



PROGRAMA ANUAL DE ACTIVIDADES DEL PERSONAL DE CARRERA



2024

El artículo 60 del EPA establece que el personal académico de carrera "...deberá someter oportunamente a la consideración del consejo de la dependencia de su adscripción, el proyecto de actividades de investigación, preparación, estudio y evaluación del curso o cursos que imparten, dirección de tesis o prácticas, aplicación de exámenes, dictado de cursillos y conferencias y demás que pretenda realizar durante el año siguiente".

Datos Generales.

AÑO	2024		
NOMBRE	DE LA TORRE ALMARAZ RODOLFO		
CATEGORÍA	PROFESOR TITULAR C TIEMPO COMPLETO		
CARRERA O DIVISIÓN DE ADSCRIPCIÓN	BIOLOGIA		
ANTIGÜEDAD EN LA UNAM	33	ANTIGÜEDAD EN LA FES IZTACALA	33
ÁREA DE CONOCIMIENTO	METODOLOGIA CIENTIFICA		

Nivel Máximo de Estudios.

LICENCIATURA	BIOLOGIA
MAESTRÍA	MAESTRIA EN CIENCIAS AGRICOLAS.
DOCTORADO	DOCTORADO EN CIENCIAS AGRICOLAS. VIROLOGIA MOLECULAR DE VIRUS FITOPATOGENOS
POSDOCTORADO	LOUISIANA STATE UNIVERSITY. DSRNA PLANT VIRUSES

Solicitudes, permisos, licencias y comisiones del EPA y CCT.

COMISIÓN, LICENCIA, SABÁTICO	FECHA DE INICIO	FECHA DE TÉRMINO
LICENCIA	2024-03-01	2024-03-31

1. FORMACIÓN Y SUPERACIÓN ACADÉMICA

Instrucciones. Señale el número de la o las actividades que programa durante este período.

1.2 Asistencia a Actividades de Superación Académica.

ACTIVIDADES	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS

CURSOS DE ACTUALIZACIÓN O CAPACITACIÓN	1
DIPLOMADOS	2

1.3 Asistencia a Eventos Académicos Especializados.

ACTIVIDADES	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS
CONGRESOS	2

1.4 Certificación y estancias.

ACTIVIDADES	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS
ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN	1
OTRAS RELACIONADAS CON LAS MATERIAS QUE IMPARTE Y/O PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN EL QUE PARTICIPA	3

2.- FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.

2.1 Cursos Curriculares.

GRADO	NÚMERO DE HORAS (semestre 2024-1 07-agosto-23 al 24-noviembre-23)	NÚMERO DE HORAS (semestre 2024-2 29-enero-24 al 24-mayo-24)
LICENCIATURA	15	10

Nota: Los profesores o investigadores de carrera, deberán de impartir como mínimo las horas frente a grupo que se contempla en el art. 61 del EPA para su categoría y nivel.

En el caso de la carrera de Psicología también se tomarán en cuenta las horas de tutoría con aval curricular

2.2 Impartición de cursos no curriculares.

Actividad	NÚMERO DE ACTIVIDADES
OTROS (PROSAP, DGAPA...)	1

2.3 Dirección, Asesoría y Revisión de trabajos de titulación.

GRADO	Director		ASESOR, REVISIÓN O DICTAMINACIÓN
	En proceso	Concluidas	
			Número de actividades programadas

LICENCIATURA	1	2	
DOCTORADO			3

Nota: En el caso de asesorías o dirección de tesis de investigación en proceso sólo serán reconocidas en un período de 2 años para licenciatura, 3 años para maestría y 5 años para doctorado, considerados a partir de la fecha de registro.

2.5 Participación en comités tutorales en el posgrado.

GRADO	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS
DOCTORADO	3

3.- PRODUCTIVIDAD ACADÉMICA.

Nota: Los artículos de investigación deberán ser enviados y publicados en revistas científicas, impresas o electrónicas, nacionales o internacionales, periódicas que cuenten con un comité editorial y de preferencia indexadas.

