



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

TÍTULO DEL PROYECTO

“EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN
TEJIDO FOLIAR DE PLÁTANO (*MUSA PARADISIACA L.*) PARA LA DETECCIÓN
DE VIRUS”

PRESENTADOR DEL SERVICIO SOCIAL:

C. JESUS EUSEBIO ARAUZ ALCUDIA
2192029755

ASESOR INTERNO

DR. SALVADOR HERNÁNDEZ MORENO (N°ECONÓMICO-43756)

ASESOR EXTERNO

M. en C. JOSÉ MANUEL CAMBRÓN CRISANTOS (CÉDULA PROFESIONAL-
8128334)

LUGAR DE REALIZACIÓN

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA, DIRECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA
FITOSANITARIA, LABORATORIO DE VIROLOGÍA, CARRETERA FEDERAL
MÉXICO-PACHUCA KM 37.5, TECÁMAC, 55740 MÉX.

FECHA DE INICIO Y TÉRMINO DE LA PRESTACIÓN

02 DE MAYO AL 04 DE NOVIEMBRE DE 2024

ÍNDICE

1.	Introducción.....	3
2.	Justificación	3
3.	Aporte a la sociedad.....	5
4.	Objetivos.....	5
4.1	Objetivo general.....	5
4.2	Objetivos particulares	5
5.	Marco teórico	5
5.1	Plátano	5
5.2	Fenología del cultivo (Vargas <i>et al.</i> , 2017).....	6
5.3	México y el plátano	6
5.4	Virus.....	7
5.4.1	Características generales de los virus.....	7
5.4.2	Ciclo biológico	8
5.4.3	Virus del plátano	9
5.5	Técnicas moleculares	9
5.6	Extracción de ácidos nucleicos.....	10
5.6.1	Cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos (Salazar <i>et al.</i> , 2013).	10
5.6.2	Método de extracción: CTAB 2%.....	12
5.6.3	Método de extracción: TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738)	12
5.6.4	Método de extracción: kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784)	12
5.7	Técnica PCR.....	12
5.7.1	RT-PCR.....	14
5.8	Gen 18s	14
5.9	Electroforesis	15
6.	Metodología	16
6.1	Descripción de actividades	17
6.2	Descripción de métodos a desarrollar.....	18
6.2.1.1	CTAB 2%	18
6.2.1.2	TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738)	18
6.2.1.3	Kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784)....	19
6.2.2	RT-PCR y PCR.....	22
6.2.3	Electroforesis.....	23
7.	Bibliografía.....	24
8.	Anexos	26

1. Introducción

El cultivo de plátano en México de acuerdo con la SADER (2020) es la fruta tropical más cultivada en el país, con una producción anual de más de 2 millones de toneladas permitiendo su disponibilidad todo el año, esto lo convierte en cultivo clave para la seguridad alimentaria del país y subsistencia de productores agrícolas, es por lo anterior, que prevenir la introducción y diseminación de plagas que afecten estos productos vegetales resulta de suma importancia para el país. Para esto se realizan acciones estratégicas por parte de diversas organizaciones y dependencias federal, una de ellas es la Subdirección de diagnóstico fitosanitario del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, que tiene la misión realizar actividades de ensayo para la oportuna identificación y diagnóstico de plagas, con infraestructura y tecnología de punta que permite realizar pruebas mediante métodos y técnicas de última generación (SENASICA, 2024). Existen diversos métodos para la detección de agentes patógenos, de estos las técnicas moleculares son de las más empleadas por su sensibilidad, especificidad y rapidez, permitiendo la identificación del material genético del patógeno, permitiendo así un diagnóstico oportuno para la mejor toma de decisiones (Mellado, 2020). El desarrollo de toda técnica molecular inicia con la extracción de ácidos nucleicos, la cual consiste en un aislamiento y purificación de moléculas de ARN o ADN, con la finalidad de obtener cantidades, purezas y la integridad suficiente de ácidos nucleicos adecuados, esto garantiza la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula (para la realización de una PCR) (Velázquez *et al.*, 2014). En la actualidad existen distintos tipos de protocolos de extracción desde los convencionales hasta kits comerciales que quieren mejorar los procesos, buscando siempre cantidad, pureza e integridad, es por lo anterior, que el presente trabajo se evaluarán tres diferentes metodologías de extracción de ácidos nucleicos: CTAB al 2%, TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738) y el kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784) siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones, en el cual se evaluará la concentración (ng/μl) y pureza de los ácidos nucleicos (Relación de absorbancia (260/280 y 260/230) extraídos del tejido foliar; para determinar cuál de los métodos evaluados es la mejor opción para la detección de virus a partir de tejido foliar de plátano.

2. Justificación

El Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, forma parte del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, es un órgano especializado en realizar actividades de ensayo para la oportuna identificación y diagnóstico de plagas, mediante diferentes métodos y técnicas en sus distintos laboratorios, logrando así mantener el estatus fitosanitario del país (SENASICA, 2023). El laboratorio de Virología realiza el diagnóstico de virus y viroides fitopatógenos de

importancia cuarentenaria y económica, empleando diversas técnicas moleculares, por lo anterior el proyecto de servicio social se realizará en este laboratorio.

De acuerdo con el plan de estudios de la Licenciatura en Agronomía las actividades a desarrollar por parte de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria se vinculan principalmente con los módulos:

1. Interacciones bióticas en los sistemas agrícolas: Cuyo objetivo es que el alumno sea capaz de *“identificar y analizar el efecto de las interacciones bióticas en los sistemas agrícolas, aplicando metodologías de diagnóstico para evaluación de su impacto en la producción”*; en relación a lo anterior un virus se define como un microorganismo infeccioso que consta de un segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) rodeado por una cubierta proteica y que tiene la necesidad de usar componentes de la célula hospedante para su replicación (NIH,2024), estos agentes reducen y afectan la calidad de la producción agrícola, por diversos síntomas que presenta el huésped desde manchas, deformaciones, necrosis en hojas y frutos, enanismo de planta, entre otros, y en ocasiones provocando la muerte de la planta (CIQA, 2023).
2. Estrategias para la protección vegetal de los sistemas agrícolas: El objetivo es *“analizar la protección vegetal como parte de las interacciones entre las plantas cultivadas y el ambiente que afecta su productividad y rendimiento, desarrollar y aplicar estrategias en prevención y protección vegetal, mediante el manejo integrado de plagas”*. Las estrategias tomadas a nivel nacional para la prevención y protección vegetal de enfermedades, es la realización de diagnósticos moleculares a través de técnicas como la PCR, electroforesis y secuenciación que gracias a su sensibilidad, especificidad y rapidez permiten identificar la presencia o ausencia de un patógeno, el primer paso para implementar una técnica de diagnóstico molecular es la extracción de ácidos nucleicos de una muestra biológica específica que sea sospechosa de hospedar al patógeno o simplemente como una medida de vigilancia y verificación al momento de importación o exportación de material vegetal de interés. Para emitir un diagnóstico más rápido se tienen que contar con protocolos de extracción eficientes, ágiles y confiables que permitan brindar certeza a las áreas tomadoras de decisiones y a los interesados (CNRF, 2017).

