig.2. RNA extraído de tejido de 1: hoja, 2: flor y 3: fruto





“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635



La banda obtenida con el uso de los oligonucleótidos diseñados es considerablemente menor a la que se obtiene utilizando los iniciadores previamente descritos; el tamaño obtenido en el presente ensayo es más apropiado para ensayos de detección de manera más eficiente; en estudios con marcadores moleculares basados en PCR, se evidencia la presencia por amplificación de segmentos de 100-300 pb, semejantes a las obtenidas; ésto permite ahorrar tiempo en la ejecución de programas en el termociclador y se incrementa la probabilidad de obtener y clonar los productos de manera contundente.

Fig.3. RT-PCR dirigido a la detección de la proteína de la cápside de PRSV. 1)Marcador de peso molecular 1Kb, 2)hoja infectada, 3) Flor infectada, 4) Fruto infectado, 5) Hoja sana ITCA1, 6) Hoja sana ITCA2, 7)Flor sana ITCA1, 8) Flor sana ITCA2. La flecha indica el tamaño del producto esperado.

IV. Conclusiones

- Se diseñó un nuevo par de oligonucleótidos para utilizarse como iniciadores para ensayos de RT-PCR y qRT-PCR (RT-PCR cuantitativo) en la detección del Virus Anular de la papaya.
- Con el sistema desarrollado se obtiene un fragmento amplificado de aproximadamente 200 pb capaz de detectar PRSV de diferentes aislados reportados en la base de datos de NCBI.
- La detección es efectiva en tejido de hoja y flor.
- La falta de señal en fruto puede deberse a que se utilizó la pulpa y esto acarreó problemas en la reacción.

V. Bibliografia

Hernandez Castro E, Riesta Díaz D, Villanueva Jiménez JA y Mosqueda Vázquez R. 2003. Revista Chapingo. Serie Horticultura):55-68.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635



Liu Y, Mitsukawa, Oosumi and Whittier. 1995. *The Plant Journal* 8:457-463.

Ruiz Castro S. Silva Rosales L. 1997. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
15:86-90.

Sambrook, Russel. 2001. *Molecular Cloning*. 3^a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.