3.1 Publicaciones.

ACTIVIDADES	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS		
	ENVIADO	ACEPTADO	PUBLICADO
ARTÍCULOS	3		2
LIBROS	2		
PUBLICACIÓN DE ANTOLOGÍAS O MANUALES APLICABLES EN LOS PLANES DE ESTUDIO VIGENTES (EN EL ÁREA DE SU ESPECIALIDAD)	1		

3.2 Ponente en Eventos Académicos.

ACTIVIDADES PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS:	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS	
	NACIONALES	INTERNACIONALES
a. CONGRESOS	1	1

3.3 Elaboración de materiales de apoyo a la docencia.

ACTIVIDADES	NÚMERO DE ACTIVIDADES PROGRAMADAS

ELABORACIÓN DE MATERIAL DIDÁCTICO (AUDIOVISUAL, DIGITAL Y DE LABORATORIO, CON AVAL DE LA JEFATURA DE CARRERA O DIVISIÓN).

3

4. PROTOCOLO(S) DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN.

Protocolo 1

Área de Investigación

BIOLOGICAS, BIOMEDICAS Y QUIMICAS

Línea de Investigación.

VIRUS Y VIROIDES EN ORNAMENTALES EN EL VALLE DE MEXICO

Duración del proyecto.

Fecha de inicio: 01-06-2023

Fecha de término: 28-06-2024

Título del proyecto.

DIAGNOSTICO BIOLOGICO MOLECULAR INTEGRAL DE VIRUS Y VIROIDES EN ESPECIES ORNAMENTALES EN EL ESTADO DE MEXICO

Responsable del proyecto.

DR RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

Corresponsable del proyecto.

Colaboradores del proyecto.

DR HECTOR SALGADO ORTIZ

M EN C DAVID VARGAS ORTIZ

DR JESÚS SANCHEZ NAVARRO

DR VICENTE PALLAS

Resumen del proyecto.

En parcelas y viveros comerciales de producción de especies ornamentales cultivadas en diversas localidades dentro del Municipio de Villa Guerrero, Edo de México, se han observado numerosas plantas con daños como mosaicos, moteados o rayados de color amarillo, manchas anulares, necrosis de flores, tallos, bulbos, cormos, sobrecrecimientos o enanismo, así como deformación severa en plantas ornamentales de corte, maceta o follaje. Sintomas similares se han observado en especies arbustivas o arboles frutales utilizadas como ornamentales en jardines publicos y privados. Los análisis fitopatológicos realizados en el laboratorio del material recolectado en campo, no mostraron que hongos, bacterias o nemátodos estuvieran asociados con estos daños, por lo que se planteo la hipótesis que estos pudieran ser causados por virus, viroides o fitoplasmas (organismos parecidos a bacterias).

Desde hace varios años y utilizando protocolos específicos para el estudio de virus en plantas, hemos demostrado en el Laboratorio de Fitopatología de la FES-Iztacala de la UNAM, del que soy responsable, la naturaleza viral de la mayoría de los daños observados por transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras y diferenciales, detección por serología (ELISA), así como técnicas moleculares como el PAGE (6%) de RNA viral replicativo (dsRNA), ensayos de PCR y RT-PCR para regiones conservadas de diversos Marcos de Lectura Abierta (ORF's) virales los de la proteína del movimiento (MP) o de la cápside (CP) y su posterior secuenciación del tipo Sanger y análisis bioinformático.

Aunque se ha logrado confirmar la identidad de muchos virus ya conocidos, en recientes recorridos por la región y utilizando nuestros protocolos de diagnóstico de diferentes fitopatógenos, principalmente los utilizados para virus, hemos detectadas secuencias de genomas de virus, RNA satélites, virus cripticos y endornavirus, así como retrotransposones, que no se han logrado identificar plenamente, tanto en ornamentales cultivadas tradicionalmente y en otras especies de ornamentales recien introducidas o no evaluadas previamente.

Justificación del proyecto.

En México la floricultura representa una de las actividades agrícolas más rentables, considerando el rendimiento y los beneficios por unidad de superficie sembrada, así como por el alto número de empleos que genera. La floricultura nacional produce especies para

flor de corte, follajes, plantas en bolsa y en maceta, bajo sistemas de producción en invernadero, viveros o a cielo abierto, que abarcan una superficie total de 21, 900 ha., que se ubican en los Aguascalientes, Baja California, Colima, Coahuila, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Sin embargo, la mayor superficie cultivada se concentra en diversos municipios de los estados de México, Puebla, y Morelos (BANCOMEXT, 1994; INDAP, 2002).

La floricultura nacional carece de suficiente apoyo económico y utiliza poca tecnología moderna los que afectan su potencial productivo. Otro factor limitante, son los daños causados por enfermedades inducidas por hongos, bacterias, nematodos, fitoplasmas, virus y viroides, que afectan directamente a las plantas en campo o impiden su comercialización en México o en mercados internacionales por las restricciones sanitarias.

