

Universitas

Julio-Diciembre
de 2000

SCIENTIARUM

ISSN 0122-7483



$$-\int \frac{Gdm}{S^2} \cos \phi$$



Volumen

5



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA
Revista de la Facultad de Ciencias



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARCIAL DEL VIRUS DEL MOTEADO DEL CLAVEL (CarMV) PRESENTE EN LA SABANA DE BOGOTÁ

Ana Yervid Rodríguez¹, Orlando Acosta*² y José Peñaranda²

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 n° 43-82. Santa Fe de Bogotá, D.C. Colombia.

² Unidad de Bioquímica - Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Santa Fe de Bogotá.

* A quien debe ser enviada la correspondencia.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio del virus moteado del clavel (CarMV), en el cual se analizaron con la prueba de ELISA muestras de clavel de diferentes variedades de la Sabana de Bogotá. Esta prueba indicó que el 82% de las muestras analizadas eran positivas para el CarMV. El CarMV presente en las muestras positivas fue inoculado mecánicamente en plantas de clavel certificadas libres de virus. La partícula viral se purificó utilizando centrifugación en gradientes y colchones de sacarosa. La proteína de la cápside fue analizada por electroforesis SDS-PAGE, encontrándose una banda de proteína de masa molecular relativa aproximada de 38kDa. El tejido infectado con el CarMV se sometió a un proceso de extracción de RNA de doble cadena (dsRNA) encontrándose de 3 a 5 componentes electroforéticos cuyos tamaños fluctuaron aproximadamente entre 8.0 y 0.9 kpb. Este patrón de dsRNA permitió diferenciar al menos 3 aislamientos virales. El análisis electroforético en geles de agarosa del RNA genómico de varios aislamientos virales, mostró una banda de peso molecular aproximado de 4.0 kb. El análisis del RNA genómico digerido con RNAsa T1 permitió diferenciar 2 grupos de patrones electroforéticos de los aislamientos estudiados.

ABSTRACT

Using an ELISA test, carnation mottle virus (CarMV) was found to infect 82% of the carnation samples collected from the Sabana of Bogotá. The isolated virus was mechanically inoculated on virus-free carnation plants and purified by sucrose gradient centrifugation. CarMV coat protein was analyzed by SDS-PAGE showing a single component of about 38 Kda. Double-stranded RNA (dsRNA) extracted from carnation infected tissue showed 3 to 5 electrophoretic components ranging between 8.0 and 0.9 Kbp. Virus particles contained a genomic RNA of about 4.0 Kbp as revealed by agarose gel electrophoresis. It was possible to distinguished 2 groups of electrophoretic patterns using RNase T1 digestion of the RNA contained in the CarMV purified particles.

Palabras clave: cápside viral, carmovirus, clavel, dsRNA, electroforesis.

INTRODUCCIÓN

El virus moteado del clavel (CarMV) pertenece al grupo de los carmovirus, familia Tombusviridae (Mayo & Pringle, 1998). Es un virus de morfología icosaédrica, cuyas partículas contienen una molécula de RNA genómico de cadena sencilla de sentido positivo compuesta por 4003 nucleótidos (Guilley *et al.*, 1985). Su genoma se halla encapsidado por subunidades proteicas de 38kDa. Posee 5 ORFs y presenta una estrategia de expresión génica de lectura a través de codones de terminación y de RNA subgenómicos. Además del RNA genómico, en la partícula viral se encapsidan dos especies de RNA subgenómico de 1.6 y 1.75 kb (Carrington & Morris, 1984). Del tejido infectado con CarMV se ha aislado dsRNAs de 4.0, 1.2 y 0.9 kpb (Lawson & Kenneth, 1987). Estos últimos dsRNAs son subgenómicos. El CarMV infecta los cultivos de clavel produciendo cuantiosas pérdidas. La incidencia de este virus en la Sabana de Bogotá se ha estimado en un 30% (Pizano, 1992).