Los conocimientos adquiridos en los módulos antes mencionados y junto con los nuevos adquiridos a lo largo de la presentación del servicio social me permitirán, conocer e identificar las generalidades de virus fitopatógenos, su forma de interacción planta-patógeno, desarrollare conocimiento sólido para una buena identificación y monitoreo de virus fitopatógenos y de sus vectores que en su mayoría son insectos, como consecuencia tener los fundamentos para un buen control de plagas relacionados a estos. Por otra parte, conocer de forma teórica-práctica cuáles son las diversas técnicas moleculares al momento de un diagnóstico molecular, y los pasos a desarrollar en cada una de ellas, desde la extracción de ácidos nucleicos, que nos permitirán realizar una PCR y sus variantes y a su vez una

electroforesis, pudiendo evaluar diversos protocolos para la elección del más idóneo al momento de una extracción de ácidos nucleicos.

3. Aporte a la sociedad

Lo que nos dice Sozzani (2007) es que *“el servicio social, más que requisito, debe ser considerado como una práctica que contribuye tanto a la formación profesional del estudiante, como al desarrollo de la educación superior y a la vinculación con las necesidades de la sociedad en su conjunto”*; por lo cual, durante esta práctica se desarrollaran y reafirman diversas actitudes y aptitudes del presentador, desde una perspectiva de solidaridad y compromiso del bienestar colectivo, integración, desarrollo y práctica del conocimiento y trabajo interdisciplinario, para poder ser un profesionista que retribuya socialmente de manera positiva. Por lo anterior, el presente trabajo de servicio social titulado *“Extracción de ácidos nucleicos de tejido foliar de plátano (*Musa paradisiaca* L.) para la detección de virus”* busca dar continuidad a una de las actividades que realiza el laboratorio, evaluando diferentes métodos de extracción, así mismo hablar de la importancia del plátano en México y de la oportuna detección de virus fitopatógenos, para garantizar la sanidad vegetal a nivel nacional de dicho cultivo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar tres protocolos de extracción de ácidos nucleicos para la detección de virus en tejido foliar de plátano.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar concentración y pureza de los ácidos nucleicos extraídos del tejido foliar
- Determinar cuál es el mejor método de extracción para detectar virus
- Verificar la funcionalidad de los ácidos nucleicos mediante la amplificación del gen endógeno 18 S ribosomal por RT-PCR y PCR

5. Marco teórico

5.1 Plátano

El plátano (*Musa paradisiaca* L.), conocido en forma general con el término de *“bananas”*, pertenecen al grupo de las Monocotiledóneas, orden Escitamiéneas, familia de las Musáceas, es un arbusto monocotiledóneo perenne, que alcanza alturas de hasta 7 metros. Es una planta de consistencia herbácea y estolonífera que posee un tallo subterráneo: rizoma, corto o cono basal en donde se almacenan los elementos nutritivos elaborados por las hojas, tiene un pseudotallo o vaina formada por las cortezas de las hojas enrolladas y adheridas unas sobre las otras (Rosales, 2008).

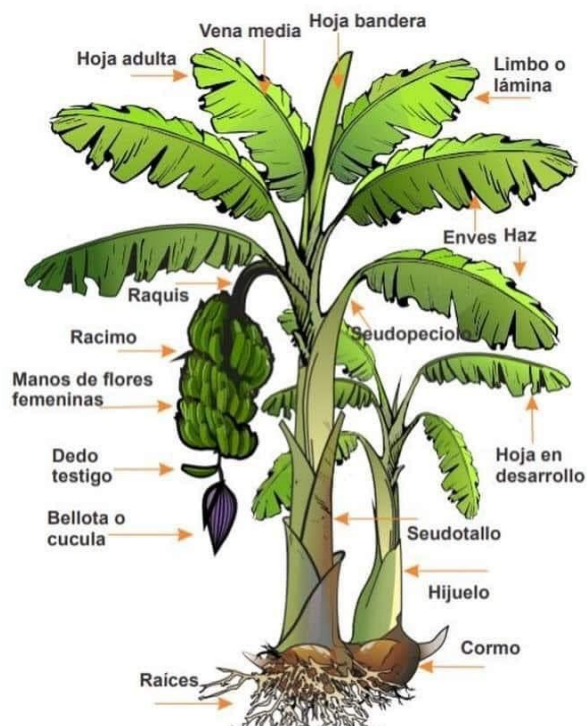


Figura 1. *Morfología del plátano*. Tomado de (Chilig y Chiluisa, 2015).

5.2 Fenología del cultivo (Vargas *et al.*, 2017)

1 Fase infantil:

- Inicia con la germinación del cormo o la aparición de los retoños.
- Los retoños (hijos) alcanzan una altura promedio de 50 cm a los tres meses.
- Termina con el desarrollo de la hoja F10, que tiene un ancho de 10 cm, marcando la independencia del hijo.
- Duración: aproximadamente 104 días.

2 Fase juvenil:

- Comienza después de la hoja F10, considerada un indicador del crecimiento.
- Culmina con la aparición de la hoja Fm, primera hoja con dimensiones similares a la planta madre.
- La hoja Fm puede aparecer entre las hojas 13 y 20, dependiendo del desarrollo, y marca el inicio de la fase autónoma.
- Duración: aproximadamente 91 días.

3 Fase reproductiva:

- Inicia con la aparición de la hoja Fm, que también marca el comienzo de la diferenciación floral.
- Se subdivide en:
 - Fm10 a F (floración): dura alrededor de 125 días.
 - F a C (cosecha): dura aproximadamente 84 días.

5.3 México y el plátano

El plátano es la fruta tropical más cultivada en México y una de las cuatro más importantes a nivel mundial, su producción anual es de más de 2 millones de toneladas, lo que permite disfrutar de él durante todo el año, el plátano destaca por su contenido de hidratos de carbono, por lo que su valor calórico es elevado; los nutrientes más representativos del plátano son el potasio, el magnesio, el ácido fólico y sustancias de acción astringente, por tal motivo es un cultivo clave en la seguridad alimentaria del país (SADER, 2020).

5.4 Virus

Un virus es un microorganismo infeccioso que consta de un segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) rodeado por una cubierta proteica. Un virus no puede replicarse solo; por el contrario, debe infectar a las células y usar componentes de la célula huésped para fabricar copias de sí mismo. Con frecuencia, un virus termina matando la célula huésped en el proceso, lo que causa daño en el organismo huésped (NIH, 2024).

5.4.1 Características generales de los virus

Todos los virus de plantas constan de al menos una cadena de ácido nucleico (ya sea DNA o RNA, nunca los dos juntos) y una o más proteínas, codificadas por el ácido nucleico, que forman una capa protectora llamada cápside (cápsida o cubierta). Muchos virus tienen un solo tipo de proteína que mediante subunidades repetitivas configura la cápside, pero en algunos casos esta contiene hasta 7 proteínas diferentes. Algunos virus de plantas tienen una segunda capa de proteínas, mientras que otros adquieren una membrana lipoproteica a partir de la célula huésped, formando una envoltura. De ahí que se encuentren lípidos o carbohidratos en la composición viral. A la partícula viral completa se le denomina virión. Al conjunto del ácido nucleico más la capa protectora de proteínas de la cápside se denomina nucleocápside. Esta puede tener dos tipos principales de simetría: isométrica (icosaédrica principalmente), en los llamados virus esféricos, o helicoidal, en los virus alargados (Ayllon, 2018).