A pesar de que existe información en diversos países sobre los virus que infectan a muchas especies de ornamentales, se desconocen los que regularmente se encuentran en las plantas ornamentales que se cultivan en México o de los posibles virus que pudieran estar siendo introducidos en plantas ornamentales que se han introducido a nuestro país. Para algunos de ellos no se ha desarrollado un método adecuado para su detección por lo que los objetivos del presente trabajo fueron la identificación y caracterización de los virus que infectan naturalmente a las especies de ornamentales cultivadas en la región centro de México. La principal dificultad que existe para la identificación correcta de las especies de virus de plantas es la tecnología que se requiere y que solo se encuentra disponible en laboratorios especializados y aunque algunos métodos son relativamente fáciles de utilizar, como los serológicos, otros requieren cierto nivel de adiestramiento técnico no fácil de adquirir. Otra, muy común, es la infección de mas de un virus en una sola planta y que regularmente alguno de ellos no son detectables con la tecnología disponibles o son totalmente desconocidos para el especialista, lo que dificulta aun mas el diagnóstico de los patógenos relacionados con la enfermedad en la planta de interés.

Objetivos del proyecto.

Determinar la ocurrencia e identidad de virus, y patógenos similares, en especies de ornamentales que se cultivan en la región de Villa Guerrero, mediante protocolos tradicionales para el diagnóstico de virus, así como los moleculares, como la RNASeq y la DNA metagenómica.

OBJETIVOS de trabajo: 1.- Conocer la identidad y diversidad de virus en las especies de ornamentales cultivadas en la region de Villa Guerrero. 2.- Evaluar y validar nuevos métodos de diagnóstico molecular de virus sobretodo en materiales de nuevo ingreso en la región de Villa Guerrero, así como evaluar su impacto en la producción de ornamentales.

Metodología del Proyecto (máximo una cuartilla).

Caracterización Biológica

Recolección de muestras

Para la recolección de material vegetativo de ornamentales se realizaron recorridos en parcelas e instalaciones comerciales productoras de plantas ornamentales (flor y follaje), en diversas localidades del municipio Villa Guerrero, Estado de México, seleccionando y recolectando muestras de plantas con síntomas causados probablemente por virus o patógenos similares, que incluyan mosaicos, clorosis, necrosis, deformaciones foliares, atrofia y enanismo, entre otros síntomas.

Detección y separación de virus y pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales

Hojas de especies con síntomas de probable origen viral, se maceran en un mortero con 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos (0.02 M)-DIECVA 1%, pH 7.0; el extracto se frota con un hisopo de algodón en hojas de plántulas sanas con 2 a 4 hojas verdaderas, previamente espolvoreadas con carborundum. Las hojas inoculadas se lavan someramente con agua corriente para eliminar los residuos del macerado y el carborundum (May, 1985). Las especies de plantas utilizadas para la separación y caracterización de los virus son: quelites (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. y *C. quinoa* Willd), gonfrena (*Gomphrena globosa* L.), toloache (*Datura stramonium* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi, *N. glutinosa* L., *N. rustica* L., *N. benthamiana* Domin., *N. clevelandii* Gray, *N. occidentalis* Wheeler), tomate (*Physalis ixocarpa* B.), pepino (*Cucumber sativus* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.). Las plantas inoculadas se mantienen bajo condiciones de invernadero a temperatura de 25-35 °C, un tiempo variable bajo observación hasta la aparición de síntomas.

Detección serológica por medio de ELISA

La técnica DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) utiliza antisueros específicos comerciales (Adgia, Co) y macerados de hojas con síntomas para detectar infecciones por virus directamente en muestras de campo y de hospedantes indicadoras (Matteoni & Allen, 1989; Sherwood, 1989; Dal Bó et al., 1995).

Algunos de los antisueros comerciales que se utilizarán para la detección de virus son: General de Geminivirus, general para Potyvirus, específicos para Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco bushy stunt virus (TBSV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Pepper mild mottle virus (PMMaV), Tobacco ring spot virus (TRSV), Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco etch virus (TEV), Bean wilt yellow virus (BWYV), Impatiens necrotic spot virus (INSV) y Tobacco spotte wilt virus (TSWV) a una dilución de 1/1000 siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de absorbancia se realiza en un espectrofotómetro Bio-Tek Model EL-309. En cada placa se

utilizan antígenos positivos y negativos, diluidos con la solución amortiguadora de extracción.