En el presente trabajo se demuestra la existencia de al menos 3 variantes del CarMV que actúan en la Sabana de Bogotá, sobre la base de los patrones electroforéticos del dsRNA y la fragmentación específica del genoma con la RNAsa T1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del virus

Se tomaron muestras de clavel provenientes de la Sabana de Bogotá y del invernadero de la Universidad Nacional, las cuales presentaban los síntomas producidos por el CarMV. El virus purificado a partir de estas plantas o extractos de su tejido fue inoculado mecánicamente sobre plantas de clavel certificadas libres de virus donadas por Flor América S.A. Estas plantas se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 18-22°C. La presencia del CarMV en las plantas de campo y del invernadero fue determinada mediante la prueba serológica de ELISA utilizando el "kit" distribuido comercialmente

por la Facultad de Medicina y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional. El método de ELISA utilizado fue esencialmente como lo describe Clark & Adams (1977).

Purificación del virus

A partir de los resultados obtenidos con la prueba de ELISA, se escogieron las muestras positivas para CarMV con el objeto de purificar el virus. Para la purificación del virus se utilizó como referencia el método descrito por Lommel *et al.*, (1982) y Waterworth & Kaper (1972), al cual se le hicieron algunas modificaciones. Se pesaron 100 g de hojas de clavel, se homogeneizaron en licuadora con buffer acetato de sodio 0.2M, pH 5.0, a 4°C. El virus se precipitó con polietilenglicol (PEG) y cloruro de sodio (NaCl), seguido de resuspensión en buffer Tris-HCl 0.01 M, pH 7.3 y sedimentación en gradientes o colchones de sacarosa. La suspensión del virus purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm, se le determinó el espectro de absorción entre 200-300 nm y se estableció la relación A_{260}/A_{280} . El virus purificado se almacenó a -20°C.

Electroforesis de la proteína estructural del virus

Las partículas virales fueron disociadas mediante la adición de un volumen de buffer de tratamiento 2X de Laemmli (1970), seguido de incubación en agua hirviendo durante 3 minutos. La proteína estructural fue analizada en el sistema SDS-PAGE de Laemmli (1970), a través de un gel de concentración del 4% y un gel de separación del 12.5% de poliacrilamida. La proteína separada en el gel fue visualizada con azul de Coomassie. Las proteínas totales presentes en el tejido infectado fueron igualmente analizadas en este sistema de electroforesis. En este caso, la muestra se preparó macerando el tejido en ácido tricloroacético al 10% en acetona que contenía 2-mercaptoetanol al 0.3%, colectando el precipitado a baja centrifugación y lavándolo 2-3 veces con acetona fría. Este precipitado fue resuspendido en buffer de tratamiento 1X de Laemmli (1970) y se incubó como ya se indicó para la suspensión viral. Se utilizó una mezcla de

marcadores de peso molecular para proteínas que contenía albúmina bovina (68.000), ovoalbúmina (45.000), quimotripsina (25.000) y beta lactoglobulina (18.000).

Patrones de dsRNAs subgenómicos

Las muestras positivas en la prueba de ELISA para CarMV se utilizaron para obtener los dsRNAs, empleando extracción con fenol y absorción con CF-11 celulosa, según el método descrito por Dodds *et al.*, (1984). La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 6%, en una minicámara vertical SE 250 Mighty (Hoeffer), a voltaje constante de 100 v por 3.5 horas. Para visualizar las bandas de los dsRNAs se utilizó una tinción de nitrato de plata (Blum *et al.*, 1987). Los pesos moleculares aproximados de los dsRNAs se calcularon por el método gráfico de Bozart & Harley (1976), utilizando los marcadores de peso molecular de (Hind III (Gibco-BRL) (MW: 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 y 564 kpb).

Purificación del RNA genómico del CarMV

Para la extracción del RNA genómico viral se partió del virus purificado y se utilizó el método del TRIZOL (Ácido Guanidínico Tiocianato-fenol-cloroformo de Gibco-BRL) (Chomczynski & Sacchi, 1987). El RNA genómico purificado se separó en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en una cámara submarina Horizon 58 (Gibco-BRL). La electroforesis se corrió a 100 voltios constantes durante 1 hora, se tiñó con bromuro de etidio (0.5 (g/ml) durante 15 minutos y se visualizó en un transiluminador UV. El tamaño de las bandas formadas fue calculado utilizando el marcador de peso molecular "RNA ladder" (Gibco-BRL) (P.M 9.5, 7.5, 4.4, 2.4, 1.4 y 0.24 kb) y el método gráfico de Bozart & Harley (1976).