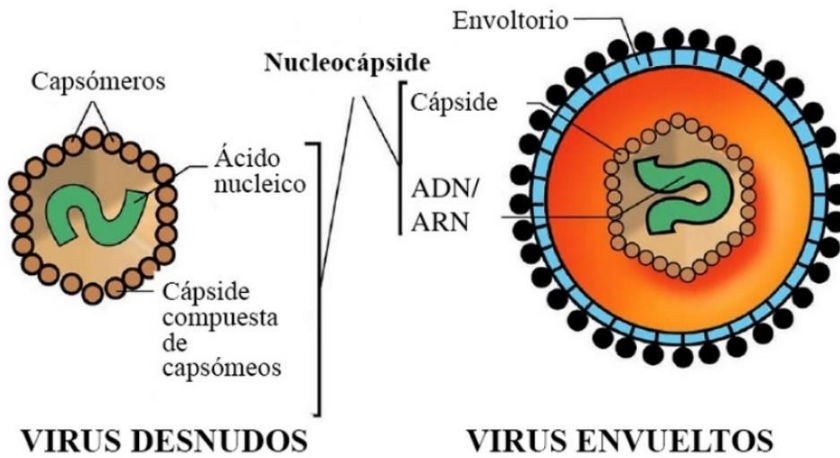


Figura 2. Estructuras de los virus. Tomado de (airtecnic, s.f).

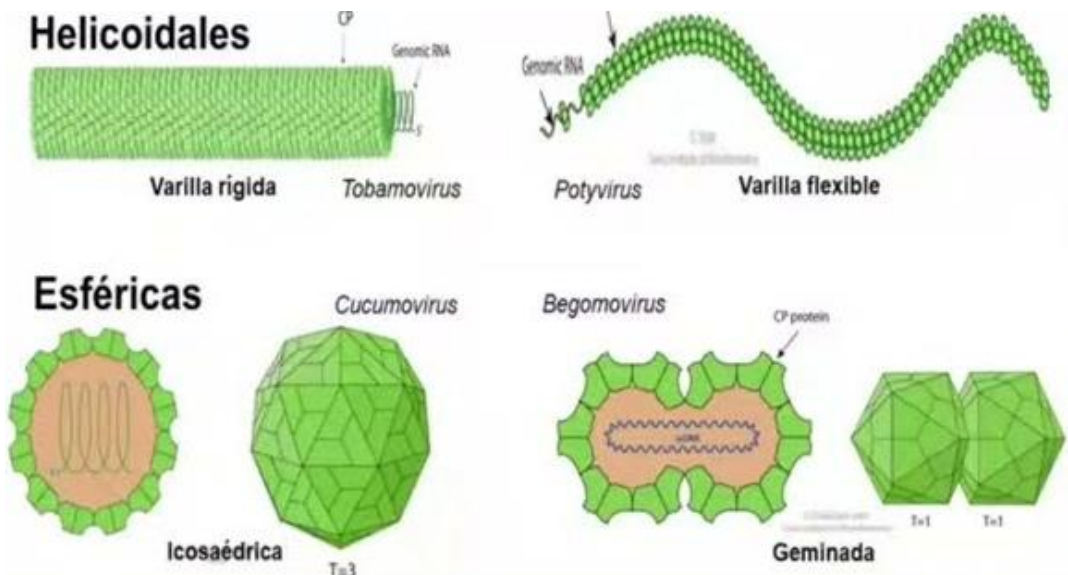


Figura 3. Formas de los virus. Tomado de (Agrocultivos Tv, 2023).

5.4.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico de los virus está dado por la replicación en el hospedante, la replicación es el proceso celular que permite la amplificación del ácido nucleico genómico del virus. La inoculación de un virus en una planta sana implica franquear la pared celular y que el virus entre en el citoplasma. La multiplicación viral ocurre inicialmente en la célula o células infectadas, para luego moverse a células vecinas por un proceso diferente al de la inoculación (Ayllon, 2018).

Aunque cada tipo de virus es diferente, tanto en estructura como en composición, los ciclos replicativos de todos ellos coinciden (Figura 4), de acuerdo con su ciclo replicativo el

mecanismo de replicación varía dependiendo del tipo de genoma viral. En todos los casos, los virus utilizan la maquinaria de replicación de la célula hospedante.

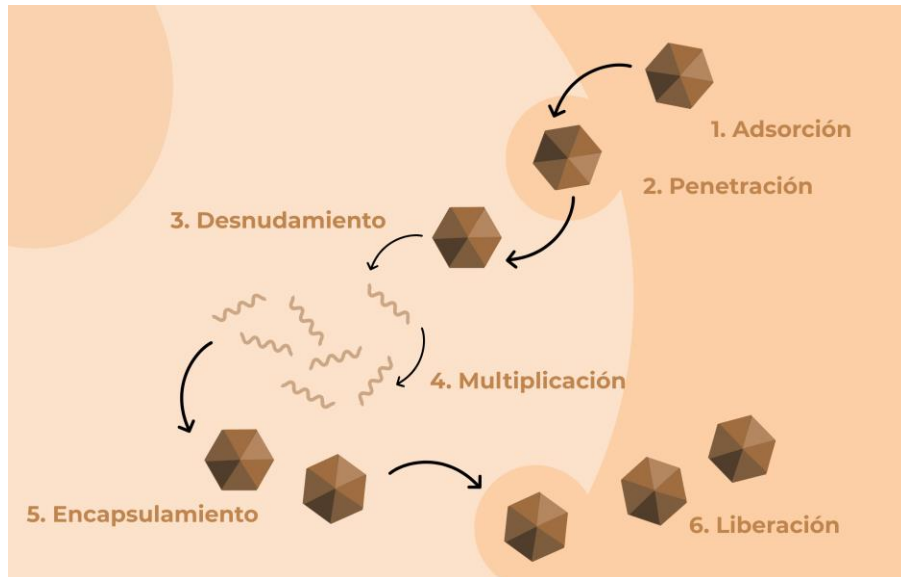


Figura 4. Modo de replicación de los virus. Tomada de (genotipia, s.f).

5.4.3 Virus del plátano

Las diseminaciones de los virus de plátano se han visto relacionado con la distribución de germoplasma (hijuelos, cormos, etc.), principalmente de musáceas nativas del Sureste a nuevas zonas agrícolas (América Latina y el Caribe) (Manzo *et al.*, 2014). Los principales virus de importancia cuarentenaria y económica que enfrenta el cultivo del plátano en México y en otros países principalmente en América Latina son:

- Virus del bunchy top (BTV) ahora *Babuvirus del abacá* (ICTV, 2023).
- Virus del mosaico de la bráctea (BBrMV) ahora *Potyvirus de las mus* (ICVT,2023).
- Virus del estriado del plátano (BSV) ahora *Badnavirus gammavirgamusae* (ICVT,2023).
- Virus del mosaico del plátano (BMV) ahora *Cucumovirus* (ICVT,2023).

Estos virus se consideran que pueden llegar a ocasionar un colapso a la industria bananera de México, sino se llevan a cabo adecuadamente las medidas fitosanitarias y un manejo integrado (Manzo *et al.*, 2014).

5.5 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar, e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie y

genes de resistencia al tratamiento farmacológico. Todas estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior (Diz, 2020).