El proyecto es financiado por:

EXTERNOS
CONACyT

Metas y productos (**publicaciones**) del Proyecto **esperados para el 2024**: (Especificar, en caso de que las metas y productos sean diferentes para cada uno de los participantes).

Meta 1: Confirmar la identidad biológica y molecular parcial de virus y viroides en plantas ornamentales.

Meta 2 : Caracterizar molecular de virus y viroides por secuenciación nucleotídica de productos de Transcriptómica RNA Seq y DNA Metagenómica.

Meta 3: Confirmar la identidad de virus y viroides en ornamentales por análisis molecular de Transcriptómica (RNA Seq) y DNA Metagenómica.

PRODUCTOS

PRODUCTO 1.- Caracterización Biológica

Recolección de muestras; Detección y separación de virus y viroides por pruebas de susceptibilidad en hospedantes diferenciales; Detección serológica por medio de ELISA.

Detectar y Obtener secuencias completas de los virus conocidos y desconocidos encontrados en plantas ornamentales y determinar la presencia e identidad de virus por Host range, dsRNA, serología.

PRODUCTO 2.- Caracterización Molecular

Validar oligonucleótidos específicos para ensayos de RTPCR. Secuenciar por metodología del tipo Sanger los productos obtenidos de los marcos de lectura abierta (ORF's) de virus, viroides, y otros patógenos detectados en el material de ornamentales recolectado.

PRODUCTO 3.-

Obtener la secuencia de los genomas completos de los virus y otros patógenos presentes en plantas ornamentales.

PRODUCTO 4.-

Analisis Transcriptómico (RNA Seq) y DNA Metagenómico de genomas de virus y viroides en plantas ornamentales.

Protocolo 2

Área de Investigación

BIOLOGICAS, BIOMEDICAS Y QUIMICAS
BIOLOGIA

Línea de Investigación.

VIRUS DE ESPECIES DE ESPECIES DE AGAVE Y OPUNTIA

Duración del proyecto.

Fecha de inicio: 01-01-2024

Fecha de término: 31-12-2027

Título del proyecto.

Responsable del proyecto.

DR RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

Corresponsable del proyecto.

Colaboradores del proyecto.