Digestión del RNA con RNAsa T1

Se utilizó como referencia los métodos descritos por Bergeman *et al.*, (1989) y De Watcher *et al.*,

(1972). Para poder observar los productos de la digestión con RNAsa T1, se realizó una electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida al 10% en una cámara vertical SE 250 Mighty (Hoeffer), utilizando buffer de citrato de sodio 0.025M, pH 3.5. La electroforesis se condujo a 35 mA constantes por lámina de gel de 0.75 mm, durante 1.5 horas. Los productos de la digestión se observaron utilizando una tinción de nitrato de plata (Blum *et al.*, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia del CarMV

El agente etiológico que produjo la sintomatología en las plantas de clavel estudiadas fue confirmado mediante la prueba de ELISA como CarMV. Con esta prueba serológica se determinó que de 72 muestras analizadas, el 82% eran positivas al virus cuando se utilizó el "kit" de ELISA preparado contra un aislamiento viral que actúa en la Sabana de Bogotá. Mediante la prueba de ELISA se detectó el CarMV en 52 variedades de clavel. Los resultados de esta prueba se encuentran descritos en la tabla 1. El nivel de incidencia encontrado en este trabajo es superior al 30% reportado en estudios previos (Sánchez & Torrado, 1993; Pizano & Salazar, 1992).

Las plantas sanas de clavel inoculadas con extractos de hojas de clavel infectadas con CarMV o con este virus purificado, reaccionaron sistémicamente a la infección, produciendo síntomas primarios. Estos síntomas empezaron a aparecer a los 15 días después de la inoculación, formándose inicialmente en las hojas una clorosis leve, luego una clorosis difusa, manchas y punteado (figura 1). Estos síntomas coinciden con los reportados por Hollings & Stone (1970). Las condiciones de cultivo de invernadero permitieron obtener tejido de clavel infectado con niveles de CarMV suficientes para los propósitos de purificación del virus, análisis de su proteína estructural y su ácido nucleico.

Nº	VARIEDAD	Nº DE ESQUEJES ANALIZADOS	RESULTADO
1	Pisa	4	Negativo
2	Ciao	4	Positivo
3	Lilac Torres	5	Negativo
4	Alba Malva	4	Positivo
5	White cc	4	Positivo
6	Giulia Viola	4	Positivo
7	Bacio	4	Positivo
8	Vittorio	14	Positivo
9	Tuare G	4	Positivo
10	Ligth Lambada	6	Positivo
11	Aragona	10	Positivo
12	Africa	10	Positivo
13	Domino	8	Positivo
14	Annays	6	Positivo
15	Giulia	12	Positivo
16	Roberta	13	Positivo
17	Fiorella Rosso	7	Positivo
18	F53 Viola	8	Positivo
19	Angelica	10	Positivo
20	Nona	6	Positivo
21	Diana	13	Positivo
22	Leone	16	Positivo
23	Tasman	4	Negativo
24	Optima	3	Negativo
25	Maoma	4	Negativo
26	Alara	8	Positivo
27	Ligth Pink Barbara	8	Positivo
28	M.Gorena	15	Positivo
29	Scarlet Kink	4	Negativo
30	Eveline	6	Negativo
31	2208 St Bianco	7	Positivo
32	Mini Viola	14	Positivo
33	Pink Pisa	5	Negativo
34	Mares	9	Positivo
35	Masai	13	Positivo
36	Malvetta	4	Negativo
37	Selene	4	Positivo
38	Maribel	4	Negativo
39	Nabila	5	Positivo
40	Tiziano	6	Positivo
41	Sergio	9	Positivo
42	Turbo	14	Positivo
43	Santa Fe	6	Positivo
44	Batman	8	Negativo
45	Dark Pink Barbara	2	Negativo
46	Fiorella Giallo	7	Positivo
47	Barbara	8	Negativo
48	Pink Calipso	6	Positivo
49	Scarlette	6	Positivo
50	Oliver	14	Positivo
51	Peach Vainilla	6	Positivo
52	Diferentes variedades	20	Positivas
	Invernadero Universidad Nacional		

Tabla 1. Diagnóstico del CarMV con la prueba de ELISA.

Electroforesis de la partícula viral purificada

El espectro de absorción en UV de las partículas virales purificadas fue típico de una nucleoproteína (figura 2). La relación A260/A280 fue igual a 1.8, lo cual sugiere una proporción del 18% de RNA (Paul, 1959). El método de purificación permitió obtener partículas virales con un rendimiento de 8.9 mg/kg a 23.6 mg/kg de tejido. La pureza de las partículas virales se confirmó con electroforesis en gel de poliacrilamida en el sistema SDS-PAGE, revelándose en el gel una banda de proteína homogénea con un peso molecular de 38.000 (figura 3. Carriles 3-6). En esta prueba electroforética no se observaron bandas de proteína provenientes del tejido infectado (figura 3. Carriles 7-10).

Análisis electroforético de los dsRNAs

Con el propósito de caracterizar los dsRNA asociados a la infección producida por CarMV se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, la cual reveló el componente esperado de 4.0 kpb, el cual se asocia con la forma replicativa del RNA genómico del CarMV. Adicionalmente se observaron bandas de tamaños cercanos a 0.9 y 1.2 kpb (figura 4A). En algunos aislamientos la banda de 0.9 mostró una duplicación (figura 4B). La relación de estos dsRNAs subgenómicos con los RNAs subgenómicos que se encapsidan no ha sido determinada. Igualmente, no se conoce la función de estos fragmentos subgenómicos (Carrington & Morris, 1984).

En algunos extractos se detectó un componente de dsRNA de aproximadamente 8.0 kpb (figura 4C). Este componente probablemente correspondería a otro virus. Sin embargo, en la electroforesis de la proteína de las partículas virales purificadas se detectó únicamente un componente de 38 KDa. Los extractos de plantas de clavel certificadas libres de virus inoculadas con estas partículas virales, no mostraron el componente de dsRNA de 8.0 kpb (figura 4D). Estos resultados podrían indicar que de existir un

virus contaminante, éste es inestable en las condiciones de purificación utilizadas. Sin embargo, debido a que una de las variantes del CarMV, que mostró una migración relativamente menor en todos los componentes de dsRNA, también incluyó la banda de dsRNA de 8.0 kpb (figura 5C), no se excluye que este componente pueda estar relacionado de alguna forma con el CarMV. El análisis electroforético de dsRNA permitió encontrar 3 variantes del CarMV, lo cual podría estar indicando la presencia de cepas de este virus que difieren en el patrón de dsRNA, aunque no se tuvo evidencia de diferencias biológicas asociadas a estas variantes, ni se condujeron experimentos con este propósito. La variación de estas cepas estuvo representada en la mayor o menor movilidad de los fragmentos subgenómicos con relación a la mayoría de los aislamientos examinados (figura 4A carril 6, figura 4C. carril 10).

En general, los patrones dsRNA fueron conservados en todos los aislamientos de las diferentes variedades de clavel, excepto en los 3 aislamientos referidos. Estas 3 variantes representaron el 7.5% de las 40 muestras analizadas en sus patrones de dsRNAs subgenómicos aislados del tejido infectado.

Análisis electroforético del RNA genómico

La electroforesis del RNA purificado con TRIZOL, reveló en gel de agarosa una banda de un tamaño aproximado de 4.0 kb, correspondiente al RNA genómico de la partícula viral del CarMV (Figura 5). Este tamaño se determinó con relación a los marcadores de peso molecular descritos en Materiales y métodos. En todas las preparaciones, la región del gel inferior a la banda de 4.0 kb mostró una tinción de fondo ("background") que sugiere una probable degradación del RNA genómico durante la preparación de la muestra. Asimismo, se insinúa una banda menor de alrededor de 1.6-1.7 kb, la cual podría corresponder a los RNAs subgenómicos reportados por otros autores (Carrington & Morris, 1984).

Análisis del RNA genómico digerido con RNAsa T1

El análisis unidimensional mostró un patrón de digestión característico (Figura 6. Carril 3) para los aislamientos que compartieron la misma movilidad en los fragmentos subgenómicos de dsRNA. Por el contrario los aislamientos que mostraron una movilidad menor en los fragmentos de 0.9 y 1.2 kpb, exhibieron un patrón de fragmentación diferente (Figura 6. Carril 4) al de la mayoría de los aislamientos. Esto indica que los aislamientos de movilidad corta presentan variaciones en la secuencia. Estas variaciones se podrían deber a secuencias adicionales que son responsables de la menor movilidad o a variaciones en la posición de las guaninas que son los sitios específicos para el corte con la RNAsa T1.

LITERATURA CITADA

- BERGEMANN, I.E.; TIRABOSCHI, B.H.; BOLLER, M. & MALIRAT, V. 1989. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la fiebre aftosa: Minifingerprinting de ARN. Centro panamericano. *Fiebre aftosa*. 55: 35-38.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electroforesis*. 8: 93-99.
- BOZARTH, R.F. & HARLEY, E.H. 1976. The electrophoretic mobility of double-stranded RNA in polyacrylamide gels as a function of molecular weight. *Biochem. Biophys. Acta*. 432: 329-335.
- CARRINGTON, J. & MORRIS, T. 1985. Characterization of the cell-free translation products of carnation mottle virus genomic and subgenomic RNAs. *Virology*. 144: 1-10.
- CARRINGTON, J. & MORRIS, T. 1984. Complementary DNA cloning and analysis of carnation mottle virus RNA. *Virology*. 139: 22-31.
- CARRINGTON, J.C. 1985. High resolution mapping of carnation mottle virus associated RNAs. *Virology*. 145: 146-154.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochemistry*. 162: 156-159.
- CLARK, M.K. & ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme Linked immunoabsorbent assay for the detección of plant viruses. *Journal General Virology*. 34: 475-483.
- DAVIS, L.; KOEHL, M. & BATTEY, J. 1994. Electroforesis of proteins on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. In: Basic methods in molecular biology. 2 Edition. *Appleton y Lange U.S.* 661-668.
- DAWSON, W.O. & DODDS, J.A. 1982. Characterization of subgenomic double-stranded RNAs from virus-infected plants. *Biochemistry Research Communication*. 107: 1230-1235.
- DE WATCHER, R. & FIERS, W. 1972. Preparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ³²P-Labeled RNA. *Analytical Biochemistry*. 49: 184-197.
- DODDS, J. 1986. The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. *Journal Association of Applied Biologists*. 71-86.
- DODDS, J.; MORRIS, T. & JORDAN, R. 1984. Plant viral double stranded RNA. *Annual Review Phytopatology*. 22: 151-168.
- GUILLEY, H.; CARRINGTON, J.C.; BALAZS, E. & JONARD, G. 1985. Nucleotide sequence and genome organization of carnation mottle virus RNA. *Nucleic Acids Research*. 13 (18): 6663-6677.
- HOLLINGS, M. & STONE, O. 1970. Carnation mottle virus. *Journal Association of Applied Biologists*. 7.

- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LOMMEL, S. & KENDALL, T. 1991. Characterization of maize chlorotic mottle virus. *Phytopathology*. 81(8): 819-823.
- LOMMEL, S.; MCCAIN, A.H. & MORRIS, T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *Phytopathology*. 72(8): 1018-1022
- LLAURADO, M. & AURUS, P. 1995. Variedades propias de clavel. *Boletín Informativo IRTA*. (38): 6.
- MAYO, M.A., & PRINGLE, CR. 1998. Virus Taxonomy-1997. *Journal of General Virology*. 79: 649-657.
- MORRIS, T. & CARRINGTON, J. 1988. Carnation mottle virus and viruses with similar properties. *Phenum Press*. 3: 73-112.
- PIZANO, M. 1987. Carnation culture in Colombia: state of art. *Acta Horticulturae*. (216): 29-35.
- PIZANO, M. & SALAZAR, M. 1992. Distribución del virus moteado del clavel y del virus de la mancha anillada del clavel en la Sabana de Bogotá. *Cuarto Simposio Internacional sobre clavel*. (28):15.
- SALOMÓN, R.; BAR-JOSEPH, M.; SOREQ, H. & GOZES, I. 1978. Translation in vitro of carnation mottle virus RNA regulatory function of 3'-region. *Virology*. 90: 288-298.
- SÁNCHEZ, O.J. & TORRADO, E. 1993. Producción de antisueros anti CarMV, adaptación de la técnica ELISA y determinación de los niveles de incidencia en cinco variedades de clavel. Tesis Bacteriología. Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá. 77 p.
- VALVERDE, R.; DODDS, J. & HEICK, J. 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology*. 76: 459-465.
- VALVERDE, R. 1990. Analysis of double - stranded RNA for plant virus diagnosis. *The American phytopathological Society*. 74(3): 255-258.
- WATERWORTH, H.E. & KAPER. 1972. Purification and properties of carnation mottle virus and its ribonucleic acid. *Phytopathology*. 62: 959-964.
- WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The reability of molecular weight determination wy dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Biological Chemical*. 224: 4406 - 4412.

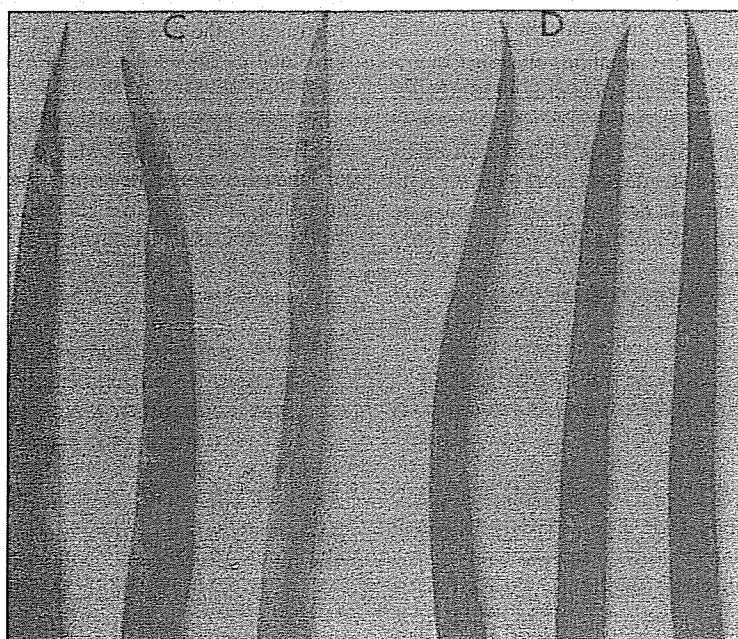
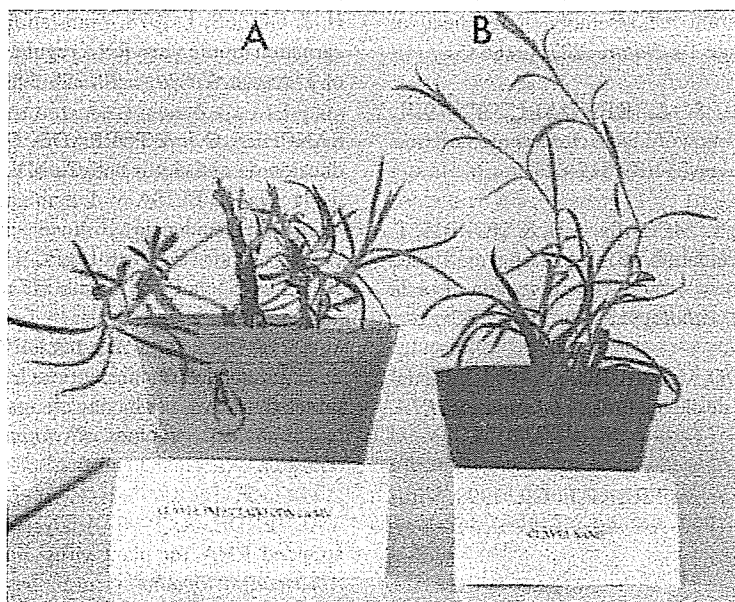


Figura 1. Plantas de clavel infectadas con CarMV. Planta infectada con CarMV. B. Planta sana. C. Hojas de clavel inoculadas con CarMV. D. Hojas de clavel sanas.

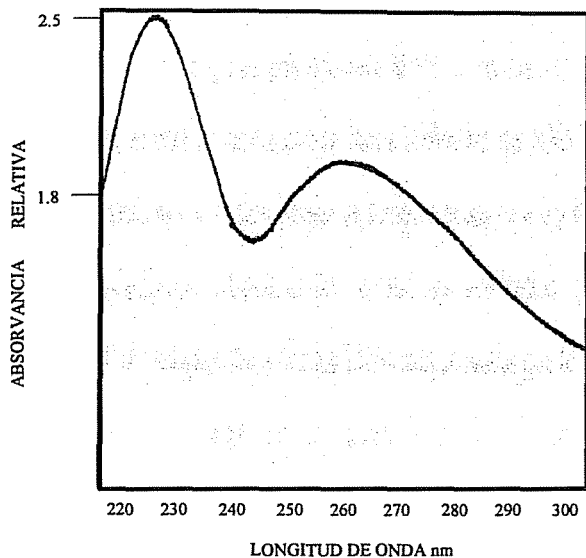


Figura 2. Espectro de absorción del CarMV. Las partículas purificadas fueron analizadas espectrofotométricamente entre 200-300 nm, en buffer Tris-HCl 0.01 M, pH 7.3, utilizando como blanco el mismo buffer.

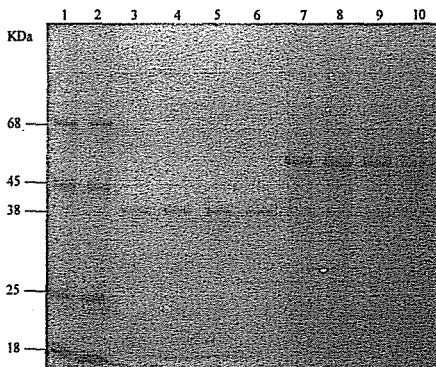


Figura 3. Electroforesis de la proteína estructural del CarMV. Carriles 1-2: Marcador de peso molecular; carriles 3-6: virus purificado: UN53, UN53, SB2, SB4; carriles 7-10: proteínas de tejido infectado: SB2, SB4, SB5, SB6. Las partículas virales se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.5%, a 15 mA constantes durante 1 hora. La proteína fue teñida con azul de Coomassie al 0.15%.

UN = Aislamientos del invernadero de la Universidad Nacional; SB = Aislamientos de la Sabana de Bogotá.

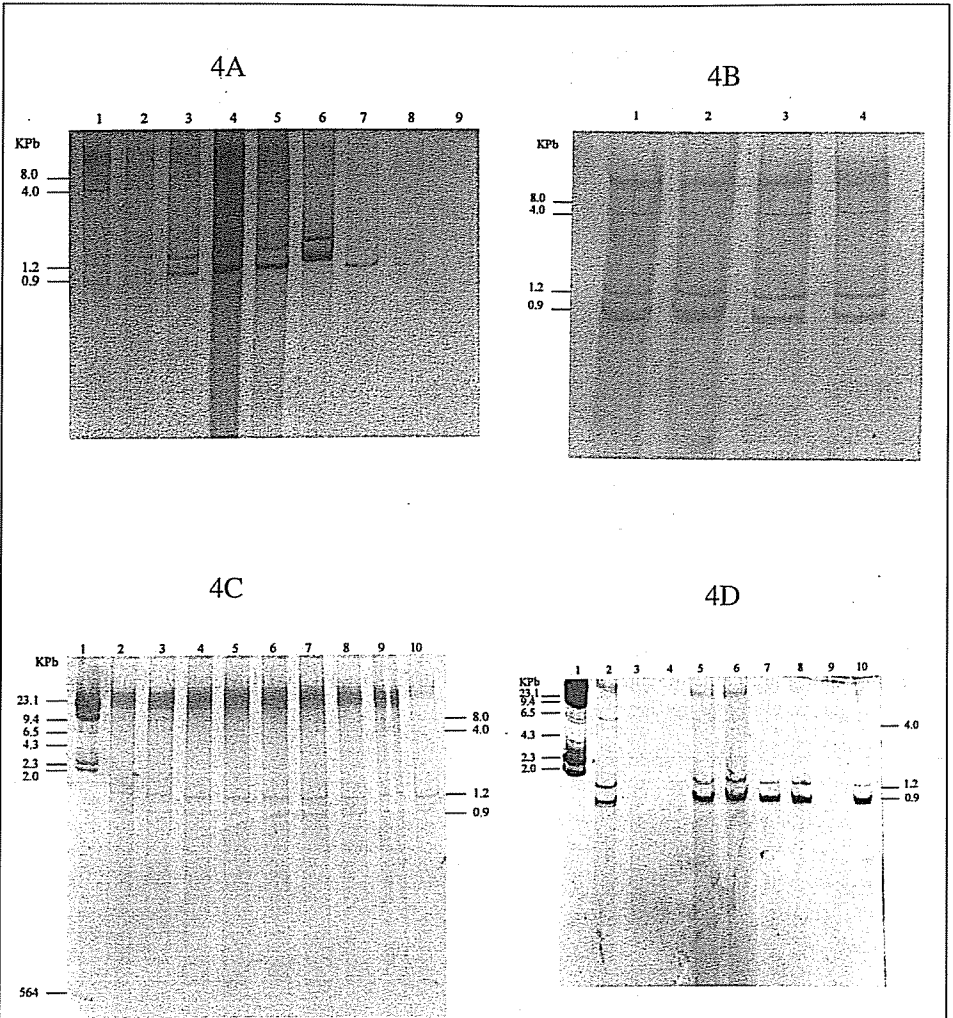


Figura 4. Patrón de bandas de dsRNA de aislamientos de CarMV. A: Carriles 1-9: aislamientos: SB18, SB19, SB20, SB21, SB22, SB26, SB27, SB28, SB3. B: Carriles 1-4: aislamientos: SB7, SB8, SB9, SB10. C: Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-10: aislamientos: SB11, SB12, SB13, SB14, SB15, SB16, SB17, SB18. D: carril 1: marcador de peso molecular; carriles 3-4: aislamientos libres de virus; carriles 2, 5-10: aislamientos: SB2, SB4, SB5, UN53, UN53, UN53, UN53. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, 100 v constantes durante 3.5 horas. Tinción con nitrato de plata.

UN = Aislamientos del invernadero de la Universidad Nacional;

SB = Aislamientos de la Sabana de Bogotá.

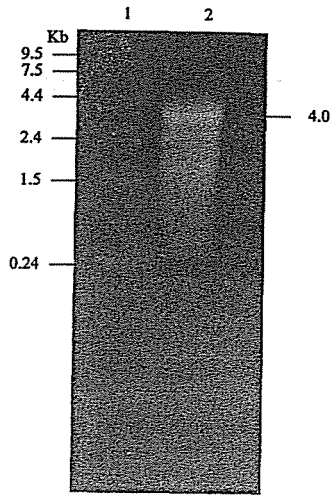


Figura 5. Electroforesis del RNA genómico de CarMV.

Carril 1: marcadores de peso molecular, "RNA Ladder" (Gibco-BRL). Carril 2: RNA genómico de CarMV SB32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, a 50 v constantes durante 1 h. Tinción con bromuro de etidio.

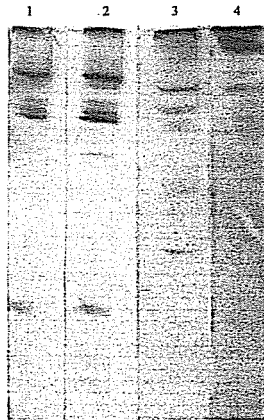


Figura 6. Electroforesis de RNA genómico digerido con RNasa T1. Carriles 1-2: RNA total de tabaco digerido con RNasa T1, Carriles 3-4: RNA genómico de CarMV digerido con RNasa T1 SB11, SB26. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en buffer citrato de sodio 0.025 M, pH 3.5. Electroforesis a 35 mA constantes por lámina de gel, durante 1.5 h. Tinción con nitrato de plata.

SB = Aislamientos de la Sabana de Bogotá.