5.6 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN, ARN o ambas aislándose del resto de los componentes celulares, como lípidos y proteínas, más abundantes que los ácidos nucleicos (Salazar *et al.*, 2013). La extracción de ácidos nucleicos es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Los métodos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares. Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K), incluso se suelen utilizar kits comerciales que incluyen el protocolo específico para la extracción (Mellado, 2020).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Velázquez *et al.*, 2014).

5.6.1 Cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos (Salazar *et al.*, 2013).

- **Cuantificación de ácidos nucleicos**

Existen dos métodos principales para cuantificar ácidos nucleicos: espectrofotometría y fluorometría. **La espectrofotometría**, se basa en la capacidad de las moléculas suspendidas en solución para absorber un haz de luz. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) tienen una máxima absorción de luz UV a 260 nm, lo que permite determinar su concentración mediante espectrofotómetros.

1. Un haz de luz atraviesa la muestra en la celda del espectrofotómetro.
2. Un fotodetector mide la cantidad de luz absorbida (densidad óptica o OD).
3. La absorbancia es proporcional a la concentración de ácidos nucleicos:

- Mayor absorbancia = Mayor concentración.

El espectrofotómetro NanoDrop™ permite lecturas directas con volúmenes mínimos (1-2 µl), eliminando la necesidad de diluciones y simplificando el procedimiento. Este método es ampliamente utilizado debido a su precisión y facilidad para calcular concentraciones de ácidos nucleicos en solución.

- **Pureza**

La extracción de ácidos nucleicos no elimina completamente proteínas, solventes y otros contaminantes. Estos pueden afectar las aplicaciones posteriores del ácido nucleico, por lo que su pureza se evalúa midiendo la absorción de luz a diferentes longitudes de onda.

Índice 260/280 (contaminación con proteínas):

Este índice determina la pureza respecto a proteínas, ya que estas absorben luz a 280 nm. Los valores que se consideran óptimos:

- Para ADN: entre 1.8 y 2.0.
- Para ARN: alrededor de 2.0.

Si el valor es <1.8, se considera que hay una alta contaminación con proteínas; se recomienda repetir la extracción.

Si el valor es <2.0: Indica rotura de cadenas de ácido nucleico; la calidad es insuficiente y se requiere una nueva extracción.

Sin embargo, este índice no es infalible debido a que existen factores que afectan el índice, como el pH del medio: Un medio ácido puede disminuir el índice, mientras que un medio básico lo aumenta, o la composición de nucleótidos libres: El ARN suele mostrar valores mayores debido al contenido de uracilos, en contraste con el ADN que contiene timinas. Aun así, es una herramienta clave para estimar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Contaminación con fenol y sales: Índice 260/230

El índice 260/230 evalúa la pureza de ácidos nucleicos respecto a contaminantes como fenol, tiocianatos, péptidos y compuestos aromáticos que absorben luz UV a 230 nm. Los valores óptimos para muestras puras deben presentar un índice entre 2.0 y 2.2.

Si el Índice es menor a 2.0, indica presencia de contaminantes como EDTA, carbohidratos o fenol. Existen reactivos como el TriZol™, usado en la extracción de ARN, que al ser una solución fenólica que absorbe a 230 nm y 270 nm, puede afectar el índice y sugerir contaminación residual. Un índice 260/230 fuera del rango ideal indica la necesidad de un paso adicional de purificación.

5.6.2 Método de extracción: CTAB 2%

Este método de extracción se emplea en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, modificado y estandarizado por él, en si el CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran longitud, con actividad detergente. Sus usos incluyen la utilización como solución *tamponante para la extracción de ADN*. El CTAB es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Por esta razón es especialmente útil para precipitar ADN genómico de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos como las plantas y algunas bacterias (Probiotek, s.f.).

5.6.3 Método de extracción: TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738)

La solución Tri Reagent™ es un reactivo completo listo para su uso diseñado para el aislamiento de ARN total o el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas a partir de una variedad de muestras biológicas. El TRI Reagent™ combina el fenol y la guanidina tiocianato en una solución de monofasa para facilitar la inhibición inmediata de la actividad de la ARNasa. Las muestras biológicas se homogeneizan o se lisan en TRI Reagent™; la adición posterior de bromocloropropano o cloroformo provoca la separación del homogeneizado en fases acuosa y orgánica. Las particiones de ARN corresponden a la fase acuosa, el ADN a la interfase, y las proteínas a la fase orgánica (Thermofisher, s.f.).

5.6.4 Método de extracción: kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784)

El kit de aislamiento de ARN vegetal MagMAX está diseñado para la purificación de ARN total de una amplia variedad de especies vegetales y tipos de tejidos. Utiliza tecnología de partículas paramagnéticas, lo que permite un alto y sólido rendimiento. La alta capacidad de unión, el tamaño de partículas uniforme y la rápida respuesta magnética de las partículas magnéticas hacen que la tecnología sea ideal para la purificación de ácidos nucleicos. El ARN purificado de alta calidad resultante no tiene proteínas, nucleasas ni otros contaminantes o inhibidores, y se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones posteriores como RT-PCR, RT-qPCR y otras reacciones enzimáticas (Thermofisher, s.f.).

5.7 Técnica PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Mediante esta reacción se logra multiplicar del número de copias de un fragmento específico del ADN, a lo cual se le llama amplificación (Díaz, 2013). Para que se lleve a cabo la PCR se requieren diferentes componentes los cuales a continuación se muestran:

COMPONENTES PARA UNA REACCIÓN DE PCR

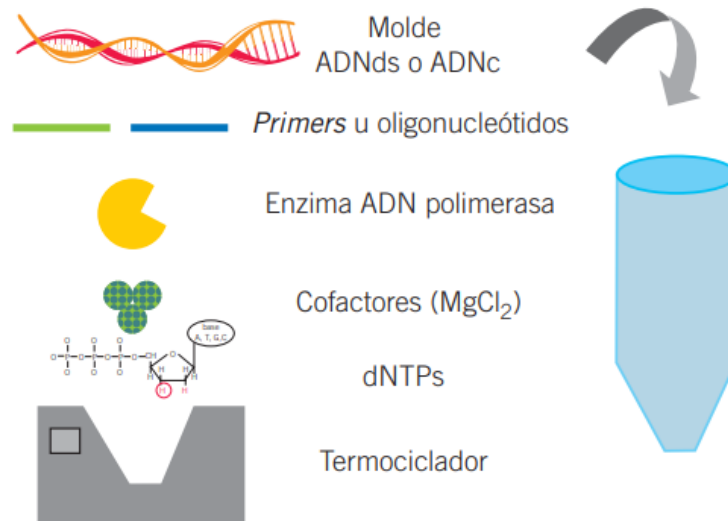


Figura 5. Componentes de una PCR. Tomado de (Velázquez *et al.*, 2014).

La reacción se lleva a cabo mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias aumentando su concentración de manera exponencial dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Velázquez *et al.*, 2014 y Mellado, 2020).

- 1) Desnaturalización: tiene lugar la rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas hebras del ADN. Se obtienen dos cadenas por separado de ADN que servirán de molde para que se unan los primers y se sintetice una nueva cadena de ADN complementario. Se caracteriza por tener una temperatura elevada (94-96 °C).
- 2) Apareamiento o hibridación: en esta fase tiene lugar la unión de los primers a la secuencia concreta que ha quedado separada en la fase anterior. La temperatura en esta fase es mucho más baja y dependerá de los primers utilizados (45-55 °C).
- 3) Extensión o elongación: una vez unido el primer a su cadena complementaria de ADN, la ADN polimerasa realiza su función, añadir nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde obteniendo como resultado una molécula de ADN de doble cadena. En esta fase la temperatura está sobre 72 °C, temperatura de actuación de la Taq polimerasa. La duración de esta fase dependerá de la longitud del fragmento que se desea amplificar.