DR HECTOR SALGADO ORTIZ
MEN C DAVID VARGAS PERALTA
DR JESUS SANCHEZ NAVARRO
DR VICENTE PALLAS

Resumen del proyecto.
<p>Los virus son parásitos celulares estrictos y prácticamente se encuentran en todos los organismos del planeta, por lo tanto, son objeto de un gran interés por causar enfermedades en una amplia variedad de hospederos reales y potenciales. Los virus que afectan a humanos son los más estudiados, por las múltiples enfermedades que causan y que han sido registradas a lo largo de la historia. En los últimos años se han documentado la importancia de los virus no únicamente como patógenos, sino su importancia ecológica, por ejemplo, en la regulación de los ciclos del oxígeno, bióxido de carbono y nitrógeno, o influyendo en la evolución y ciclos biológicos de prácticamente todas las formas de vida del planeta.</p> <p>Por su tamaño ultramicroscópico y composición química, los virus fueron durante muchas años difíciles de conocer, sin embargo el desarrollo tecnológico en los últimos años, ha permitido conocer su estructura, composición química y procesos del metabolismo, desarrollo, genética y celular, en donde los virus se encuentran involucrados en forma directa o indirecta y también ha permitido conocer que los virus son las entidades con la mayor diversidad de especies, superando la diversidad de las bacterias.</p> <p>En la actualidad, son estudiados y conocidos virus que causan pérdidas económicas en plantas de interés agronómico. Sin embargo, son poco estudiados los virus de plantas endémicas en ecosistemas silvestres, que han evolucionado en estos sitios o que son los puntos de diversificación primaria, como son los casos en México del maíz, chile, frijol, tomate y calabaza, domesticadas y utilizadas para cultivo comercial, todas con una gran diversidad de variedades e híbridos, que aún se puede reconocer que siguen evolucionando.</p> <p>Dos grupos de plantas destacan en México por la gran diversidad de especies, los Cactus (Fam: Cactaceae) y los Agaves (Fam: Asparagaceae), ampliamente distribuidas en todo el territorio mexicano.</p> <p>Un territorio en México que se reconoce como el centro de diversificación primaria de las especies ya mencionadas, y también de cactus y agaves es la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, que comprende la parte Oeste y Sur del Estado de Puebla (colindando con los Estados de Veracruz y Oaxaca, respectivamente). En el Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO-FES-IZTACALA-UNAM, se realizó un estudio sobre la etiología de las enfermedades que se reconocieron en la flora silvestre en el Valle de Zapotlán de las salinas. Se identificaron 120 géneros distintos de hongos, (Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes) y algunas bacterias, todas relacionados con los daños observados en diversas especies silvestres. Demostrando que en la Reserva de la Biosfera existe una gran diversidad de microorganismos, la mayoría no identificados a nivel de especie. En el mismo estudio se reconocieron daños que, por sus características, se relacionaron con posibles virus en especies de Cactus (<i>Opuntia</i>, <i>Myrtillocactus</i>, <i>Neobuxbaumia</i>, <i>Stenocereus</i>, y otras) y Agaves (<i>A. Karwinski</i>, <i>A. kerchovei</i>, <i>A. megacantha</i>, <i>A. streptocantha</i>, y otras).</p> <p>Con métodos de diagnóstico molecular aplicados a virus (secuenciación del tipo Sanger de productos de la PCR y RT-PCR, así como RNAseq, DNA metagenómica), se han identificado diversas especies de virus en cultivos de Nopal tunero (<i>Opuntia albicarpa</i>) y nopal verdura (<i>O. ficus-indica</i>) en el Estado de México, así como virus en Agave azul (<i>Agave tequilana</i>) cultivado en el Estado de Jalisco, con síntomas similares a los observados en especies de ambos géneros que crecen en forma natural en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.</p> <p>Las preguntas que se derivaron de estos estudios fueron: ¿Los virus en plantas cultivadas, son especies iguales o distintas a los probables virus en plantas de ambos géneros, que crecen en forma silvestre en la Reserva de la Biosfera?; ¿Tendrán alguna relación filogenética las especies de virus de plantas cultivadas con las especies silvestres?; ¿Los virus de plantas silvestres son los antecesores de los virus en plantas cultivadas?</p> <p>Para contestar estas preguntas se planteó como Objetivo de esta propuesta: Caracterizar molecularmente a los virus de las especies de <i>Opuntia</i> y <i>Agaves</i> de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán.</p> <p>Los métodos por utilizar son los validados en el Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO-FES-IZTACALA-UNAM y aplicados para diversas especies de plantas de interés agronómico conducidos en los últimos años.</p>
Justificación del proyecto.
<p>Diversas especies de virus se han reportado que infectan a plantas silvestres y cultivadas de la familia Cactaceae, como Saguaro cactus virus (SCV. Carmovirus) reportado en <i>Carnegiea gigantea</i> (Milbrath y Nelson, 1972); Tomato spotted wilt virus (TSWS. Tospovirus) reportado en <i>Schlumbergera truncata</i> (Hausbeck y Gildow, 1991); Sammon's <i>Opuntia</i> virus (SOV. Tobamovirus) que infecta regularmente a <i>Opuntia engelmannii</i>, <i>O. vulgaris</i> y <i>O. basilaris</i> (Giri y Chessin, 1975), el Cactus mild mottle virus (CMMoV. Tobamovirus) aislado de <i>Gymnocalycium mihanovichii</i> (Min et al., 2006), y el Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV. Tobamovirus) reportado en <i>Aporcactus flagelliformis</i> (Kim et al., 2012). También se han reportado a Cactus virus X (CVX), Zygocactus virus X (ZyVX), <i>Opuntia</i> virus X (OpVX) y <i>Schlumbergera</i> virus X (SchVX), todos pertenecientes al género Potexvirus, infectando solos o en mezcla a <i>Acanthocereus tetragonus</i>, <i>Hylocereus undatus</i>, <i>Schlumbergera truncata</i>, <i>S. bridgesii</i>, <i>Opuntia tuna</i> y <i>Opuntia cochenillifera</i> (Izaguirre y Marys, 1996; Koenig et al., 2004; Liou et al., 2004; Duarte et al., 2008; Sanches et al., 2015).</p> <p>En <i>Agave azul</i> se han identificado pocas especies de virus en México y en otras partes del Mundo en donde se utilizan como ornato. Las especies descritas incluyen especie del Orden Tymovirale, Fam: Alfaflexiviridae (Generos: Potexvirus-1), Fam: Betaflexiviridae (Genero: Tepovirus y Vitivirus).</p> <p>La comparación de los genomas de los virus identificados, indicó que los virus son específicos en ambas especies de <i>Opuntia</i> e independientes de los virus encontrados en <i>Agave</i> y que solo se encuentran en esta especie. Considerando las observaciones de síntomas de rayado y moteado amarillo en plantas silvestres en plantas de cactaceas, principalmente del genero <i>Opuntia</i>, y agaves, muchas endémicas de la Región de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, se derivaron varias preguntas como resultado de nuestros estudios previos con los observados en plantas cultivadas fueron: ¿Los virus en plantas cultivadas, son especies iguales o distintas a los probables virus en plantas de ambos géneros, que crecen en forma silvestre en la Reserva de la Biosfera?; ¿Tendrán alguna relación filogenética las especies de virus de plantas cultivadas con las especies silvestres?; ¿Los virus de plantas silvestres son los antecesores de los virus en plantas cultivadas?</p> <p>Se estableció como Hipótesis de trabajo, considerando nuestras preguntas y nuestros resultados de otros proyectos en materiales</p>

de Opuntia y Agave cultivadas comercialmente: Los virus en plantas de Opuntia y Agaves cultivadas son iguales y tienen su origen en las plantas de estas especies que son endémicas y que crecen en forma silvestre en la Reserva de la Biosfera Tehuacan-Cuicatlán, de donde se han dispersado a otras especies.

Objetivos del proyecto.

Considerando las observaciones de síntomas de rayado y moteado amarillo en plantas silvestres en plantas de cactáceas, principalmente del género Opuntia, y agaves, muchas endémicas de la Región de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, se derivaron varias preguntas como resultado de nuestros estudios previos con los observados en plantas cultivadas fueron: ¿Los virus en plantas cultivadas, son especies iguales o distintas a los probables virus en plantas de ambos géneros, que crecen en forma silvestre en la Reserva de la Biosfera?; ¿Tendrán alguna relación filogenética las especies de virus de plantas cultivadas con las especies silvestres?; ¿Los virus de plantas silvestres son los antecesores de los virus en plantas cultivadas?

Para contestar estas preguntas se planteó como OBJETIVO de esta propuesta: Caracterizar molecularmente a los virus de las especies de Opuntia y Agaves endémicos de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán.

Metodología del Proyecto (máximo una cuartilla).

Recolección de material

Se recolectarán plantas de Opuntia y Agave silvestres de la Reserva de Tehuacan-Cuicatlán. El material recolectado se trasladará al laboratorio de Fitopatología de la UBIRPO-FES-IZTACALA.UNAM su análisis. Transmisión de virus a plantas indicadoras y diferenciales

Con macerados de porciones de plantas con síntomas se realizarán ensayos de transmisión mecánica por abrasión a plantas indicadoras y después a plantas diferenciales, para aislar el o los virus de las plantas de Opuntia y Agave. También se harán injertos de plantas enfermas a plantas sanas para transmisión de virus. Detección serológica de proteína viral ELISA

Se utilizará la técnica de análisis inmunoenzimático de doble sándwich (DAS-ELISA), para desarrollar en dos días (Clark y Adams, 1977), con el fin de detectar infecciones virales directamente en muestras de campo. Se utilizarán antisueros policlonales comerciales disponibles en el Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO, del que soy responsable. La absorbencia de las posibles reacciones antígeno-anticuerpo se registrará en un micro lector a 492 nm, a los 20 y 60 minutos después de la adición del sustrato. La reacción será considerada positiva si la absorbencia es igual o superior a la lectura del testigo positivo para los virus (Clark y Adams, 1977). Extracción y análisis electroforéticos RNAdc de origen viral.

Se realizará la extracción y análisis del RNA-dc viral a partir de pencas de agave azul con síntomas de rayado amarillo. El RNA-dc se analizará por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, usando un mini gel (1.75mm x 7cm x 8cm) montado en una cámara Biorad doble. El volumen del extracto de RNA-dc viral de las muestras será de 30 µL por carril. Se incluirán marcadores de peso molecular de los componentes virales, muestras de RNA-dc de Cucumber mosaic virus para determinar el peso molecular de los componentes de los supuestos virus separados de agave azul. Las condiciones de electroforesis serán a 100 volts por 2:30 hrs. a temperatura ambiente. Los geles serán teñidos con solución de nitrato de plata (0.011 M) (Valverde et al., 1990).