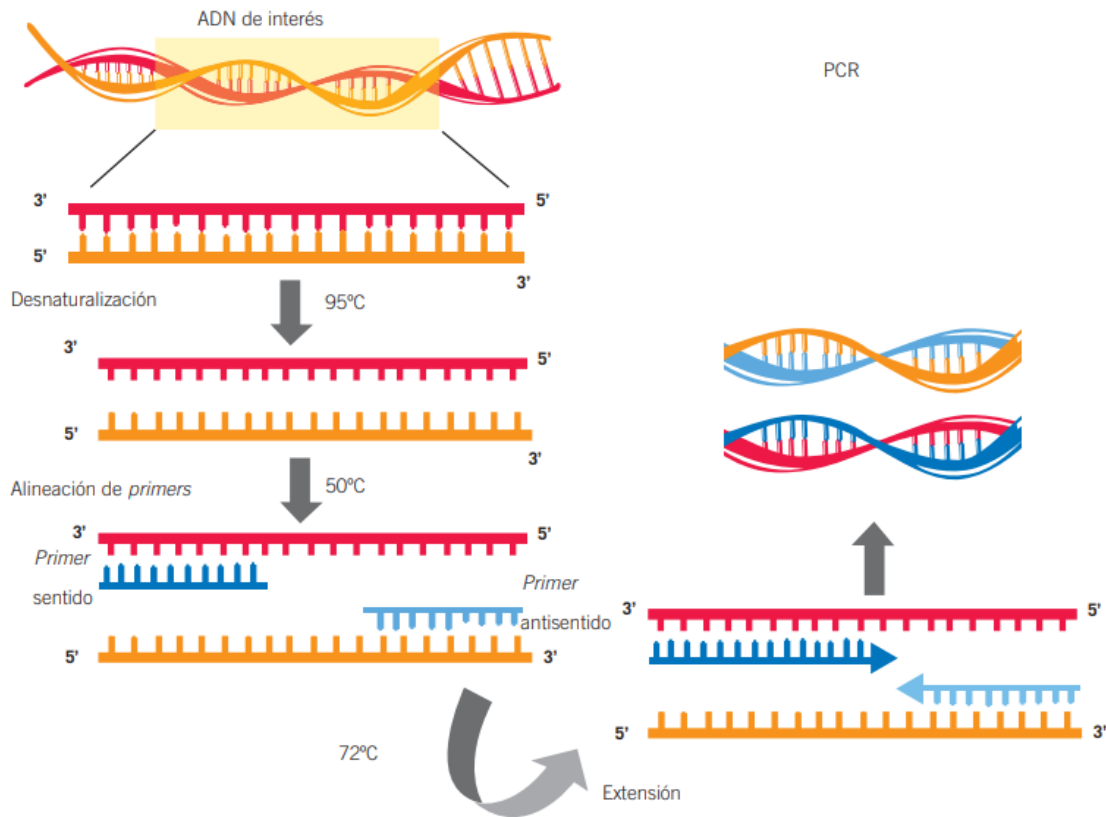


Figura 6. Esquema de una PCR. Tomado de (Velázquez *et al.*, 2014).

5.7.1 RT-PCR

La retrotranscripción es una reacción para la conversión del ARN en ADNc y en general se lleva a cabo antes de una PCR, cuando se pretende analizar secuencias de ARN. La realización consecutiva de una retrotranscripción y una PCR se conoce como RT-PCR. Esta técnica es una variante de la técnica convencional de PCR, con el objetivo de amplificar un ARN específico para evaluar su expresión o presencia, en la reacción de retrotranscripción una cadena de ARN se transcribe a ADN de secuencia complementaria al ARN, por lo que se le denomina ADNc. La transcriptasa inversa más empleada es la del M-MLV (Murine-Moloney leukemia virus) (Salazar *et al.*, 2013).

La visualización del producto de PCR es mediante una electroforesis en gel de agarosa el cual se observará con una banda. Para poder observarse el gel debe de teñirse ya sea con bromuro de etidio o gel red, para su posterior exposición en luz ultravioleta (Velázquez *et al.*, 2014).

5.8 Gen 18s

El RNA ribosomal 18S (o 18S rRNA) es un componente de la subunidad pequeña de los ribosomas de organismos eucariontes como las plantas, y participa en la síntesis de polipéptidos. El gen que codifica para el 18S rRNA permite la exploración de la diversidad de organismos eucariontes, tales como hongos, levaduras y algas, presentes en una muestra sin

importar su origen, la que puede ser ambiental o provenir desde otro organismo (interacción huésped/patógeno) (Genoma mayor, 2019).

La amplificación del gen 18s para la detección de virus fitopatógenos consiste en la amplificación, mediante una RT-PCR, de un fragmento del gen 18S ribosomal del hospedante para descartar falsos negativos debidos a inhibidores en la muestra de RNA. Por lo cual, si hay una correcta amplificación del gen, se descartan inhibidores y se procede a realizar la amplificación para el virus específico (SENASICA, 2022).

5.9 Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan estándares de tamaños conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra (NIH, 2024).

Los elementos necesarios para una electroforesis son los siguientes:

- Cámara de electroforesis

La cámara de electroforesis es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel donde se depositan las muestras. Este campo se genera dentro de una solución amortiguadora en la que se encuentra sumergido el gel que contiene las muestras; el alto contenido de electrolitos permite la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente. La cámara cuenta con dos polos que se conectan a una fuente de energía. En las cámaras de electroforesis vertical el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara y en las horizontales, en uno de los extremos. En ambos tipos de cámaras el polo positivo se distingue con color rojo y el negativo con negro (Salazar *et al.*, 2013).

- Geles de agarosa

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente, que se disuelve fácilmente en temperatura de 50 a 60°C, se torna líquida y se solidifica cuando se enfría formando un gel altamente poroso. Para elaborar el gel se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en una solución amortiguadora adecuada de la misma composición y concentración que el buffer de corrimiento y se calienta hasta formar una solución. Sin dejar enfriar se vacía inmediatamente sobre un molde de forma rectangular y en peine con la finalidad de generar los pocillos u orificios donde se colocarán las muestras. La concentración de agarosa se escoge según el tamaño del ácido nucleico que se vaya a analizar (Salazar *et al.*, 2013).

6. Metodología

La prestación del servicio social se realizará durante el periodo del 5 de mayo al 4 de noviembre de 2024, el presentador del servicio hará actividades orientadas al desarrollo del trabajo y las relacionadas a la integración, desarrollo y práctica del conocimiento que tiene y del adquirido en el laboratorio. El siguiente cuadro muestra las actividades a realizar durante el periodo de estancia:

Cuadro 1. Calendario de actividades. Elaboración propia.

Objetivo	Actividades realizadas	MES					
		1	2	3	4	5	6
Conocer los fundamentos básicos con lo que opera y se trabaja en el laboratorio de virología	Recorrido por las áreas del CNFR	x					
	Inducción al laboratorio de virología	x					
	Capacitación sobre 9's	x					
	Inducción a las buenas prácticas de laboratorio	x					
	Inducción al SGIC de Diagnóstico Fitosanitario	x					
Conocer y realizar las diversas actividades que se realizan en el laboratorio de virología	Apoyo con registro y recepción de ítems (muestras)		x	x	x	x	x
	Apoyo a actividades propias de laboratorio (preparación de material estéril, revisión de material y reactivos, etc.)		x	x	x	x	x
	Procesamiento de ítems previo a extracción de ácidos nucleicos		x	x	x	x	x
	Extracción de ácidos nucleicos		x	x	x	x	x
	Curso-taller de diagnóstico de virus fitopatógenos		x				
	Curso- taller de secuenciación		x				
	Realización de PCR y RT-PCR			x	x	x	x
	Realización de electroforesis			x	x	x	x

Realizar el reporte de servicio social en tiempo y forma	Escritura y redacción del reporte de servicio social		x	x	x	x	x
--	--	--	---	---	---	---	---

6.1 Descripción de actividades

- Recorrido por las áreas del CNFR: Se conocerá el centro, desde sus laboratorios y que realiza cada uno de ellos, esta parte busca que el presentador del servicio conozca a detalle cual es la tarea del centro y su vinculación con otros organismos en el mantenimiento de la sanidad del país.
- Inducción al laboratorio de virología: Al presentar el servicio en el laboratorio de virología es importante conocer y familiarizarse con el lugar, para un buen desempeño de las actividades.
- Capacitación sobre 9's: Recibir una capacitación sobre la metodología de las 9's sobre la gestión del trabajo y productividad.
- Inducción a las buenas prácticas de laboratorio: Al estar involucrado con un laboratorio es crucial que el prestador conozca las buenas prácticas de laboratorio para que en el transcurso de la presentación del servicio pueda emplearlas de manera satisfactoria.
- Inducción al SGIC de Diagnóstico Fitosanitario: El CNRF al ser un órgano que emite diagnósticos cumple con parámetros internos de gestión de la calidad, por tal motivo conocer este sistema es importante para un buen desempeño interno del prestador.
- Apoyo con registro y recepción de ítems (muestras): Se apoyará cuando el laboratorio se le asignen ítems para su diagnóstico por lo tanto el prestador ira a buscar y seleccionar los ítems de acuerdo a los parámetros que requiere el laboratorio (se buscaran síntomas de los patógenos que se quieren buscar).
- Apoyo a actividades propias de laboratorio: (preparación de material estéril, revisión de material y reactivos, etc.), como el nombre lo indica el prestador apoyara en preparación del material, de uso común en el laboratorio implícito en la aplicación de técnicas de diagnóstico molecular.
- Procesamiento de ítems previo a extracción de ácidos nucleicos: Macerado de muestras y almacenados a -80 C° para su posterior uso en las extracciones.
- Extracción de ácidos nucleicos: Empleo de diferentes protocolos de extracción de los ácidos (desarrollo de tres protocolos principales: CTAB al 2%, TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738) y el kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784) siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones, midiendo la concentración (ng/μL) y pureza de los ácidos nucleicos (Relación de absorbancia (260/280 y 260/230) extraídos del tejido foliar).
- Curso-taller de diagnóstico de virus fitopatógenos: Apoyo y oyente del curso taller impartido en el centro para la acreditación de terceros especialistas fitosanitarios.
- Curso- taller de secuenciación: Oyente y practicante del curso empleando herramientas como MEGA, Bioedit entre otras, como parte del curso.

- Realización de PCR: Realizar RT-PCR, PCR, y PCR en tiempo real como parte de la evaluación de la funcionalidad de ácidos nucleicos y el diagnóstico de virus.
- Realización de electroforesis: Empleo de la técnica para la separación del tamaño de las moléculas de los ácidos nucleicos como parte final de la amplificación de la PCR convencional.

6.2 Descripción de métodos a desarrollar

6.2.1 CTAB 2%

Extracción de ácidos nucleicos con el método CTAB 2% modificado

- Tomar de 50 a 100 mg de tejido vegetal de cada muestra, por duplicado.
- Colocar la muestra en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido, hasta pulverizar el tejido. Depositar la muestra en un tubo estéril de 2 mL.

Nota: Este paso se puede realizar utilizando un disruptor de tejidos, siguiendo las indicaciones de uso del equipo.

- Adicionar 800 μ L de buffer CTAB (CTAB 2 %, PVP 2%, NaCl 1 M, Tris base 0.1 M, EDTA 20 mM, B-mercaptoetanol 0.5%), previamente calentado a 65 °C.
- Homogenizar la muestra por inversión e incubar a 65 °C durante 40 minutos, en baño maría.
- Al concluir la incubación, dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
- Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 2 mL.
- Agregar 500 μ L de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 V:V). Agitar vigorosamente con vortex y centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo de 1.5 mL. Adicionar medio volumen de isopropanol al 100 % frío (-20 °C).
- Mezclar por inversión e incubar a -20 °C por 40 minutos o toda la noche a 4 °C.
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos. Decantar el sobrenadante cuidando que no se pierda la pastilla.
- Agregar 500 μ L de etanol al 70% y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
- Decantar el sobrenadante cuidando que no se pierda la pastilla.
- Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente y resuspender en 50-100 μ L de agua libre de nucleasas.

6.2.2 TRI Reagent™ (Invitrogen, Cat. AM9738)

Extracción de ácidos nucleicos con PureLink™ Plant RNAREagent (Invitrogen)

- Tomar de 50 a 100 mg de tejido vegetal de cada muestra, por duplicado.

- b) Colocar la muestra en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido, hasta pulverizar el tejido. Depositar la muestra en un tubo estéril de 2 mL.

Nota: Este paso se puede realizar utilizando un disruptor de tejidos, siguiendo las indicaciones de uso del equipo.

- c) Adicionar 500 µL de PureLink™ Plant RNA Reagent (número de catálogo 12322012).
- d) Homogenizar la muestra por agitación con vortex e incubar en hielo durante 5 minutos, procurando que los tubos permanezcan en posición horizontal.
- e) Centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo de 2 mL.
- f) Agregar 100 µL de una solución de NaCl, 5 M, y mezclar por inversión.
- g) Adicionar 300 µL de cloroformo frío (-20 °C), mezclar por inversión y centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos.
- h) Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo de 1.5 mL. Adicionar un volumen de isopropanol al 100 % frío (-20 °C).
- i) Mezclar por inversión e incubar en hielo por 20 minutos.
- j) Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos. Decantar el sobrenadante cuidando que no se pierda la pastilla.
- k) Agregar 1000 µL de etanol al 70% y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- l) Decantar el sobrenadante cuidando que no se pierda la pastilla.
- m) Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente y resuspender en 50-100 µL de agua libre de nucleasas.

6.2.3 Kit comercial MagMAX™ Plant RNA Isolation Kit (Applied Biosystem, Cat. A33784)

Se tomó el protocolo de extracción de la guía del usuario que aporta el kit de extracción: [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016311_MagMAX_PlantRNA_Isol_UG.pdf](https://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016311_MagMAX_PlantRNA_Isol_UG.pdf)

- a) Tomar de 50 a 100mg de tejido vegetal de cada muestra, por duplicado.
- b) Colocar la muestra en mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido, hasta pulverizar el tejido. Depositar la muestra en tubo estéril de 2mL.

Nota: Este paso se puede realizar utilizando un disruptor de tejidos, siguiendo las indicaciones de uso del equipo.

- c) Adicionar 600 µL de Buffer de lisis con Ditiotreitól (DTT) al 2M.

Componente	Volumen
Lysis Buffer	600 µL
DTT 2M	12 µL
Lysis Buffer con DTT	612 µL

Nota: Solo se requieren 600 µL de lisis de buffer con DTT para cada interrupción de muestra.

Añadir PVP40 al Tampón de Lisis con DTT a una concentración final de PVP40 del 2% (p/v).

Nota: Para maximizar la eficacia de PVP40, recomendamos agregar PVP40 desde una solución madre (por ejemplo, 20 % p/v) en lugar de disolver el polvo directamente en el tampón de lisis con DTT.

Componente	Volumen
Lysis Buffer con DTT	525 µL
PVP40 (Plant RNA Isolation Aid)	75 µL
Total Supplemented Lysis Buffer	600 µL

- d) Homogenizar la muestra por agitación vortex de 10 a 20 segundos e incubar a 56°C durante 5 minutos.
- e) Centrifugar a 16000 rpm por 10 minutos. Recuperar sobrenadante (400 µL) y colocar en un tubo de 2mL.
- f) Añadir 25 µL de perlas de unión de ARN al sobrenadante recuperado.

Nota: Resuspender bien las perlas de unión de ARN mediante agitación antes de su uso.

- g) Adicionar 400 µl de etanol al 96–100% y luego mezcle con un vortex durante 10 segundos a temperatura alta. Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo.
- h) Coloque la muestra en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare y las perlas se recojan contra el imán.
- i) Sin retirar la muestra del soporte magnético, pipetee con cuidado y deseche el sobrenadante. Asegúrese de eliminar todo el sobrenadante.
- j) Retire la muestra del soporte magnético. Agregue 700 µL de solución de lavado 1 a las perlas y luego mezcle con un vortex durante 10 segundos.

Nota: Las perlas pueden agruparse, dificultando la obtención de una suspensión uniforme. Sin embargo, no tiene ningún efecto sobre el rendimiento final.

- k) Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo. Coloque la muestra en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare y las perlas se recojan contra el imán.
- l) Sin retirar la muestra del soporte magnético, pipetee con cuidado y deseche el sobrenadante. Asegúrese de eliminar todo el sobrenadante.
- m) Incubar la muestra con la tapa abierta durante 5 minutos en el soporte magnético para eliminar el etanol restante.
- n) Durante la incubación, prepare la mezcla maestra de DNase I para la cantidad de muestras que se procesarán de acuerdo con la siguiente tabla.

¡IMPORTANTE! Para obtener mejores resultados, prepare la mezcla maestra DNase I justo antes de usarla para evitar períodos prolongados a temperatura ambiente.

Componente	Volumen por muestra
Buffer DNase I 2X	100 µL
Solución DNase I	4 µL
Solución de cloruro de manganeso	20 µL
Agua libre de nucleasas	76 µL

Total DNase I Master Mix	200µL
--------------------------	-------

- o) Al final de la incubación, retire la muestra del soporte magnético, luego agregue 200 µL de DNase I Master Mix a las perlas y luego golpee suavemente para mezclar.

Nota: El residuo de cuentas puede decolorar las paredes interiores del tubo. Sin embargo, no tiene ningún efecto sobre el rendimiento y la calidad finales.

- p) Incubar en termo mezcladora durante 15 minutos a 37°C y 350 rpm. Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo.
- q) Agregue los siguientes reactivos a cada muestra para volver a unir el ARN.
- 150 µL de Rebinding Buffer- Reenlace
 - 400 µL de etanol al 96-100%
- r) Mezcle bien agitando durante 10 segundos. Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo.
- s) Coloque la muestra en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare y las perlas se recojan contra el imán. Sin retirar la muestra del soporte magnético, pipetee con cuidado y deseche el sobrenadante. Asegúrese de eliminar todo el sobrenadante.
- t) Retire la muestra del soporte magnético. Agregue 700 µL de solución de lavado 1 a las perlas y luego mezcle con un vortex durante 10 segundos.
- u) Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo. Coloque la muestra en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare y las perlas se recojan contra el imán.
- v) Sin retirar la muestra del soporte magnético, pipetee con cuidado y deseche el sobrenadante. Asegúrese de eliminar todo el sobrenadante. Retire la muestra del soporte magnético.
- w) Repita los pasos u) al w) dos veces con 700 µL de solución de lavado 2.
- x) Incubar la muestra con la tapa abierta durante 5 minutos en el soporte magnético para eliminar el etanol restante. Retire la muestra del soporte magnético.
- y) Agregue 100 l de agua libre de nucleasas a las perlas.

Nota: El volumen de agua libre de nucleasas se puede reducir a 50 µL si se necesita una concentración de ARN más alta o aumentar a 200 µL si se necesita una concentración de ARN más baja.

- z) Mezcle bien agitando durante 10 segundos. Centrifugar brevemente para recoger el líquido en el fondo del tubo. Coloque la muestra en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que la solución se aclare y las perlas se recojan contra el imán.
- aa) Sin retirar la muestra del soporte magnético, transfiera con cuidado el sobrenadante que contiene ARN a un tubo limpio.

Nota: Un residuo de cuentas puede decolorar las paredes interiores del tubo. Este mínimo residuo de perlas no interfiere con las aplicaciones posteriores.

bb) Guarde el ARN purificado en hielo para su uso inmediato. Como alternativa, almacene el ARN purificado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento a largo plazo.

6.2.4 RT-PCR y PCR

Para poder realizar la amplificación de gen endógeno 18s, se hace en dos pasos: 1) síntesis de cDNA mediante retrotranscripción (RT) de una hebra molde de RNA y 2) amplificación del cDNA mediante PCR. Para realizarla se emplean los siguientes reactivos con las siguientes concentraciones y condiciones de reacción:

- **RT-PCR**

Primers

Nombre	Secuencia	Tamaño de amplicón
18S Fw	5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3'	300 pb
18s Rv	5'-ACCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'	

Síntesis cDNA

a) Reactivos

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1x (μL)
Agua ° PCR	--	--	7.75
Buffer PCR	05 X	0.5 X	2
MgCl ₂	50 mM	5.0 mM	2
dNTP's	10 mM	1.0 mM	2
Hexámeros	10 μM	0.25 μM	0.5
Inhibidor de RNA	40 U/ μL	1.00 U/ μL	0.5
RT M-MLV	200 U/ μL	2.5 U/ μL	0.25
RNA	--	--	5
Volumen final RT			20

b) Condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo	Ciclo
42 °C	30 min	1
99 °C	5 min	1
5 °C	5 min	1
12 °C	∞	1

- **Amplificación mediante PCR**

a) Reactivos

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen 1x (μL)
-----------	-----------------------	---------------------	------------------------------

Agua ° PCR			18
Buffer de PCR	10 X	1 X	2.5
MgCL2	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP´s	10 mM	0.2 mM	0.5
18S Fw	10 µM	0.4 µM	1
18S Rv	10 µM	0.4 µM	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25
cDNA	--	--	1
Volumen final			25

b) Condiciones de reacción

Temperatura	Tiempo	Ciclo
94 °C	90 s	1
94 °C	40 s	30
55 °C	40 s	
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	1
12 °C	∞	1

6.2.5 Electroforesis

Para la realización de la electroforesis, se preparan geles de agarosa al 2%, se deja solidificar y se sumerge a una cámara para electroforesis que contiene solución TAE al 1X, se procede a cargar los pozos del gel, se emplea buffer de carga *TrackIt™ Cyan/Orange* (Cat. 10482028), escalera de ADN de 50 bp, Thermo Scientific GeneRuler (Cat. SM0373). Se colocan 3 µL de buffer de carga y 10 µL del producto de PCR y 4 µL de la escalera de ADN, posteriormente se deja correr a 95V por 1 hora 20 min, finalizando el tiempo se tiñe en bromuro de 15-40 minutos, pasando este tiempo se lleva a foto documentador para observar el gel.

7. Bibliografía

Agrocultivos Tv. (2023, 28 de mayo). Clasificación de virus fitopatógenos y proteínas virales [Imagen]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=f31YVYYsXd8>

Airtecnics. (s.f). Virus desnudos y virus envueltos [Imagen]. <https://www.airtecnics.com/es/tecnologia/tecnologia-oh-contra-virus-pruebas>

Ayllon, M. A., Cambra, M., Moriones, E., Llave, C. y varios. (2018). *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. Sociedad española de fitopatología, Bubok Publishing SL.

Chilig, K. y Chiluisa, V. (2015). Manual del banano, morfología del banano [Imagen]. <https://es.slideshare.net/slideshow/manual-del-banano-utc/54962656>

CIQA. (2023). *Virus en plantas: Amenazas emergentes para la seguridad alimentaria y la economía agrícola*. <https://ciqa.mx/VirusenPlantas.aspx#:~:text=El%20impacto%20de%20estas%20enfermedades,la%20estabilidad%20de%20los%20ecosistemas>.

CNRF. (2017). *Informe de actividades*. Pág. 6-61. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/356693/INFORME_CNRF_2017_baja.pdf

Díaz, A. C., Garrote, S., Amor, V. H., Suárez, G. M. A. y González, M. R. R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3), 298-303.

Diz, M. O. M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*, 100(100), 1-100.

Genoma Mayor. (2019, 13 diciembre). *Análisis 18S rRNA/ITS - genoma mayor*. [https://www.genomamayor.com/analisis-18s-rrna-its/#:~:text=El%20RNA%20ribosomal%2018S%20\(o,\(interacci%C3%B3n%20hu%C3%A9sped/pat%C3%B3geno\)](https://www.genomamayor.com/analisis-18s-rrna-its/#:~:text=El%20RNA%20ribosomal%2018S%20(o,(interacci%C3%B3n%20hu%C3%A9sped/pat%C3%B3geno)).

Genotipia. (s.f). Virus III: El ciclo replicativo de los virus [Imagen]. <https://genotipia.com/virus-reproduccion/>

ICTV Taxonomy Release | ICTV. (2023). <https://ictv.global/taxonomy>

Manzo, S. G., Orozco, S. M., Martínez, B. L., Garrido, R. E., y Canto, C. B. (2014). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa sp.*) en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 89-107.

Mellado, D. O. M. (2020). *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*. Vol. III Número 30

NIH. (2024). *Electroforesis*. Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>

NIH. (2024). Glosario parlante de términos genómicos y genéticos. *Virus*. <https://www.genome.gov/es/genetics>

8. Anexos

Amplificaciones de gen endógeno 18s ribosomal de tejido foliar de plátano

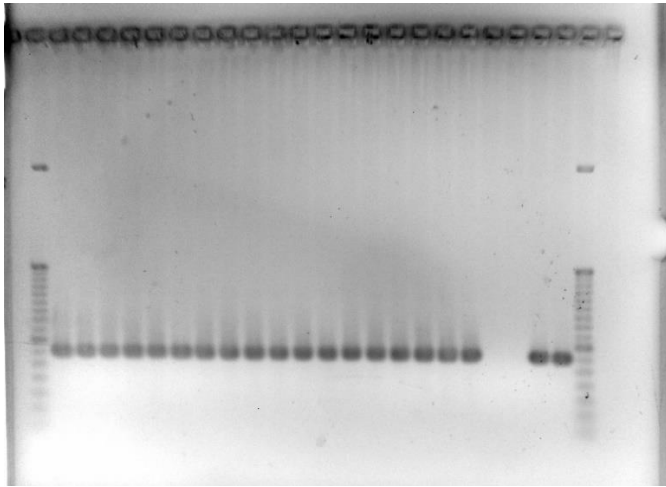


Imagen 7. Amplificación por método de extracción CTAB 2%

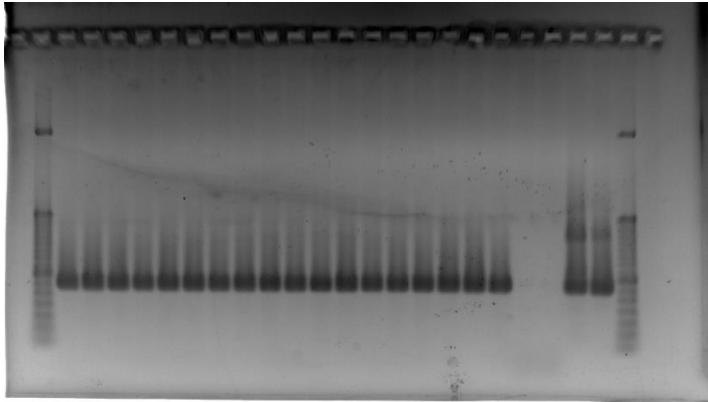


Imagen 8. Amplificación por método de extracción TRI Reagent™

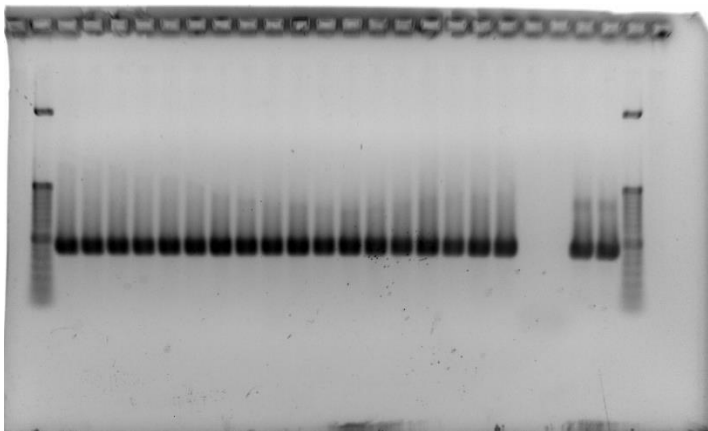
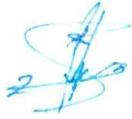
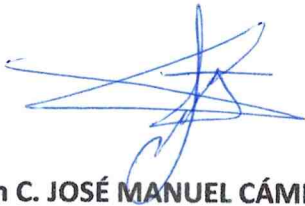


Imagen 9. Amplificación por método de extracción Kit comercial MagMAX™



DR. SALVADOR HERNANDEZ MORENO
ASESOR INTERNO



M. en C. JOSÉ MANUEL CÁMBROM CRISANTOS
ASESOR EXTERNO



JESUS EUSEBIO ARAUZ ALCUDIA
ALUMNO