Detección de virus por transcripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

La RT-PCR se efectuará en un solo paso (RT-PCR Access, Promega. USA) usando RNA-dc obtenido de plantas con síntomas de rayado amarillo descrito, utilizando distintos pares de oligonucleótidos degenerados, que amplifican diferentes segmentos del genoma de distintos grupos de virus en plantas (Mackenzie et al., 1997; James y Upton, 1999; Saade et al., 2000).

Detección de virus en plantas de Opuntia y Agave por ensayos multiplex RT-PCR.

Con las secuencias de los ORF's de los virus detectados se validarán, oligonucleótidos para realizar ensayos multiplex RTPCR y detectar en una sola reacción de los virus de agave azul.

Secuenciación directa, análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral consecuencias disponibles en el Genbank.

Los productos de la RT-PCR del tamaño esperado se separarán de los geles de agarosa y se purificarán utilizando el kit Wizard (PROMEGA, USA). Las secuencias de nucleótidos se obtendrán utilizando el secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Sanger et al., 1977). Las secuencias de mejor calidad se depositarán en el GenBank/NCBI y se compararán con las disponibles en la misma base de datos por medio de BLAST (Altschul et al., 1997).

Clonación de productos de la RTPCR.

Se obtendrán clonas de los productos de la rt-PCR de los virus detectados en las muestras de Opuntia y Agave silvestres.

Los productos de la rt-PCR se clonaran en la E. coli cepa DH5α utilizando el vector pTZ57R (Invitrogen PCR, Fermentas). Los productos clonados serán analizados en un secuenciador Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaran por complementación y comparadas para su

26/07/2023 11:17 Página núm. 15

PAPIIT

identificación con secuencias disponibles de otras partes del mundo en la base de datos del GenBank, utilizando el método Clustal (MegAlign, DNA Star software, Madison, WI) (Sanger et al., 1977).

Hibridación molecular con sondas Digoxigenina fluorescente no radiactiva.

Con fragmentos clonados de la CP de los diferentes virus identificados en agave azul se elaboraran sondas marcadas con Digoxigenina fluorescente no radiactiva (Dig-UTP-T7 fluorescent) para la detección por hibridación en un solo paso de los virus en agave azul. Para detectar la presencia de los diferentes virus se realizará la hibridación molecular del tipo Dot-blot y las sondas.

Para el ensayo Dot-blot, el RNA de las muestras será previamente desnaturizado para ser transferido directamente a membranas de Nylon (+) y posteriormente ser fijado mediante exposición a luz ultravioleta. Las membranas serán pre-hibridadas e hibridadas a

65 °C usando la sonda respectiva. En condiciones de hibridación, esta sonda marcada se hibridará a cualquier hebra de ácido nucleico complementaria fijada a la membrana. Cualquier exceso de sonda no hibridada se eliminará por lavados y los híbridos marcados se detectarán mediante autorradiografía (Surzycki, 1999; Sambrook et al., 1989; Sambrook y Russell, 2001).

Transcriptómica o RNA Seq de virus de muestras de Agave.

Se realizará la Transcriptómica o RNA Seq de muestras de Opuntia y Agave silvestres con posibles virus, utilizando como templado los ácidos nucleicos obtenidos por el método de RNATrizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA-UNAM, (UUSMD) en el Instituto de Biotecnología (IBT) UNAM, campus Cuernavaca, Morelos, por extremos pareados (paired-end), con un tamaño de biblioteca de 300 pb, y tamaño de lecturas (reads) de 75 pb (Wang et al., 2009), con la plataforma ILLUMINA Next-seq 500. Los datos obtenidos (lecturas o reads) se analizarán por comparación con genomas completos (Mapeo) de virus obtenidos del GenBank (NCBI), utilizando el software SMALT (Wellcome Trust Sanger Institute, Genome Research Limited). Se realizarán ensambles de novo, con el software Trinity que hace uso de gráficas de Bruijn (Haas et al., 2013) para el armado de contigs más grandes que analizados mediante BLASTX (Altschul et al. 1997) permitirá la búsqueda de otros virus. Se construirán árboles filogenéticos por máxima verosimilitud, con los genes RdRp, TGB y CP, de los genomas virales obtenidos por Transcriptómica. Para generar los árboles se usará el software MEGA 6 (Tamura et al., 2016).

Diseño y evaluación de oligonucleótidos para la secuenciación y clonación del genoma total de los virus de Opuntia y Agave silvestres

A partir del análisis Transcriptómico o RNA Seq y de acuerdo con las secuencias de virus identificadas, y con el fin obtener el genoma completo de los virus encontrados en agave azul, se diseñarán y validarán oligonucleótidos específicos de los ORF's, para obtener productos de la RTPCR clonarlos, secuenciarlos, ensamblarlos y obtener el genoma completo de los virus en agave azul y compararlos con los ensambles de las secuencias de la RNA Seq. Esta actividad se realizará en el Laboratorio de Virología Molecular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Cuantificación de carga viral de los diferentes virus por PCR en Tiempo Real.

Con el objeto de determinar si la remisión de síntomas de rayado amarillo en agave azul está determinado por la carga viral, se llevarán experimentos de carga viral utilizando la PCR en tiempo Real, utilizando plantas de agave con rayado amarillo de diferente edad.

Análisis Bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

Se realizará el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas por los métodos de Sanger y RNASeq que se obtendrán en el Laboratorio de Genómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca Morelos. Se cuenta con los programas adecuados para analizar la información obtenida.

El proyecto es financiado por:

UNAM
PAPIIT

Metas y productos (**publicaciones**) del Proyecto **esperados para el 2024**: (Especificar, en caso de que las metas y productos sean diferentes para cada uno de los participantes).

1.- Separar e identificar la identidad de los virus encontrados en especies de Opuntia y Agave silvestres por Transmisión mecánica a plantas indicadoras y diferenciales.

Se cuenta con semillas libres de virus de especies herbaceas utilizadas regularmente para demostrar la transmisibilidad y el rango de hospederas de virus.

Con el mismo proceso, pueden separarse en forma individual a virus que se encuentran en mezcla en los hospederos originales.

2.- Detección serológica por análisis inmunoenzimático de doble sándwich (DAS-ELISA) de proteína de la capsid de los virus de Opuntia y Agave silvestres.

Se utilizarán estuches comerciales de pruebas serológicas de detección de virus. Se cuenta con el equipo, reactivos y experiencia para realizar este tipo de pruebas en el laboratorio.

3.- Analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida el RNA-dc viral replicativo específico de los virus que infectan a plantas de Opuntia y Agave silvestres.

Se cuenta con el equipo, reactivos y experiencia para realizar esta prueba. Los perfiles de RNA-dc son utilizados para identificar a virus por el perfil del genoma que muestran en este tipo de análisis. Los extractos de RNA-dc pueden utilizarse para realizar ensayos de RT-PCR y clonación de los fragmentos obtenidos.

4.- Detección de virus en Opuntia y Agave silvestres con síntomas de rayado amarillo por ensayos de RT-PCR punto final.

Se cuenta con el equipo, reactivos y experiencia suficiente para realizar ensayos de RTPCR, PCR y secuenciación nucleotídica de los productos de las reacciones de amplificación.

SEGUNDO AÑO

5.- Clonación de productos de las reacciones de RTPCR de virus en plantas de Opuntia y Agave.

Se cuenta con la experiencia para realizar esta actividad en el Laboratorio, aunque se llevará a cabo en un 80% en el Laboratorio de Virología Molecular en el IBMCP de la Universidad de Valencia, en donde se han establecido varios proyectos de colaboración.

6.- Clonación y secuenciación del genoma completo de los virus de Opuntia y Agave con síntomas de rayado amarillo.

Se cuenta con la experiencia para realizar esta actividad en el Laboratorio, aunque se llevará a cabo en un 80% en el Laboratorio de Virología Molecular en el IBMCP de la Universidad de Valencia, en donde se han establecido varios proyectos de colaboración.

7.- Determinar la carga viral de los virus identificados en Opuntia y Agave mediante ensayos de Q-RTPCR

Se diseñarán oligonucleótidos específicos para realizar ensayos de Q-RTPCR y determinar la carga viral de cada virus en infecciones en mezcla. Se cuenta con la experiencia para el diseño de los oligonucleótidos específicos para la Q-RTPCR. El equipo se encuentra en las instalaciones del Laboratorio de Virología Molecular del IBMCP de la Universidad de Valencia, España.



Vo. Bo. Jefe(a) de Módulo, Asignatura o Área

Nombre _____ Firma _____

Nombre _____ Firma _____

Nombre del Profesor(a) _____ DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ _____ Firma **Recomendación del CAAx:** Satisfactorio () Insatisfactorio ()

Nombre _____ Firma _____

Nombre _____ Firma _____

Comentarios del CAAx al Consejo Técnico:**H. Consejo Técnico: Dictamen** _____

Nombre _____ Firma _____

Nombre _____ Firma _____

OBSERVACIONES: