



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA**  
**EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



"Caracterización biológica del *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa*: transmisión por semilla, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales".

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN  
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

GUSTAVO DOMÍNGUEZ DURÁN

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO DICIEMBRE DE 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 12 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Gustavo Domínguez Durán alumno del Programa de Maestría en recursos naturales y medio ambiente con número de registro B091641, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Jesús Méndez Lozano y cede los derechos del trabajo intitulado "Caracterización biológica del Virus del mosaico de la sida de Sinaloa: transmisión por semilla, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jmlozano@gmail.com y/o tavoz8@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

\_\_\_\_\_  
Gustavo Domínguez Durán

Nombre y firma



SIP-13-BIS

## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa. a 23 de Noviembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión Extraordinaria No. 18 celebrada el día 23 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Domínguez</u>	<u>Durán</u>	<u>Gustavo</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)
Con registro: <u>B</u> <u>0</u> <u>9</u> <u>1</u> <u>6</u> <u>4</u> <u>1</u>		

Aspirante de: **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
"Caracterización biológica del *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa*: transmisión por semilla, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales."

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Determinar la transmisión por semillas del *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa* (SiMSV).  
Determinar la presencia de SiMSV en cultivos de interés agrícola en el norte del estado de Sinaloa.  
Determinar la presencia de partículas subvirales asociadas a SiMSV en su hospedante natural.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Jesús Méndez Lozano

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
Las instalaciones del CIIDIR-SINALOA

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios bajo el proyecto SIP 20101498 "Determinación del uso potencial de micorrizas en tomate (*Lycopersicon esculentum*) como mecanismo para inducir tolerancia contra virus transmitidos por mosca blanca del género Begomovirus"

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director de Tesis

Dr. Jesús Méndez  
Lozano

Aspirante

Gustavo Domínguez Durán

Presidente del Colegio

Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14-BIS

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 9:00 horas del día 12 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

"Caracterización biológica del Virus del mosaico de la sida de Sinaloa: transmisión por semilla, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales"

Presentada por el alumno:

Domínguez  
Apellido paterno

Durán  
Apellido materno

Gustavo  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	6	4	1
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de: **MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


**LA COMISIÓN REVISORA**

Director de tesis

  
Dr. Jesús Méndez Lozano

  
Dra. Norma Elena Leyva López

  
Dra. María Elena Santos Cervantes

  
Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

  
Dra. Karina Hernández Ibarra

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
Dr. Jorge Montiel Montoya



**CIIDIR - IPN**  
CIUDAD SINALOA  
ESTADO SINALOA

## ÍNDICE GENERAL

	PAG.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2.1. IMPORTANCIA DE LA AGRICULTURA EN MÉXICO .....	3
2.2. LOS VIRUS .....	3
2.2.1 MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE LOS VIRUS .....	4
2.2.2. TRANSMISIÓN POR PROPAGACIÓN VEGETATIVA.....	4
2.2.3. TRANSMISIÓN POR SEMILLA Y POLEN .....	4
2.2.4. TRANSMISIÓN POR VECTORES .....	5
2.2.5. TIPOS DE TRANSMISIÓN POR VECTORES .....	5
2.3. LOS GEMINIVIRUS .....	6
2.3.1. LA FAMILIA <i>GEMINIVIRIDAE</i> .....	7
2.3.2. EL GÉNERO <i>MASTREVIRUS</i> .....	7
2.3.3. EL GÉNERO <i>CURTOVIRUS</i> .....	7
2.3.4. EL GÉNERO <i>TOPOCUVIRUS</i> .....	7
2.3.5. EL GÉNERO <i>BEGOMOVIRUS</i> .....	8
2.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS <i>BEGOMOVIRUS</i> .....	8
2.5. SINTOMATOLOGÍA.....	9
2.6. <i>BEGOMOVIRUS</i> EN MALEZAS.....	10
2.6.1. EL GÉNERO <i>SIDA</i> .....	11
2.7. PARTÍCULAS SUBVIRALES ASOCIADAS A ENFERMEDADES VIRALES. .....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14

<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>6.1. EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL .....</b>	<b>17</b>
<b>6.1.1. ELECTROFORESIS PARA LA VISUALIZACIÓN DEL DNA.....</b>	<b>17</b>
<b>6.1.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	<b>18</b>
<b>6.1.3. DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS MEDIANTE PCR Y PCR ANIDADO. ..</b>	<b>18</b>
<b>6.1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS POR PATRÓN DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP). .....</b>	<b>19</b>
<b>6.1.5. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR ANIDADO.....</b>	<b>20</b>
<b>6.1.6. CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>6.2. TRANSFORMACIÓN EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO (MINIPREPS).....</b>	<b>22</b>
<b>6.2.2. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO PARA SECUENCIACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>6.2.3. CUANTIFICACIÓN DE DNA.....</b>	<b>23</b>
<b>6.2.4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS. ....</b>	<b>23</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>7.1 COLECTA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>7.3 DETECCIÓN DE SIMSV MEDIANTE PCR ANIDADO EN PLANTAS <i>DE SIDA ACUTA IN VITRO</i>. .....</b>	<b>27</b>
<b>7.4. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> POR PCR-RFLP´S. ....</b>	<b>27</b>

<b>7.5. CLONACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS BEGOMOVIRUS DETECTADOS EN PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i>.</b> .....	<b>30</b>
<b>7.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y SU RELACIÓN CON OTROS BEGOMOVIRUS</b> .....	<b>30</b>
<b>7.7. COLECTA DE PLANTAS DE TOMATE Y CHILE EN EL NORTE DE SINALOA.</b> .....	<b>32</b>
<b>7.8. DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE TOMATE Y CHILE DE CAMPO MEDIANTE PCR ANIDADO.</b> .....	<b>35</b>
<b>7.9 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS EN TOMATE Y CHILE DE CAMPO MEDIANTE PCR-RFLP.</b> .....	<b>36</b>
<b>7.10. CLONACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS BEGOMOVIRUS DETECTADOS EN TOMATE Y CHILE</b> .....	<b>38</b>
<b>7.11. TRANSMISIÓN DE SIMSV MEDIANTE INJERTO A PLANTAS DE TOMATE Y CHILE.</b> .....	<b>41</b>
<b>VIRUS A PLANTAS DE CHILES Y TOMATE DE MANERA EXPERIMENTAL, ESTO CON LA FINALIDAD DE DETERMINAR CAPACIDAD DE TRANSMISIÓN Y ANALIZAR SU SINTOMATOLOGÍA EN AMBAS PLANTAS, LIBRES DE OTROS PATÓGENOS.</b> .....	<b>41</b>
<b>7.11.1. OBTENCIÓN DE INÓCULO SIMSV DE PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA</i>.</b> .....	<b>41</b>
.....	<b>42</b>
<b>7.11.2. DETECCIÓN DE SIMSV EN PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA</i> DE CAMPO MEDIANTE PCR ANIDADO.</b> .....	<b>43</b>
<b>7.11.3. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE <i>SIDA</i> DE CAMPO MEDIANTE PCR-RFLP.</b> .....	<b>43</b>
<b>7.11.4. SINTOMATOLOGIA OBSERVADA EN PLANTAS DE CHILE Y TOMATE INJERTADAS <i>SIDA ACUTA</i>.</b> .....	<b>46</b>

<b>7.11.5. DETECCIÓN DE SIMSV EN PLATAS DE CHILE Y TOMATE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i> MEDIANTE PCR ANIDADO.....</b>	<b>48</b>
<b>7.11.6. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE CHILE Y TOMATE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i> MEDIANTE PCR-RFLP..</b>	<b>50</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>55</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
FIGURA 1. SINTOMATOLOGÍA DE LOS BEGOMOVIRUS OBSERVADA EN CAMPO.....	10
FIGURA 2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE UNA PARTÍCULA SUBVIRAL. ..	13
FIGURA 3. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> . .....	26
FIGURA 4. ELECTROFORESIS DEL DNA TOTAL EXTRAÍDO DE PLANTAS GERMINADAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> . .....	26
FIGURA 5. DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> MEDIANTE PCR ANIDADO .....	27
FIGURA 6. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS POR PCR-RFLP'S DE PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA</i> . .....	29
FIGURA 7. ANÁLISIS DE RESTRICIÓN CON <i>ECORI</i> DE LAS CLONAS OBTENIDAS DE PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> .....	30
FIGURA 8. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DE LAS CLONAS OBTENIDAS CON SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GENE BANK. ....	31
FIGURA 9. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA DE LAS CLONAS OBTENIDAS CON SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GENE BANK.....	31
FIGURA 10. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA REP DE LAS CLONAS OBTENIDAS CON SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GENE BANK ...	32
FIGURA 11. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DEL FRAGMENTO COMPLETO AMPLIFICADO (REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE, REGIÓN INTERGÉNICA Y N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE REPLICACIÓN, REP) DE LAS CLONAS OBTENIDAS CON SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GENE BANK.....	32

<b>FIGURA 12. SINTOMATOLOGÍA PRESENTADA EN LAS PLANTAS DE TOMATE.....</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 13. SINTOMATOLOGÍA PRESENTADA EN LAS PLANTAS DE CHILE. ....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 14. DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN PLANTAS DE TOMATE Y CHILE DE CAMPO MEDIANTE PCR ANIDADO. ....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 15. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS POR PCR-RFLP OBTENIDOS DE LAS PLANTAS DE CHILE Y TOMATE.....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 16. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEL FRAGMENTO DE 650 PB DE CLONAS OBTENIDAS DE MUESTRAS DE CAMPO.....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 17. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE OBTENIDAS DE PLANTAS DE CHILE Y TOMATE DE CAMPO.....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 18. ÁRBOL FILOGENÉTICO. COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN INTERGÉNICA OBTENIDAS DE PLANTAS DE CHILE Y TOMATE DE CAMPO.....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 19. SINTOMATOLOGÍA PRESENTADA EN LAS PLANTAS DE <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURA 21. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS POR PCR-RFLP OBTENIDOS DE LAS PLANTAS <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 22. INJERTO DE LAS PLANTAS DE CHILE CON <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 23. SÍNTOMAS EN PLANTAS DE CHILE CON <i>SIDA ACUTA</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURA 24. SÍNTOMAS EN PLANTAS DE TOMATE CON <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 25. DETECCIÓN DE SIMSV EN PLANTAS DE CHILE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i> MEDIANTE PCR ANIDADO. ....</b>	<b>49</b>

<b>FIGURA 26. DETECCIÓN DE SIMSV MEDIANTE PCR ANIDADO EN PLANTAS DE CHILE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 27. DETECCIÓN DE SIMSV MEDIANTE PCR ANIDADO EN PLANTAS DE TOMATE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 28. DETECCIÓN DE SIMSV MEDIANTE PCR ANIDADO EN PLANTAS DE TOMATE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 29. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS POR PCR-RFLP OBTENIDOS DE LAS PLANTAS DE CHILE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 30. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BEGOMOVIRUS POR PCR-RFLP OBTENIDOS DE LAS PLANTAS DE TOMATE INJERTADAS CON <i>SIDA ACUTA</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 31. DETECCIÓN DE PARTÍCULAS SUBVIRALES ASOCIADAS A SIMSV MEDIANTE PCR.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	PAG.
CUADRO 1. REACCIÓN DE CLONACIÓN CON EL VECTOR PGEM-T EASY ...	21
CUADRO 2. SECUENCIAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS.....	24
CUADRO 3. TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>SIDA ACUTA IN VITRO</i> .....	25
CUADRO 4. MUESTRAS COLECTADAS DE CHILE Y TOMATE EN EL NORTE DE SINALOA. ....	35
CUADRO 5. TRANSMISIÓN POR INJERTO DE SIMSV DE PLANTAS DE CAMPO A CHILE Y TOMATE. ....	46

## **GLOSARIO**

**Ácido Nucleico.** Molécula polimérica compuesta de unidades nucleotídicas unidas entre sí por enlaces fosfodiéster. Las cadenas de DNA (ácido desoxirribonucleico) y de RNA (ácido ribonucleico) difieren en que contienen desoxirribosa y ribosa, respectivamente.

**Adenina (A).** Base púrica encontrada en DNA y RNA. En secuencias de DNA, adenina se aparea con timina.

**Aminoácido.** Monómero que al unirse covalentemente mediante el enlace peptídico forma cadenas polipeptídicas. La secuencia de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas está determinada por el código genético.

**Amplificación.** Aumento del número de copias de un gen o de una secuencia de DNA.

**RNA (ácido ribonucleico).** Polímero compuesto de cuatro unidades moleculares diferentes denominadas ribonucleótidos (abreviados A, G, C y U), que contienen el azúcar ribosa.

**Cápside.** Cubierta proteica de un virus.

**Cebador (“primer”).** Secuencia corta de nucleótidos que proporciona el punto de iniciación para que las DNA polimerasas copien una secuencia de nucleótidos y elaboren una doble cadena.

**Citosina (C).** Base pirimídica que se encuentra en DNA y RNA. En secuencias de doble hebra se une mediante tres enlaces por puente de hidrógeno con G.

**Clonamiento de Genes.** Involucra la modificación del genoma de una célula(s) por incorporación de un gen de interés. Las etapas comprenden la obtención del gen de interés, unión a vector de clonación, introducción a célula(s) huésped y selección de células huésped recombinantes.

**Cromosomas.** Estructuras presentes en el núcleo celular, que contienen una doble hélice de DNA muy condensada asociada a proteínas

**DNA (ácido desoxirribonucleico).** Polímeros compuestos de cuatro unidades moleculares diferentes, denominadas desoxirribonucleótidos (abreviados A, G, C y T) que contienen el azúcar desoxirribosa. Los genes son parte de las moléculas de DNA y su codificación viene dada por la secuencia de los desoxirribonucleótidos. de laboratorio.

**dsDNA.** Molécula de DNA de doble hebra.

**ssDNA.** Molécula de DNA de hebra simple.

**asaDNA (deoxirribonucleasa).** Clase de enzima que rompe los enlaces fosfodiésteres del DNA originando fragmentos oligonucleotídicos.

**DNA Ligasa.** Enzima que une extremos de las cadenas de DNA, mediante la formación de enlaces fosfodiéster entre ellos.

**DNA Polimerasa.** Enzima que agrega nucleótidos a una cadena de DNA en sentido de 5' a 3', durante su replicación. Como molde de copiado la enzima usa una monohebra de DNA.

**DNA Recombinante.** Molécula de DNA que contiene segmentos de distintos orígenes (pueden ser biológicos o sintetizados químicamente). Para su generación los segmentos de DNA se unen utilizando procedimientos

**Desnaturalización de los Ácidos Nucleicos.** Se refiere a la conversión de secuencias de DNA doble hebra o RNA doble hebra a secuencias de hebra simple. Generalmente ocurre por calentamiento.

**Desoxirribonucleótido.** Monómero del DNA formado por la unión covalente de una base (A,T,G,C) + azúcar (2' deoxirribosa) + fosfato.

**Didesoxinucleótido.** Nucleótido modificado que en posición 3' ha perdido el grupo OH. Se simboliza como ddNTP.

**EcoRI.** Enzima de restricción obtenida de *E. coli*. Reconoce la secuencia palíndromo GAATTC y produce cortes de tipo escalonados (entre G y A).

**Electroforesis.** Método de separación de moléculas consistente en someter la mezcla a un campo eléctrico de manera que las moléculas migrarán más o menos

según su tamaño y su carga eléctrica. Se puede utilizar para separar o purificar proteínas o fragmentos de RNA o DNA.

**Gen.** Unidad de herencia que especifica un RNA. Un gen también contiene regiones intrónicas y regiones que controlan la transcripción.

**Genoma.** Toda la información genética contenida en una célula, incluyendo a los genes y a otras secuencias de DNA.

**Guanina (G).** Base púrica presente en DNA y RNA. Se aparea con citosina mediante tres enlaces por puente de H.

**In Vitro.** Significa que ocurre fuera del organismo vivo, en un ambiente artificial.

**Kilobase (Kb).** Unidad de longitud de ácidos nucleicos correspondiente a 1000 nucleótidos. Se abrevia como kb para ácidos nucleicos de hebra simple hebra.

**Mapa de restricción.** Conjunto de puntos de corte, que un DNA (desde el de un plásmido hasta un cromosoma entero) tiene para un conjunto de endonucleasas de restricción.

**Nucleótidos.** Unidades o eslabones moleculares elementales que, enlazados uno a continuación de otro, constituyen los ácidos nucleicos. Químicamente están formados por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada.

**Oligonucleótido.** Secuencia lineal de nucleótidos (hasta 20).

**Pares de Bases (pb).** Pares de bases (nucleótidos) complementarias en una molécula de DNA o RNA.

**PCR (del inglés “polymerase chain reaction). Reacción en cadena de la Polimerasa.** Sistema de amplificación genética que permite obtener millones de copias de un determinado fragmento de DNA o RNA del que simplemente se conozcan dos secuencias que lo flanqueen.

**Plásmido.** Molécula de DNA cerrada, circular, que se multiplica de forma autónoma en la célula y puede pasar de unas células a otras. Es bastante común en las bacterias. Muchos plásmidos, modificados genéticamente, se utilizan como vectores en la clonación molecular.

**Polimerasa (de DNA o RNA).** Enzimas encargados de sintetizar DNA o RNA a partir de una cadena simple de DNA o RNA que actúa como molde.

**Recombinación.** Intercambio de uno o varios fragmentos de DNA entre dos moléculas distintas de manera que las resultantes poseen secuencias de las dos originales. La recombinación génica se produce de forma natural en varias situaciones, como es la generación de las células sexuales.

**Replicación de DNA.** Síntesis de dos nuevas dobles hélices de DNA, a partir de una doble hélice. Cada hebra de la doble hélice original actúa de molde para la síntesis de una hebra complementaria.

**Secuencia.** Forma en que se suceden o encadenan los nucleótidos a lo largo de las cadenas de DNA o RNA (o los aminoácidos en las cadenas proteínicas).

**Termociclador.** Instrumento que permite ejecutar en forma automatizada la técnica de PCR. Mediante la aplicación de ciclos térmicos secuenciales ocurre la desnaturalización, hibridación y síntesis de DNA.

**Timina.** Timina es una de las cuatro bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos del DNA que casi siempre se empareja con la adenina.

**Transformación.** Conjunto de cambios que una célula sufre cuando se convierte en cancerosa. También se aplica a las bacterias cuando incorporan un gen exógeno.

**Vector.** Molécula de DNA que puede unirse a un segmento de DNA de distinto origen y que puede ser introducida después en una célula en la que es capaz de replicarse.

**Vector de Clonación.** Molécula de DNA capaz de replicarse autónomamente en la célula huésped y en la cual se incorpora covalentemente el fragmento de DNA a clonar.

**Vortex.** Aparato que sirve para agitar vigorosamente.



## RESUMÉN

En México la horticultura es una de las actividades de primordial importancia, tanto por la generación de divisas como por la generación de empleos; sin embargo, existen diferentes plagas y enfermedades que afectan su producción, siendo estas últimas el principal factor limitante, destacando las inducidas por los virus por su impacto en rendimiento y calidad en frutos. Los begomovirus infectan plantas dicotiledóneas, son transmitidos por mosquitos blancos y su genoma puede ser bipartito o monopartito. Las malezas desempeñan un rol importante como fuente de inóculo primario, en la propagación y difusión de los virus que afectan a las plantas cultivadas. El género *Sida* es un grupo de malezas ampliamente distribuidas en el mundo. Recientemente, en Sinaloa se identificó y se secuenció a un nuevo begomovirus infectando *Sida rhombifolia* denominado *Virus del mosaico de la sida Sinaloa* (*Sida mosaic Sinaloa virus*, SiMSV). Así mismo, se ha observado que begomovirus aislados de malezas en el viejo mundo están asociados con una clase de moléculas subvirales de ssDNA conocidos como betasatélites u alfasatélites (tamaño de 1,4 kb) los cuales tienen la mitad del tamaño del genoma de su begomovirus. Los betasatélites son requeridos por el virus para producir los síntomas típicos de la enfermedad en su hospedante natural. Los alfasatélites son indispensables para la infección del virus y aparentemente no juegan ningún papel importante en la etiología de las enfermedades. Por lo antes mencionado el presente trabajo tiene como objetivo la caracterización biológica del *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa*: transmisión por semilla, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales. Para abordar el trabajo se colectaron muestras de tejido foliar y semillas de *Sida* así como muestras de tejido foliar de tomate y chile durante los años agrícolas 2010-2011. En los resultados se muestra evidencia de *Virus del mosaico de la sida Sinaloa* de transmitirse a través de la semilla. Adicionalmente, se logró detectar la presencia de dicho virus en cultivos de tomate y chile. Este hecho, relacionado a los nuevos brotes de enfermedades en tomate en el estado. El análisis filogenético del SiMSV transmitido por semilla y detectado en campo muestran homologías de 96.2 y 87.8% respectivamente. Finalmente, no se detectó moléculas subvirales asociadas a SiMSV en su hospedante natural en Sinaloa.

## ABSTRACT

The Mexican agriculture constitutes the main source of food and substantially serve to provides great export. However, there are various pests and diseases that affect production, among them the viruses are important by their impact on fruit yield and quality. The genus begomovirus infect dicotyledonous plants, are transmitted by whiteflies and the virus type member is *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Most begomoviruses genus have bipartite genome but some of the has monopartite.. Weeds play an important role as a source of primary inoculum in the spread and dissemination of viruses affecting the cultivated plants. Many species have been implicated as hosts of begomovirus in several countries. Gender sida is a group of weeds that are distributed in both the old and the new world. In Sinaloa recently identified and sequenced a new begomovirus infecting *Sida rhombifolia* called Sinaloa Mosaic Virus Sida, SiMSV. Recently, most originating in the Old World begomoviruses have been shown to be associated with a class of satellites known as betasatellites ssDNA which are half the size of its helper begomovirus (1.4 kb) and are required for virus help produce the typical symptoms of the disease in their original hosts. In adition betasatellites, many diseases are associated with begomovirus third single-stranded DNA which was called alphasatellite. However, alphasatellites are essential for virus infection and appears not to play role in the etiology of diseases with which they are associated. It is above aims of this study the biological characterization of Sinaloa Mosaic Virus Sida: seed transmission, host range and association with subviral particles. To meet this goal, the process used molecular techniques such as PCR, cloning RFLP. The result was the determination of the ability to spread through seed *Sinaloa mosaic virus sida*, which also detected the presence of this virus in peppers and tomatos crops in the northern state of Sinaloa, was determined experimentally the ability to infect SiMSV peppers and tomatos by grafting, this is corroborated by the identification by RFLP and was not detected the presence of subviral particles alpha and betasatellites its natural host.associated with SiMSV

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate con casi 4.4 millones de hectáreas cultivadas y un volumen de producción mundial en el 2009 de 152, 956,115 toneladas, y el cultivo de chile con una producción en el 2009 de 25, 649,669 toneladas (FAOSTAT, 2009), fueron señalados dentro de las principales hortalizas con respecto a la generación de empleos y riquezas para el estado y el país. Dentro de los principales problemas que afectan considerablemente la producción de estos cultivos se encuentran las enfermedades ocasionadas por virus siendo estos uno de los principales limitantes en producción de hortalizas.

Las malezas desempeñan un rol importante como fuente de inóculo primario, en la propagación y difusión de los virus que afectan a las plantas cultivadas, ellas pueden cumplir tres roles, no excluyentes, en la epidemiología de estas enfermedades: servir como reservorio de los virus, como reservorio de los insectos vectores, o de ambos a la vez (Creamer *et al.*, 1996).

Para que una maleza sea importante como fuente de infección primaria de un virus, debe constituir una proporción relevante de la flora silvestre de dicha área y estar abundantemente infectada por el virus (Faan y Johnson, 1951; Bruckart y Lorbeer, 1976; Cho *et al.*, 1986).

Las malezas que presentan crecimiento todo el año pueden actuar como reservorios naturales de virus y focos de infección entre estaciones de cultivo, permitiendo la sobrevivencia de éstos en ausencia de cultivos susceptibles en el campo. (Walker, 1925; Marcia E. Roye *et al.* 1997).

Desde principios del siglo XX, se ha acumulado una extensa bibliografía referente a este tema, lo que revela la gran importancia que se asigna a las malezas como fuente primaria de propagación de virus en los países desarrollados. En México existen pocos trabajos de identificación de virus en malezas y cabe señalar que una de las malezas más ampliamente distribuidas en el país es *Sida spp.*

En Sinaloa se han detectado diversas especies de malezas como hospedantes de virus fitopatógenos presentes en cultivos de hortalizas que pueden estar cumpliendo un rol epidemiológico importante en esos cultivos (Méndez-Lozano, Datos no publicados).

En el grupo de trabajo del Laboratorio de Virología se ha orientado esfuerzos en la identificación de virus nativos de malezas y la búsqueda en cultivos de interés comercial en la región. En el 2006, se caracterizó molecularmente un nuevo virus detectado en la maleza *Sida rhombifolia*, denominado *Sida mosaic Sinaloa virus* (SiMSV). Durante el 2010 se presentó un brote de enfermedades virales con un impacto importante y por su etiología asociadas a begomovirus. Al realizar diversas colectas se detectó a SiMSV infectando por primera vez cultivos de tomate en el norte de Sinaloa. El presente trabajo de investigación tiene como finalidad lograr una mayor comprensión de aspectos biológicos del SiMSV y sus implicación en las enfermedades virales en tomate existentes en la actualidad. El papel de las malezas como hospedantes de virus y su relación con la dispersión se considera de primordial importancia para lograr un mejor manejo integrado de virus en la región.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Importancia de la agricultura en México**

En el 2009, México ocupó el décimo puesto en la producción mundial de tomate con 2.5 millones de toneladas en un área de siembra de 99,088 ha (FAO, 2009). Si bien existe producción en todas las entidades del país, seis son las que concentran más del 69% de la producción nacional, estos estados son Sinaloa, Baja California, Michoacán, San Luis Potosí, Jalisco y Baja California. Sinaloa es el principal productor nacional, en 2010 se estima que produjo 680.78 mil toneladas (SIAP, 2010), lo que representa el 60.5% de la producción del país. Así mismo, México en dicho año ocupó el segundo lugar en la producción mundial de chile verde con un volumen de 1, 941,560 de toneladas en un área sembrada de 140,440 ha (FAO, 2009). En Sinaloa en el ciclo agrícola 2009-2010 se produjeron 618,110.17 toneladas (SIAP, 2010) lo cual significa el 67.5% de la producción nacional.

Aunque Sinaloa es el estado líder en la producción de hortalizas, su producción puede ser seriamente afectada por diversos factores abióticos como la temperatura, humedad, luz, oxígeno, contaminantes, etc. o por factores bióticos como bacterias, nematodos, insectos, fitoplasmas, hongos y virus (Benton, 2001; Agrios, 2005). El factor biótico más importante son las enfermedades causadas por los virus, los cuales son nucleoproteínas que se propagan solo en el interior de las células vivas las cuales tienen la capacidad de producir enfermedad en las plantas (Agrios, 2005; Rybicki, 2008).

### **2.2. Los virus**

El término virus involucra el significado de cualquier sustancia nociva, y eventualmente se utilizó para designar todas las infecciones causadas por microbios (Webster y Granoff, 1994). Sin embargo, según Stange (2006), el significado de virus en latín es veneno. Los virus fitopatógenos son partículas infectivas considerados parásitos intracelulares obligados, ya que para realizar su replicación necesitan de una célula hospedante. Se componen generalmente por

ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple y positiva (RNAss) y en algunos casos por ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadena simple o doble. Los virus normalmente están encapsulados en una capa proteica o lipoproteínas y no forman una estructura celular (Agrios, 2005).

### **2.2.1 Mecanismo de transmisión de los virus**

Los virus fitopatógenos no poseen capacidad de penetrar en la célula a través de la pared celular, por lo cual necesitan la ayuda de insectos vectores, tales como ácaros, nematodos y ciertos hongos habitantes de la rizosfera; sin embargo, también pueden transmitirse de planta a planta mediante diversas formas como la propagación vegetativa, mecánica a través de la savia, por medio de semillas y polen (Agrios, 2002; Hull, 2002; Madigan *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Transmisión por propagación vegetativa**

Es la forma más importante de transmisión y diseminación de virus en cultivos como papa, fresa, raíces, tubérculos tropicales, plátano, piña y árboles frutales injertados. La transmisión por injerto puede indicar la posible naturaleza viral de una enfermedad. En la transmisión por injerto el virus pasa del patrón al injerto o del injerto al patrón. Por lo que representa un mecanismo eficaz en plantas indicadoras y su utilización en programas de certificación, para verificar la presencia de virus en materiales que se pretenden usar como fuente de yemas para la propagación vegetativa. Es importante mencionar que la mayoría de los virus se mueven en forma sistémica en la planta, los órganos vegetativos usados para la propagación fácilmente se infectan con virus (Arauz, 1998).

### **2.2.3. Transmisión por semilla y polen**

Se conocen alrededor de 100 especies de virus transmitidas por semilla. La semilla puede portar el virus en el tegumento o en el embrión. La presencia del virus en el tegumento resulta de la infección del rudimento seminal de la planta madre. Este fenómeno puede ocurrir fácilmente, al haber conexiones vasculares entre el rudimento seminal y la planta madre. Sin embargo, pocos virus pueden sobrevivir la desecación de la testa al madurar la semilla. Una excepción es el

*Virus del mosaico del tabaco* (TMV). El virus puede llegar al embrión desde la planta madre si la infección de la célula madre de la megaspóra se da en forma temprana y también puede llegar por medio del polen de una planta enferma. Algunos virus transmitidos por polen pueden pasar de la flor a la planta madre sana infectándola (Agrios, 2005; Trigiano *et al.*, 2007).

#### **2.2.4. Transmisión por vectores**

La forma más común y eficiente de transmisión de virus en la naturaleza se da por medio de organismos vectores. Un organismo se considera vector si lleva el virus internamente de una planta a otra y su transmisión resulta de la alimentación del organismo en la planta. Así el concepto excluye el contacto casual, en el cual el virus puede ser llevado externamente y transmitido en forma mecánica (Arauz, 1998).

Los geminivirus se transmiten por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) o por algunos miembros de la familia *Cicadellidae* (Chicharritas); sin embargo, en el último decenio, su incidencia se ha incrementado alarmantemente, considerándola como la plaga del siglo (Morales y Anderson, 2001; Polston *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2003).

#### **2.2.5. Tipos de transmisión por vectores**

La transmisión de virus se puede dividir de acuerdo a la persistencia en el vector (el tiempo que tarda el vector en adquirir y transmitir el virus y el tiempo que este permanece dentro del vector. Se habla de transmisión no persistente si el virus es adquirido por el vector en un tiempo corto (segundos o pocos minutos), puede ser transmitido inmediatamente después de la adquisición y el insecto pierde rápidamente la capacidad de transmitir el virus. Por el contrario, la transmisión persistente presenta las siguientes características: requiere un tiempo largo de alimentación para que el vector adquiera el virus, presenta un periodo latente de doce o más horas desde el inicio de la alimentación en la planta enferma antes de que pueda ocurrir la transmisión en la planta sana y por último el vector retiene la capacidad de transmitir un virus por un tiempo prolongado, de al

menos una semana, pero que puede durar durante toda la vida del vector. Los virus semipersistentes tienen un comportamiento intermedio, requieren un tiempo de alimentación de minutos a horas, y los vectores pueden permanecer efectivos por tres o cuatro días. (Arauz, 1998; James y Keith, 2004).

La transmisión de los virus puede dividirse también de acuerdo con el comportamiento del virus dentro del vector. Si el virus es portado en las partes bucales, sin circular por la hemolinfa del insecto, se le llama portado en el estilete o estomodeo. Si el virus circula por la hemolinfa del insecto y es devuelto a las partes bucales a través de las glándulas salivales, el virus se denomina circulativo, y si se multiplica dentro del vector se le llama propagativo. Los virus no persistentes y semipersistentes se retienen en el estomodeo; los circulativos y propagativos son todos persistentes. En los casos de virus circulativos y propagativos puede haber transmisión transestadial, si pasan de un estadio del insecto al siguiente, sin eliminarse en la muda, y en algunos casos puede haber transmisión transovárica, en el cual el virus es pasado del vector a su descendencia (Arauz, 1998; James y Keith, 2004).

### **2.3. Los Geminivirus**

Existen antecedentes antiguos de enfermedades virales causadas por geminivirus, pero fue hasta 1894 cuando se dio a conocer el primer estudio sobre el mosaico de la yuca, enfermedad de importancia económica en África causada por el *Virus del mosaico africano de la yuca* (ACMV). En América, existen reportes desde la década de los 40's sobre la presencia de enfermedades transmitidas por mosca blanca, caracterizadas por producir arrugamientos y amarillamientos en plantas (Brown y Bird, 1992). Estos estudios sirvieron para que se reconociera oficialmente a los geminivirus como grupo taxonómico independiente (Goodman, 1977). En México, el primer trabajo sobre geminivirus describió una enfermedad en tomate con enchinamiento de las hojas, cuyo patógeno fue denominado *Virus del chino del tomate* (CdTV) (Gallegos, 1978). En el contexto global, América Latina ha sido la región más afectada en términos de números totales de geminivirus transmitidos por mosca blanca, número de cultivos afectados,



pérdidas en la producción y área desbastada por estos patógenos (Martínez *et al.*, 2003). Los geminivirus son fitopatógenos que pertenecen a la familia *Geminiviridae*. Su nombre deriva de la morfología de su partícula ya que ésta semeja dos poliedros regulares idénticos unidos (gemi = gemelos). El genoma de los miembros de esta familia se encuentra constituido por uno o dos moléculas de DNA de cadena sencilla (DNAcs) (Ruiz-Herrera *et al.*, 1997; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999).

### **2.3.1. La familia *Geminiviridae***

Los geminivirus pertenecen a la familia *Geminiviridae* que ha sido clasificada en cuatro géneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* y *Begomovirus*) con base en la organización genómica, el insecto vector y el rango de hospedante (Hull, 2002; Fauquet *et al.*, 2003 y 2005).

### **2.3.2. El género *Mastrevirus***

Es un grupo de virus que infectan a plantas monocotiledóneas, contienen un genoma monopartita, son transmitidos por chicharritas del género *Cicadulina mbila* de manera persistente circulativa no propagativa y presenta como miembro tipo al *Virus del estriado del maíz (Maize streak virus, MSV)* (Howell, 1984).

### **2.3.3. El género *Curtovirus***

Es un grupo de virus que infectan a plantas dicotiledóneas, contienen un genoma monopartita, son transmitidos por chicharritas del género *Circulifer tenellus* y presenta como miembro tipo al *Virus del enchinamiento del betabel (Beet curly top virus, BTCV)* (Duffus, 1993; Stanley *et al.*, 1986).

### **2.3.4. El género *Topocuvirus***

Es un grupo de virus que infectan a plantas dicotiledóneas, contienen un genoma monopartita, son transmitidos por la familia *Membracidae*, y presenta como único miembro (*Tomato pseudocurly top virus, TPTV*) (Kong, y Hanley-Browdoin, 2002).

### **2.3.5. El género *Begomovirus***

Es el único género reportado en México, es el más diversificado y distribuido por todo el mundo. Infecta a plantas dicotiledóneas, son transmitidos por mosquitos blancos y presenta como miembro tipo al *Virus del mosaico dorado del frijol* (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), al cual le deben su nombre. (Goodman, 1984). La mayoría tiene un genoma dividido en dos componentes bipartitas denominadas comúnmente DNA-A y DNA-B. Se ha mencionado que cada componente se encapsula independientemente en la partícula viral, de tal forma que se requieren las dos partículas para causar la infección (Goodman *et al.*, 1980). De todos los begomovirus reportados solamente TYLCV tiene un genoma monopartita, excepto para el *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* de Tailandia (*Tomato yellow leaf curl virus Thailand*, TYLCV TH) que tiene un genoma bipartita (Rochester *et al.*, 1994).

### **2.4. Organización Genómica de los *begomovirus***

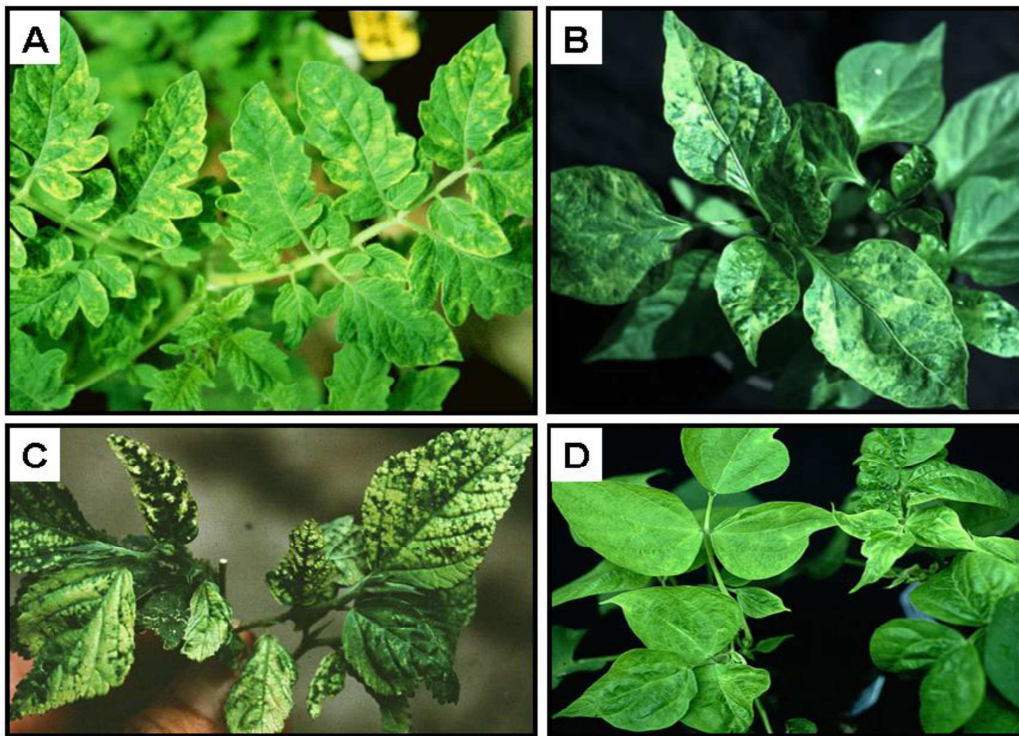
Existen alrededor de 196 especies de *Begomovirus* aceptadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2009). La mayoría de los *begomovirus* reportados en América o también denominados del nuevo mundo poseen genoma bipartita, el cual se compone por dos moléculas de DNA denominadas DNA-A y DNA-B con un tamaño de 2.5 a 2.8 Kb los cuales transcriben bidireccionalmente. En el DNA-A se identifican cinco marcos de lectura abierta, uno en el sentido del virión denominado AV1 y cuatro en la cadena complementaria denominados AC1, AC2, AC3 y AC4. En el DNA-B se han identificado dos marcos de lectura abierta, ambos en el sentido del virión denominados BV1 y BC1. El componente A contiene toda la información necesaria para la replicación y encapsulación del virus, mientras que el componente B codifica para proteínas involucradas en el movimiento viral célula-célula y a larga distancia.

Los begomovirus que carecen del DNA-B se les conocen como monopartitas y son comunes en el viejo mundo. Son pocos los begomovirus monopartitas reportados que han demostrado ser causantes de síntomas típicos

de la enfermedad silvestre con sólo el DNA-A, el *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV) y Virus del enrollamiento de la hoja del tomate (TYCV).

## **2.5. Sintomatología**

La sintomatología ocasionada por los begomovirus puede ser similar a la causada por las deficiencias nutricionales y a los inducidos por otras familias de virus, principalmente los *Potyvirus* y los *Tobomovirus*, lo cual ha dificultado el diagnóstico de estos virus mediante las técnicas convencionales. Estos síntomas varían enormemente dependiendo de cada hospedante, la etapa de infección, el tipo de begomovirus e incluso las condiciones ambientales (Ascencio-Ibañez, 1999). De forma general se pueden incluir los siguientes síntomas, ya sea aislado o en combinación: se detiene el desarrollo de la planta, dándole un aspecto achaparrado, las plantas presentan enrollamiento de hojas a lo largo del nervio principal, clorosis intensa en los bordes de las hojas, deformación y reducción de las hojas, aborto floral y frutos más pequeños de color pálido (Poltson y Anderson, 1997).



**Figura 1.** Sintomatología de los begomovirus observada en campo. A, tomate. B, chile. C, tomatillo. D, frijol. (Fuente: <http://gemini.biosci.arizona.edu/viruses/wmiv/index.htm>)

## 2.6. Begomovirus en malezas

Las malezas son plantas indeseables las cuales se encuentran alrededor los cultivos de interés y son reservorios de algunos virus de plantas (Bos, 1983; Creamer *et al.*, 1996). Muchas especies de malezas han sido relacionadas como hospedantes de begomovirus en varios países y están generalmente relacionadas a la familias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae* y *Fabaceae* (Morales y Anderson, 2001). Estudios realizados muestran que en el caso de begomovirus provenientes de malezas pueden ser transmitidos a los cultivos a través del insecto vector o mediante inoculación por injerto (Faria *et al.*, 2000; Frischmuth *et al.*, 1997; Morales y Anderson, 2001). Por lo que las malezas pueden ser una fuente de inóculo primaria de begomovirus hacia los cultivos de importancia económica (Assunção *et al.*, 2006). El *Virus del mosaico dorado de la Rhynchosia* (RhGMV) se describió por primera vez en Honduras en 1999 infectando *Rhynchosia mínima* (Potter *et al.*, 2000). *R. mínima* es una maleza común en Sinaloa y otras regiones del mundo. El RhGMV se transmite a frijol causando mosaicos, enanismo y

distorsión de la hoja (Roye *et al.*, 1997). En México, el RhGMV fue reportado por primera vez en Chiapas infectando tabaco y recientemente fue reportado infectando soya en el norte de Sinaloa (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2002, Méndez-Lozano *et al.*, 2006). El género *Sida* es un grupo de plantas silvestres que están distribuidas ampliamente en el mundo. Varios begomovirus han sido caracterizados de diferentes especies de *Sida* (Frischmuth *et al.*, 1997). En Costa Rica un begomovirus bipartita conocido como *Virus del mosaico dorado de la sida Costa Rica* (*Sida golden mosaic Costa Rica virus*, SiGMCRV) fue aislado y caracterizado de *Sida rhombifolia* (Hofer *et al.*, 1997). En Honduras dos begomovirus bipartitas conocidos como *Virus del mosaico dorado de la sida de Honduras* (*Sida golden Honduras mosaic virus*, SiGMHV) y *Virus de la vena amarilla de la sida* (*Sida yellow vein virus*, SiYVV) fueron aislados y caracterizados de *Sida rhombifolia* (Frischmuth *et al.*, 1997). En Brasil, dos componentes A (DNA-A) han sido secuenciados y caracterizados de *Sida sp* (Fauquet *et al.*, 2003). Recientemente en Sinaloa se identificó y se secuenció a un nuevo begomovirus infectando *Sida rhombifolia* llamado *Virus del mosaico de la sida Sinaloa* (*Sida mosaic Sinaloa virus*, SiMSV) (Perea-Araujo, 2006, Castillo *et al.*, 2006).

### 2.6.1. El Género *Sida*

*Sida* es la palabra griega para una planta de agua, pero la alusión a este género todavía no está clara. Según la base de datos del USDA ([www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov)), hay cerca de 27 especies de *Sida* en todo el mundo. *Sida* se encuentra generalmente en los caminos, jardines, terrenos baldíos, patios, márgenes de canales y campos de cultivo. La forma de crecer es propagación asexual mediante esquejes de tallos jóvenes verdes o por el germinado de las semillas bajo la luz directa del sol y clima seco. Las semillas de sida están cubiertas por una gruesa capa de un producto químico desconocido que bloquea la penetración del agua, dejando la semilla en un estado latente (Robinson EL., 1975).

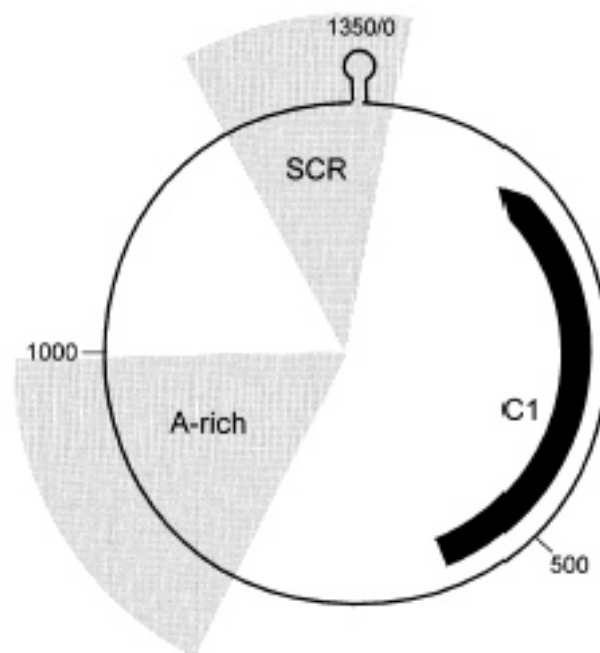
En 1975 Ghosal y su grupo fueron capaces de analizar *Sida cordifolia* químicamente. Los análisis químicos mostraron que *S.cordifolia* contiene tres tipos

de productos químicos:  $\beta$ -fenetilaminas ( $\beta$ -fenetilaminas, la efedrina y la pseudoefedrina), triptaminas carboxilado (S-(+ pascua metil)-N-methyltryptophane y hypaphorine) alcaloides, y quinazolina (vasicinona, vasicinol y vasicina). Por otra parte, las diferentes partes de la planta contienen las mismas sustancias, pero en diferentes concentraciones. En este sentido, se menciona que las concentraciones de estos químicos cambian con la edad de planta (Ghosal, *et al.*, 1975).

## **2.7. Partículas subvirales asociadas a enfermedades virales.**

Moléculas satélites de DNA circular de cadena sencilla los cuales contienen un único marco de lectura abierta (MLA), denominados DNA  $\beta$ , se han encontrado asociados con ciertas infecciones virales causadas por begomovirus monopartitas. Desde que se reportaron por primera vez en el año 2000, más de 100 DNA completos se han clonado y secuenciado (Mansoor *et al.*, 2006). Se componen de aproximadamente 1350 pb y dependen de su begomovirus asociado para su replicación y encapsidación. Los DNA  $\beta$  potencian la sintomatología y ayudan al begomovirus asociado para aumentar su concentración viral en algunos hospedantes. El proceso mediante el cual los DNA  $\beta$  regulan la patogenicidad es desconocida, pero podría afectar a la replicación del virus asociado para facilitar su propagación en un mayor rango de hospedantes o por el silenciamiento de genes supresión (Saunders *et al.*, 2000). El DNA  $\beta$  codifica la proteína bC1, es el determinante tanto de la patogenicidad como de la supresión del silenciamiento génico (Briddon y Stanley, 2006). Dependiendo del begomovirus particular, cinco proteínas diferentes están involucradas en el transporte del virus a través de las plantas hospederas: la proteína de la cápside (PC), la proteína de transporte nuclear (PTN), la proteína de movimiento (PM), la proteína C4 y la proteína V1 (Rojas *et al.*, 2005). A diferencia de begomovirus monopartitas, el PC de begomovirus bipartita no es necesaria para el movimiento célula a célula o de larga distancia. Para begomovirus bipartita, el movimiento célula a célula es realizado por dos proteínas codificadas por el componente DNA-B, PTN y PM. En el caso de los begomovirus monopartitas, dos proteínas han sido implicadas en el movimiento célula a célula, la V1 y C4 (Jupin *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 2001). En adición a los betasatélites, muchos de los complejos begomovirus-betasatélite han

sido asociados con un tercer componente de DNA de cadena sencilla al cual se le ha denominado alfasatélite (Bridon *et al.*, 2010). Sin embargo, los alfasatélites son indispensables para la infección viral y aparentemente no juegan un rol significativo en la etiología a las enfermedades a las cuales se les asocia (Mansoor *et al.*, 1999). Recientemente, en Venezuela se detectó la primera asociación de un *begomovirus* bipartita con un alfasatélite en infección natural en plantas de sandía (Romay *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Organización genómica de una partícula subviral.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En Sinaloa, los cultivos del chile y tomate representan una gran derrama socioeconómica a lo largo del estado; sin embargo, la producción se ve seriamente afectada debido a las enfermedades causadas por begomovirus. En el laboratorio de Virología del CIIDIR-IPN se han realizado trabajos de investigación encaminados a la caracterización de las enfermedades virales en diferentes cultivos, entre los begomovirus identificados se encuentran TYLCV, PHYVV, PepGMV, CdTV que han estado presentes por décadas en cultivos de tomate y chile. En el 2006, se caracterizó molecularmente un nuevo virus detectado en la maleza *Sida rhombifolia*, denominado *Sida mosaic Sinaloa virus* (SiMSV). Las malezas desempeñan un rol importante como fuente de inóculo primario, en la propagación y difusión de los virus que afectan a las plantas cultivadas. En este sentido, el género *Sida* es una malezas ampliamente distribuida en el estado de Sinaloa y se puede considerar de alto riesgo en la dispersión del virus. Durante el 2010 se presentó un brote de enfermedades virales con un impacto importante y al realizar diversas colectas se detectó a SiMSV infectando por primera vez cultivos de tomate en el norte de Sinaloa. Por lo que generar información que permita una mayor comprensión de los aspectos biológicos del SiMSV y sus implicación en las enfermedades virales en la horticultura regional permitirá un manejo integrado de las enfermedades.



#### **4. HIPÓTESIS**

El *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa* es capaz de transmitirse por semilla en su hospedante natural y se encuentra asociado a enfermedades virales en cultivos de interés agrícola.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad del *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa* de transmitirse por semilla en su hospedante natural, rango de hospedantes y asociación con partículas subvirales.

#### **5.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Determinar la capacidad de transmisión por semilla de SiMSV como fuente de dispersión en campo.
- ❖ Determinar el rango de hospedantes de SiMSV en cultivos de importancia comercial.
- ❖ Analizar la presencia de moléculas subvirales DNA alpha y betasatélites asociadas SiMSV.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Extracción de DNA total**

La extracción de DNA total se realizó mediante el procedimiento del CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio) al 3% (Zhang *et al.*, 1998). Para cada muestra se utilizó aproximadamente 0.3 g de tejido joven, el cual se maceró con un pistilo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía 200 µl de buffer CTAB al 3 % (1.4 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.2% β-mercaptoetanol), precalentado a 60 °C, se adicionó 600 µl del mismo buffer. Posteriormente se incubó la muestra a 60 °C por 30 minutos, agitándose por inversión cada 5 minutos aproximadamente. Se agregó 600µl de cloroformo: isoamílico (24:1) y se agitó por inversión varias veces. Las muestras se centrifugaron a 24,606 g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Después se le agregó 15 µl de enzima RNAsa (10µg/µl), para incubarse por 30 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 600 µl de cloroformo:isoamílico (24:1), se agitó nuevamente por inversión varias veces y se centrifugara a 24,606 g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó el DNA con 600 µl de isopropanol (-20 °C) al 100 %. Se centrifugó inmediatamente por 10 minutos a 24,606 g y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1000 µl de etanol al 70 % y se centrifugó durante 5 minutos a 11,793 g. finalmente se dejó secar la pastilla que contenía el DNA y se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril.

#### **6.1.1. Electroforesis para la visualización del DNA**

Por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa se verificó la calidad del DNA obtenido. Se utilizó un gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/µl. Se cargaron 2 µl del DNA mezclado con 6 µl de agua destilada estéril y 2 µl de buffer de carga (colorante naranja G). Posteriormente se corrió en la cámara de electroforesis con el buffer TAE 1X a 80 V durante 25 a 30 minutos. Finalmente, se visualizó el DNA en un transiluminador de luz ultravioleta y los resultados fueron registrados en un fotodocumentador de imágenes (Chemidoc, Biorad).

### **6.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La técnica de PCR se realizó en tubos Eppendorf estériles de 0.2 mL a un volumen final de 25  $\mu$ L (DNA más componentes), para ello se preparó una mezcla con todos los componentes en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, excepto el DNA, las concentraciones de los componentes se calculan para 25  $\mu$ L: 17.5  $\mu$ l agua ultra pura, 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X, 1  $\mu$ l 50 mM de  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l de cada primers, 1 pmol/ $\mu$ L, 0.5 $\mu$ l dNTP's, 0.5  $\mu$ l de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, USA). La reacción se efectuó en un termociclador el cual se encargó de subir y bajar las temperaturas para que se lleve a cabo la amplificación, primeramente se desnaturizó el DNA a 95°C por 4 minutos, pasando posteriormente a un ciclo de amplificación que se repetirá 35 veces, el cual constará de 3 pasos, el 1ro es de desnaturización a 95°C por 1 minuto, el 2do es de alineamiento de *primers* a 65°C por 1 minuto, y el 3ro de elongación de DNA a 72°C por 4 minutos. Posteriormente se efectúa un calentamiento 72°C por 3 minutos para pasar a mantenerse la temperatura indefinidamente a 13°C.

El PCR anidado, es una técnica utilizada para reducir la posibilidad de obtener falsos negativos, ya que aumenta la sensibilidad del PCR convencional de un paso o sencillo. El PCR anidado, consiste en amplificar una región interna del fragmento amplificado en el PCR sencillo. Para esto, en la reacción de PCR anidado se usa el producto de amplificación del primer PCR como molde. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las del primer PCR.

### **6.1.3. Detección de begomovirus mediante PCR y PCR anidado.**

Para detectar begomovirus se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los oligonucleótidos específicos Rep-DGRSAR (GAGTCTAGATGCTGACCTCCTCTAGCWGATCTGCCGTC) y CP70-*BamHI* (CACGGATCCGATTGRACCTTACANGGNCCTTCACAACC). La técnica de PCR se realizó en tubos Eppendorf estériles de 0.2 mL a un volumen final de 25  $\mu$ L (DNA más componentes), para ello se preparó una mezcla con todos los componentes en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, excepto el DNA, las

concentraciones de los componentes se calculan para 25  $\mu$ L: 17.5  $\mu$ l agua ultra pura, 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X, 1  $\mu$ l 50 mM de  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l de cada primers, 1 pmol/ $\mu$ L, 0.5 $\mu$ l dNTP's, 0.5  $\mu$ l de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, USA). En la segunda reacción se utilizó el par de primers Mot/Cp (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999), que amplifican un fragmento de 550 a 750 pb de la región que incluye la parte N-Terminal de la proteína Rep, la región intergénica y la región N-Terminal de la CP. La reacción se efectuó en un termociclador el cual se encargó de subir y bajar las temperaturas para que se lleve a cabo la amplificación, primeramente se desnaturalizó el DNA a 95°C por 4 minutos, pasando posteriormente a un ciclo de amplificación que se repetirá 35 veces, el cual constó de 3 pasos, el 1ro es de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, el 2do es de alineamiento de primers a 65°C por 1 minuto, y el 3ro de elongación de DNA a 72°C por 4 minutos. Posteriormente se efectúa un calentamiento 72°C por 3 minutos para pasar a mantenerse la temperatura indefinidamente a 13°C.

#### **6.1.4. Caracterización de los begomovirus por patrón de restricción (PCR-RFLP).**

Para determinar si existía variabilidad genética en los begomovirus detectados, e identificar posibles infecciones mixtas los productos de PCR amplificados en la segunda reacción con los primers Mot/CP (650 pb) se utilizaron para realizar un análisis de RFLP con las enzimas *MspI* y *HhaI*. La digestión enzimática se realizó en un volumen total de 15  $\mu$ L utilizando 6  $\mu$ L del producto de PCR, 1 X del buffer de reacción y 0.5 unidades de la enzima (*MspI* ó *HhaI*), la reacción se incubó por dos horas a 37 °C y se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

### **6.1.5. Purificación de productos de PCR anidado.**

Una vez amplificado el fragmento de interés para cada una de las muestras, éstos se purificaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor utilizando el kit de purificación Wizard sv Gel y PCR clean-up system, se añadió un volumen igual de la solución Membrane Binding a la reacción, al mismo tiempo se insertó la columna (SV Minicolumna) en el tubo colector, una vez realizado el paso anterior, se transfirió el producto de PCR a la minicolumna ensamblada, esto se dejó incubando por 1 min a temperatura ambiente, una vez pasado el minuto se centrifugó a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante que quedó en el tubo colector y se reinsertó la columna, se añadió 700 µl de la solución (Membrane Wash) y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y reinsertó la minicolumna en el tubo colector, se repitió el paso anterior añadiendo solamente 500 µl de la solución Membrane Wash y se centrifugó por 5 minutos, nuevamente se decantó lo colectado, y se volvió a centrifugar la columna ensamblada por 1 minuto. Se dejó secando aproximadamente por un lapso de 10 minutos, se transfirió cuidadosamente la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml, se añadió 30 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna, se incubó a temperatura ambiente por un minuto, se centrifugó a 14,000 rpm durante un 1 minuto, para terminar se descartó la minicolumna y el DNA se almacenó de 4°C o a -20°C.

### **6.1.6. Clonación de los fragmentos amplificados**

La clonación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo utilizando el Kit de clonación pGEM-T EASY VECTOR SISTEM II (Promega Madison, WI, USA) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante con mínimas modificaciones.

**Cuadro 1.**Reacción de clonación con el vector pGEM-T EASY:

<b>Componentes</b>	<b>Reacción estándar</b>
Buffer 2X (Ligación rápida),	1 $\mu$ L
pGEM-T EASY VECTOR	1 $\mu$ L
Producto de PCR	1 $\mu$ L
T4 DNA Ligasa (3 u Weiss/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Agua	6 $\mu$ L
Volumen final	10 $\mu$ L

## **6.2. Transformación en *Escherichia Coli*.**

La transformación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por el proveedor (Promega Madison, WI, USA). Se agregaron 3  $\mu$ L del producto de ligación a 30  $\mu$ L de células competentes JM109, la mezcla se incubó en hielo por 30 minutos e inmediatamente se llevó a cabo un choque térmico a 42°C por 50 segundos, posteriormente se incubó en hielo por 2 minutos, se adicionó 950  $\mu$ L de medio SOC (97 mL de agua destilada, 2 gr de bacto triptona, 0.55 gr de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1M y 0.25 mL de KCl 1M). Se adicionó 1 mL Mg<sup>2+</sup> 2M (MgCl<sub>2</sub> 1M, MgSO<sub>4</sub> 1M) y 1mL de glucosa 2 M, pH 7.0). Se incubaron 2 horas a 37°C con agitación constante (250 rpm); enseguida se tomaron 100  $\mu$ L de este medio y se siembra en cajas petri las cuales contenían medio LB sólido adicionado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), además de 0.5 mM IPTG y 80  $\mu$ g/mL de X-GAL. El resto de las células se centrifuga a 13,000 rpm por 1 minuto y se decantó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 50  $\mu$ L del mismo sobrenadante y se siembra en cajas con medio LB con ampicilina, IPTG y X-GAL a las concentraciones señaladas anteriormente. Las cajas con LB se incubaron por 16 horas a 37°C.

### **6.2.1. Extracción de DNA plasmídico (Minipreps)**

Para llevar a cabo la extracción de DNA plasmídico (Minipreps), se tomó una colonia blanca de las células transformadas y se inocularon en 6000  $\mu$ L de medio LB líquido con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), se incubaron 16 horas a 37°C con agitación de 250 rpm (de manera alterna la misma colonia se sembró en medio sólido). Posteriormente el cultivo líquido se centrifugó un minuto a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 250  $\mu$ L de la solución I (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl pH 8.0 y 1mg/mL de RNAsa), se resuspendió utilizando un vortex, se le agregaron 250  $\mu$ L de la Solución II (75 mL de agua, 20 mL de 1N NaOH y 5 mL de 20% SDS) y se agitó por inversión varias veces. Posteriormente se le agregaron 350  $\mu$ L de la Solución III (24.6 gr de acetato de sodio, 40 mL de agua y se ajusta el pH a 8.0 con ácido acético glacial y se afora a 100 mL con agua) y se agitó por inversión varias veces. Se centrifugó por 8 min. a 13,000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.6 mL y se le agregaron 850  $\mu$ L de etanol absoluto, se centrifuga nuevamente a 13,000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante decantándolo, se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla en un volumen de 20  $\mu$ L de agua ultra pura (Gibco BRL).

### **6.2.2. Purificación de DNA plasmídico para secuenciación**

La extracción de DNA plasmídico para secuenciar se realiza siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor del kit Rapid Plasmid Miniprep System (MARLIGEN BIOSINCE, USA/Germany). 1.5 mL del cultivo que contenía las bacterias transformadas se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Se le agregó 250  $\mu$ L del buffer de suspensión celular (G1), se homogenizó empleando un vortex y se agregó 250  $\mu$ L de solución de lisis (G2), se mezcló por inversión e incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionó 350  $\mu$ L de buffer de neutralización (M3), se mezcló por inversión y centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se colocó un cartucho que contenía la columna dentro de un tubo de lavado de 2 mL. El sobrenadante del paso anterior se colocó en el centro del cartucho que contenía la columna, se



centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y se eliminó el sobrenadante. Nuevamente se colocó el cartucho en un tubo de lavado de 2 mL y se le agregó 700  $\mu$ L del buffer de lavado (G4) con etanol y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. Se decantó el eluido y se centrifugó nuevamente para eliminar posibles restos del buffer de lavado. Enseguida se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.6 mL y se le adicionaron 30  $\mu$ L de agua ultrapura previamente calentada a 60°C, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos. El DNA purificado se almacenó a -20 °C.

### 6.2.3. Cuantificación de DNA.

La cuantificación de DNA plasmídico se realizó con el Kit comercial Quant-it dsDNA HS (Invitrogen). En un tubo falcón se preparó la solución de trabajo diluyendo el fluoróforo (picogreen) en el buffer (1:200). Para los estándares, en tubos (lisos) Eppendorf de 600  $\mu$ l se adicionó 190  $\mu$ l de la solución de trabajo y 10  $\mu$ l de cada estándar, agitándose por dos a tres segundos. Para las muestras de DNA a evaluar, se adicionó 199  $\mu$ l de la solución de trabajo y 1  $\mu$ l de DNA plasmídico (diluido 10 veces). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por dos minutos. Posteriormente, se procedió a la calibración del fluorómetro (Qubit, Invitrogen, Turner Biosystems) con los dos estándares y se tomó la lectura para cada muestra. Los valores dados por el fluorómetro se dan en ng/ml. Para calcular la concentración de las muestras se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Concentración de DNA} = (F) (200/X)$$

Dónde: F = Valor dado por el fluorómetro (ng/ml)

X= N° de microlitros de DNA adicionados a cada tubo Eppendorf.

### 6.2.4. Análisis de las secuencias.

Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI), utilizando el programa BLAST. Los marcos de lectura abierta y su traducción a aminoácidos se realizaron por medio

del programa SeqEdit DNASTAR, Londres (versión 2.0 Madison, Wisconsin, USA). Las secuencias obtenidas se compararon con las referidas en el Genbank del National Center for Biological Information (NCBI). Para establecer el porcentaje de identidad, se utilizaron los algoritmos del programa MegAlign (DNASTAR, Londres).

**Cuadro 2.** Secuencias utilizadas en el análisis.

<b>Nombre</b>	<b>Siglas</b>	<b>Clave de acceso al NCBI Componente A</b>
<i>Bean golden yellow mosaic virus-Mexico</i>	BGYMV-MX	AF173555
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	AF101476
<i>Maize streak virus</i>	MSV	HQ693474
<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	OYMV	DQ022611
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	PHYVV	NC_001359
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>	RhGMV	DQ347950
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SiGMV	AF049336
<i>Sida mosaic Sinaloa virus</i>	SiMSV	DQ520944

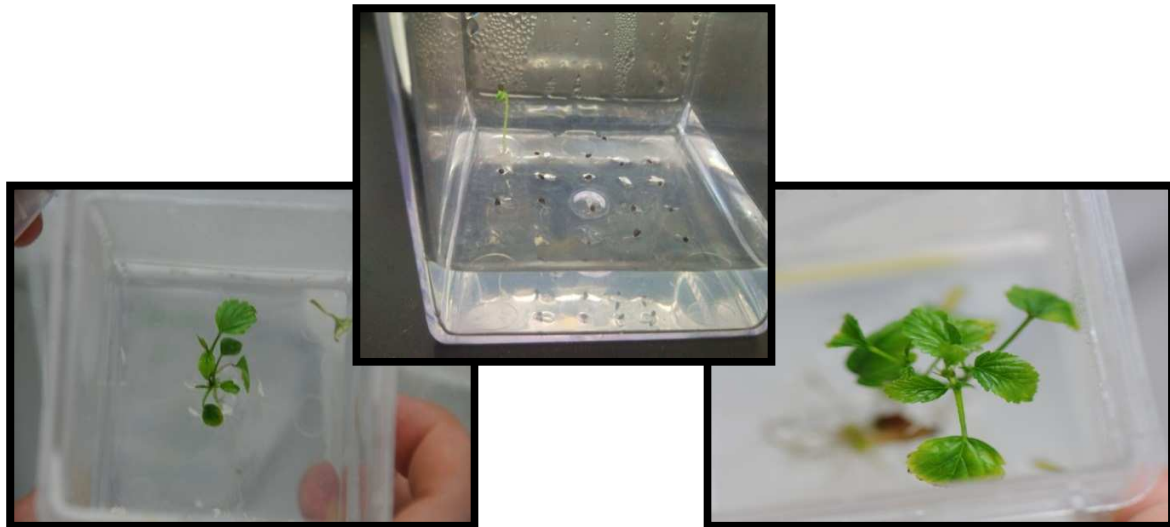
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Colecta y germinación de semillas de *Sida acuta*.

Para determinar la capacidad de SiMSV de transmitirse a través de semilla, se colectó semillas en plantas de *Sida acuta* con sintomatologías características a geminivirus en campo en el año 2010 (Figura 1). Los datos muestran que de 466 semillas sanitizadas (tratamiento con cloro e hidratación) y colocadas para su germinación *in vitro* indican que solamente 35 semillas germinaron, con un 7.5% de germinación (Cuadro 3). Según Juan Calderón en el 2000 una planta de sida en el campo produce 7692 semillas de las cuales el 8.2% es viable en condiciones naturales.

**Cuadro 3.** Tratamientos utilizados para germinación de semillas de *Sida acuta in vitro*.

Tratamiento	Cloro 15 min	Cloro 30 min	Cloro 60 min	
1	100/12			
2	40/0			
3	96/2			
4	50/5	50/1	50/5	
Tratamiento modificado	Hidratación 12 horas/37°C	Hidratación 18 horas/37°C	Hidratación 24 horas/37°C	Hidratación 36 horas/37°C
5	20/0	20/2	20/6	20/2
Total de semillas germinadas				35/466

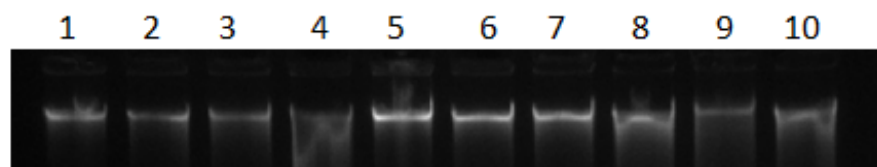


**Figura 3.** Germinación de semillas de *Sida acuta in vitro*. A, semilla en germinación. B y C, plantas con ligero amarillamiento.

Las semillas tardaron aproximadamente 2 meses para germinar, durante el seguimiento diario realizado de las plantas germinadas se logró observar ligeros mosaicos; cabe señalar, que dichos síntomas no son comparables con las sintomatologías observadas en campo (Figura 3).

### 7.2 Extracción de DNA de plántulas de *Sida acuta in vitro*.

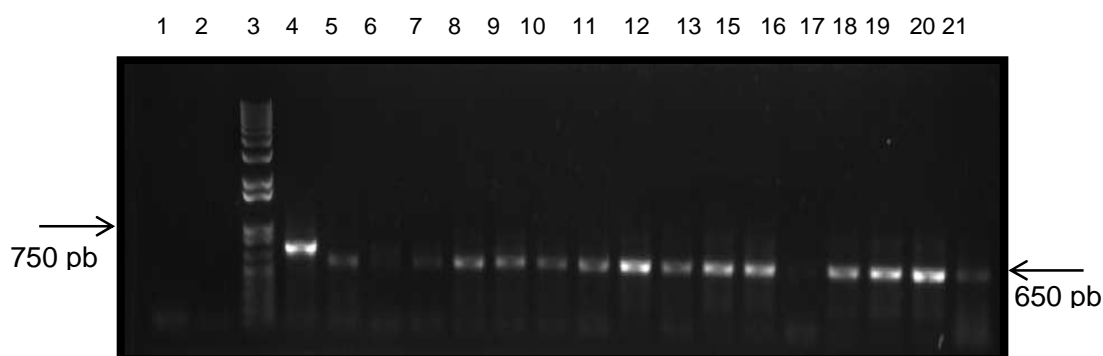
A los 30 días postgerminación (dpg), se procedió a realizar la toma de tejido para realizar la extracción de DNA del tejido foliar. En el análisis electroforético se observa que en la mayoría de las extracciones de las diferentes muestras el DNA total fue de buena calidad y cantidad (Figura 4). Lo cual es de vital importancia para la óptima detección de virus por PCR.



**Figura 4.** Electroforesis del DNA total extraído de plantas germinadas de *Sida acuta in vitro*. Carriles 1-10 DNA total de plantas de *Sida acuta in vitro*.

### 7.3 Detección de SiMSV mediante PCR anidado en plantas de *Sida acuta in vitro*.

Una vez obtenido el DNA del tejido foliar se realizó la detección por PCR, encontrándose que en 17 de 35 plantas analizadas se logró amplificar el fragmento esperado de 650 pb que corresponde para un begomovirus bipartita (Figura 5). Cabe señalar, que para el género *Begomovirus* no existen reportes sobre su capacidad de transmitirse a través de la semilla; sin embargo, existen virus de diferentes géneros con esta capacidad como lo son el *Virus del mosaico de la alfalfa* (H. Xu and J. Nie, 2006), el *Virus del mosaico del tabaco* (Ray Cerkaukas, 2004) y el *Virus moteado del frijol* (Loren, J.G, et al., 2002).

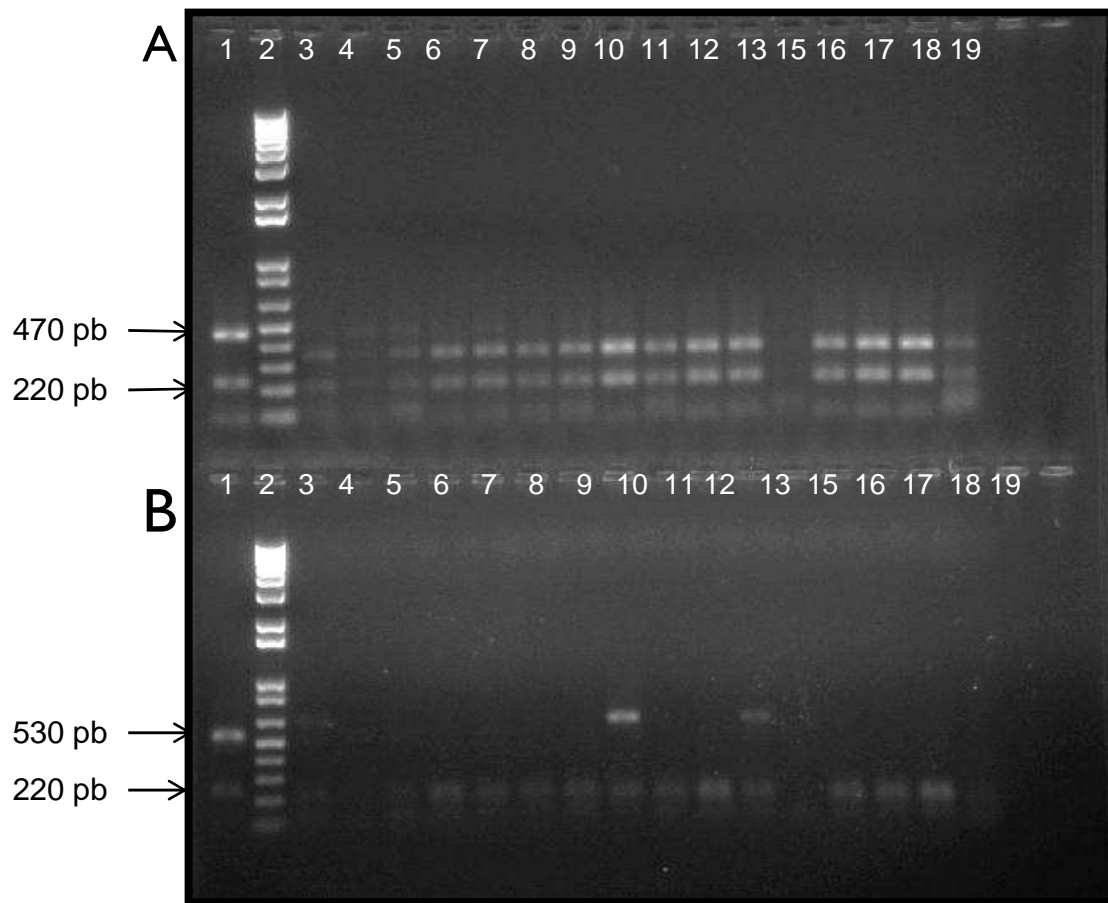


**Figura 5.** Detección de begomovirus en plantas de *sida acuta in vitro* mediante PCR anidado. , Carril 1 y 2: Control negativo PCR anidado, Carril 4: Control positivo TYLCV, Carril 3: Marcador peso molecular 1 Kb. Carriles 5-20 plantas de *sida acuta in vitro*, carril 21 *sida* de campo.

### 7.4. Identificación preliminar de begomovirus en plantas de *Sida acuta in vitro* por PCR-RFLP's.

Una vez detectado la presencia de begomovirus en plantas de *Sida acuta* germinadas *in vitro* y con la idea de confirmar la identidad de los fragmentos amplificados se sometieron a un análisis de restricción (PCR-RFLP's). Estudios previos muestran que la restricción del fragmento amplificado por PCR (N-terminal

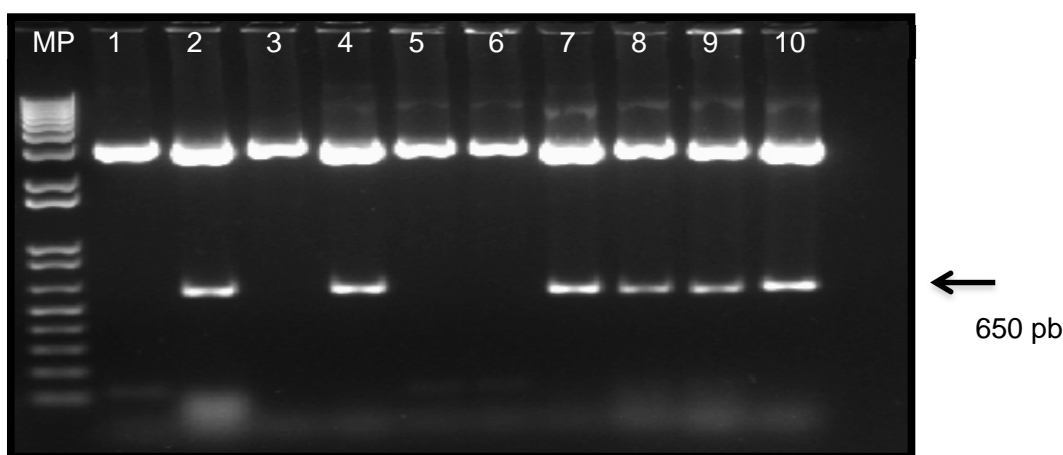
CP-Rep y región intergénica del DNA A) con las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI* permite diferenciar rápidamente entre linajes de begomovirus de manera eficaz; además, permite determinar la presencia de más de un virus en una misma muestra (Monreal-Vargas y Argüello-Astorga 2005). Con base en lo anterior los fragmentos amplificados de las 17 muestras de *Sida acuta* germinadas *in vitro* se sometieron a la restricción con las enzimas *MspI* y *HhaI*. En el análisis con la enzima *MspI* se observa un patrón de dos bandas de aproximadamente 340 y 220 pb y la restricción con *HhaI* define un patrón de dos bandas de aproximadamente 200 y 180 pb (Figura 6A, carriles 3-18). Los patrones obtenidos en dichos análisis son similares a los reportados previamente para SiMSV al ser digeridos con las mismas enzimas (Ruelas-Ayala 2008). Cabe señalar, que al mismo tiempo se realizó la restricción del DNA amplificado de una planta de *Sida acuta* de campo con la idea de tener un control de una fuente descrita previamente obteniendo el mismo patrón de restricción (Figura 6A y B, carril 21). Los resultados indican que los fragmentos amplificados de *Sida* germinada *in vitro* se asocia a SiMSV reportado previamente.



**Figura 6.** Identificación preliminar de begomovirus por PCR-RFLP's de plantas de *Sida acuta*. Panel A), Digestión con la enzima *MspI*, Panel B), Digestión con la enzima *HhaI*. Carril 1: Control positivo TYLCV, Carril 2: Marcador de peso molecular Carril 3-18: *Sida invitro*, carril 19 *Sida* de campo.

### 7.5. Clonación y análisis molecular de los begomovirus detectados en plantas de *Sida acuta in vitro*.

Los análisis de PCR-RFLP's indica que el patrón restricción de las 17 muestras es similar y se asocia a SiMSV. Par corroborar la identidad de los fragmento de 650 pb amplificado de *Sida in vitro* se clonaron en un vector (Figura 7, carriles 2, 4, 7-10) para su posterior secuenciación (Sida 9-2, Sida 9-24, Sida 17-55 y Sida 17-83).



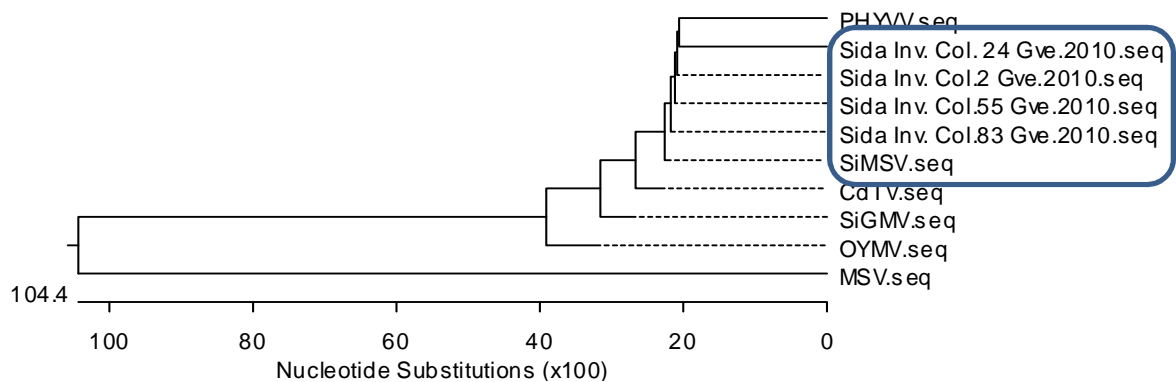
**Figura 7.** Análisis de restricción con *EcoRI* de las clonas obtenidas de plantas de sida invitro. Carril MP) Marcador de peso molecular, Carril 1-5: Colonias Sida *invitro* 9, Carril 23-27: Colonias sida *invitro* 17.

### 7.6. Análisis filogenético y su relación con otros begomovirus

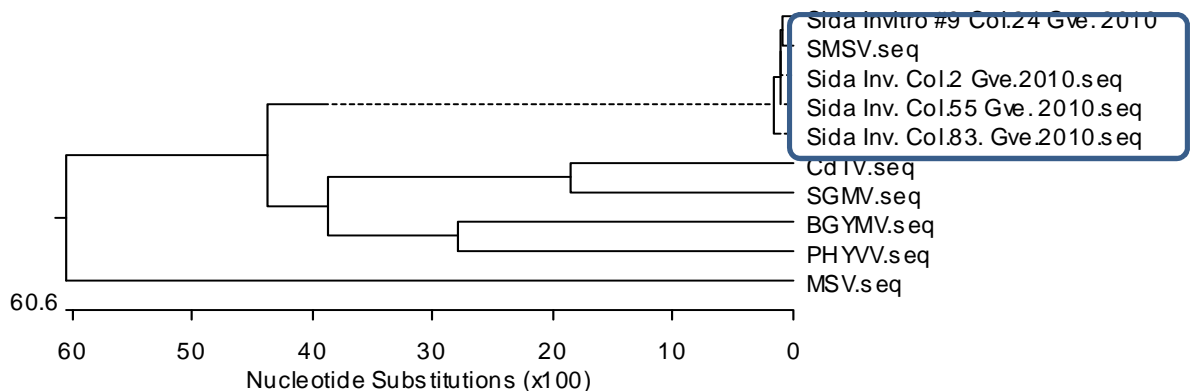
Las secuencias obtenidas fueron analizadas en una primera instancia con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI utilizando el BLAST-N. Las clonas obtenidas de *Sida acuta in vitro* (Sida 9-2, Sida 9-24, Sida 17-55 y Sida 17-83) mostraron homologías del 96% con el *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa aislado Sinaloa* (SiMSV). Con base en estos resultados, se realizó un análisis utilizando el programa MegAlign del DNASTAR (Versión 1.02; DNASTAR Inc., Madison, WI) comparando la región N-terminal de la proteína de la cápside, región N-terminal de la Rep y la región intergénica de las clonas secuenciadas con las reportadas. El análisis de la región N-terminal de las clonas Sida 9-2, Sida 9-24,



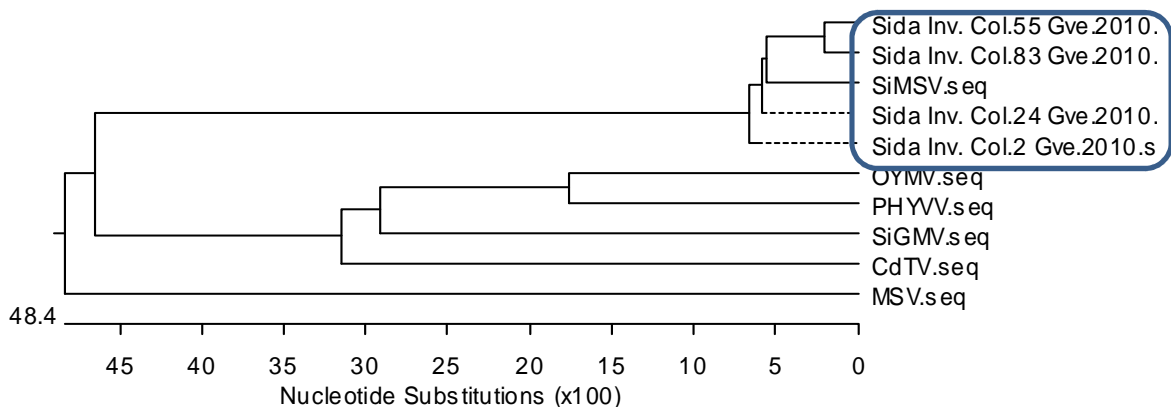
Sida 17-55 y Sida 17-83 mostraron una homología del 96.8% con el SiMSV (Figura 8), mientras que el análisis de la región intergénica y la proteína de la Rep mostraron homología de 85% y 91.7% con SiMSV respectivamente (Figuras 9 y 10). Por otro lado, al comparar la secuencias del fragmento completo (N-terminal de la CP/Rep e IR) obtenidas de *Sida acuta* germinadas *in vitro* muestran homología del 89.3 a 89.5% (Figura 11).



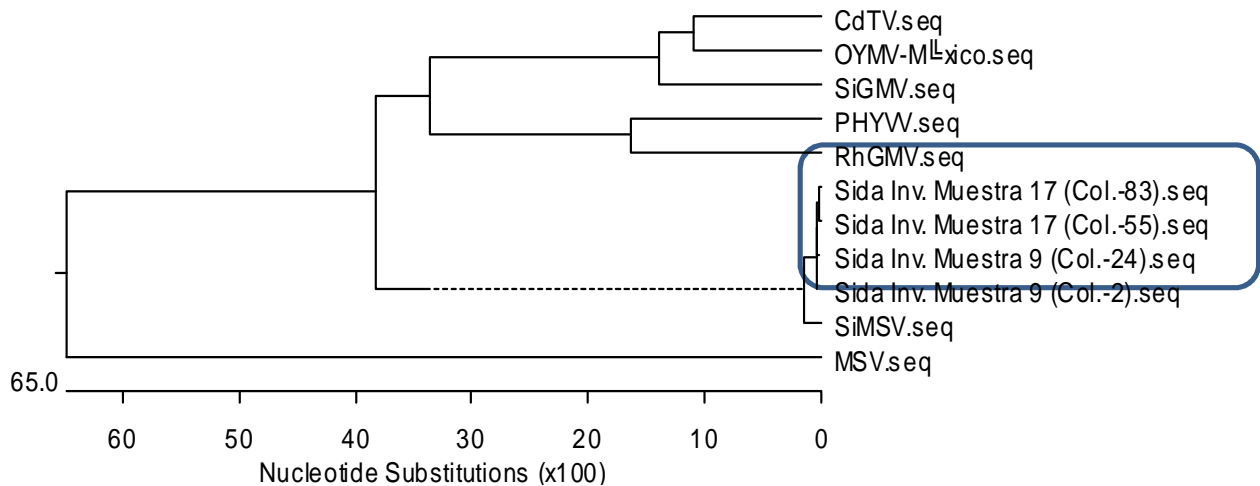
**Figura 8. Árbol filogenético.** Comparación de la región N-Terminal de la proteína de la cápside de las clonas obtenidas con secuencias obtenidas del Gene Bank.



**Figura 9. Árbol filogenético.** Comparación de la región intergénica de las clonas obtenidas con secuencias obtenidas del Gene Bank.



**Figura 10. Árbol filogenético.** Comparación de la Rep de las clonas obtenidas con secuencias obtenidas del Gene Bank

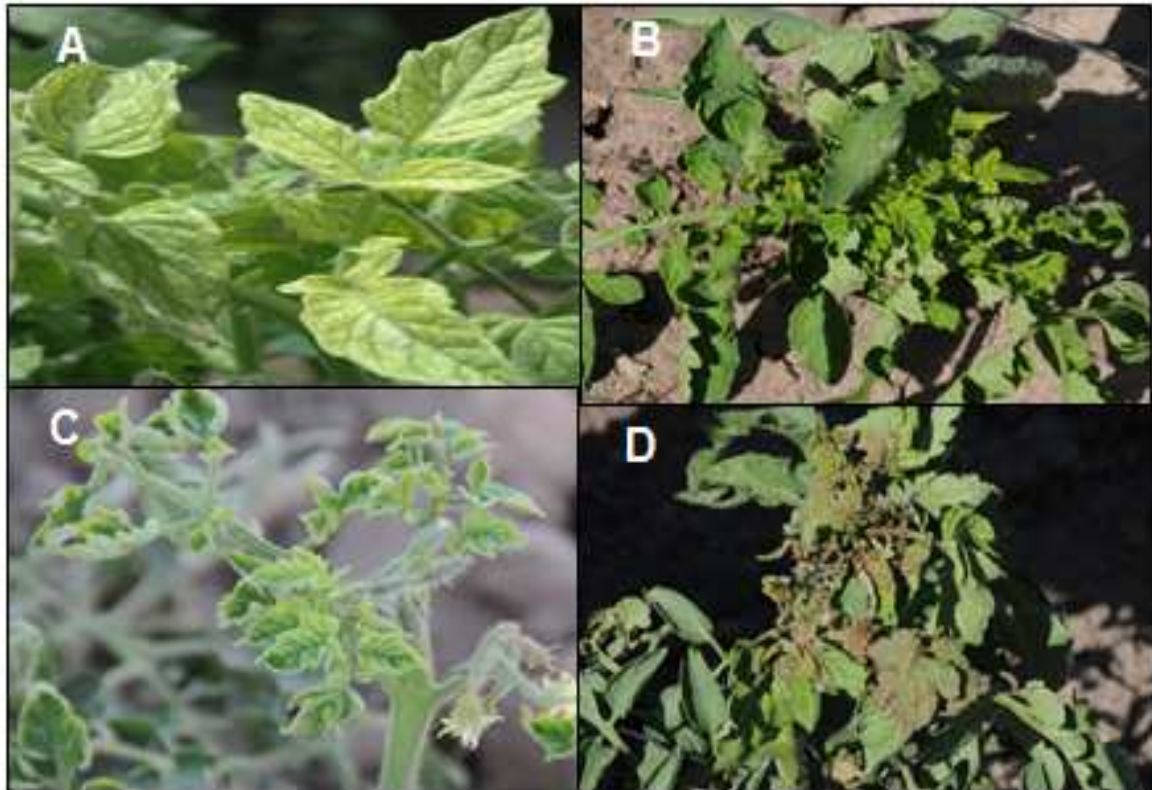


**Figura 11. Árbol filogenético.** Comparación del fragmento completo amplificado (región N-terminal de la proteína de la cápside, región intergénica y N-terminal de la proteína de replicación, Rep) de las clonas obtenidas con secuencias obtenidas del Gene Bank.

### 7.7. Colecta de plantas de tomate y chile en el norte de Sinaloa.

Durante los meses de marzo y abril del ciclo agrícola 2010-2011, se colectaron un total de 75 plantas de tomate y 15 plantas de chile con diversos síntomas en los municipios de Guasave y Ahome, es importante señalar que los muestreos fueron dirigidos a plantas con síntomas virales. Los principales síntomas observados en tomate fueron clorosis, necrosis, amarillamientos y deformación en los folíolos (Figura 12). En el caso de chile se observaron amarillamientos y deformaciones de

los foliolos (Figura 13). Cabe señalar, que los síntomas pueden variar dependiendo del híbrido, abundancia de mosca blanca e incluso de las condiciones climáticas.



**Figura 12.** Sintomatología presentada en las plantas de tomate. **A**, clorosis severa. **B**, amarillamientos. **C**, amarillamiento y deformación de foliolos. **D**, necrosis apical.



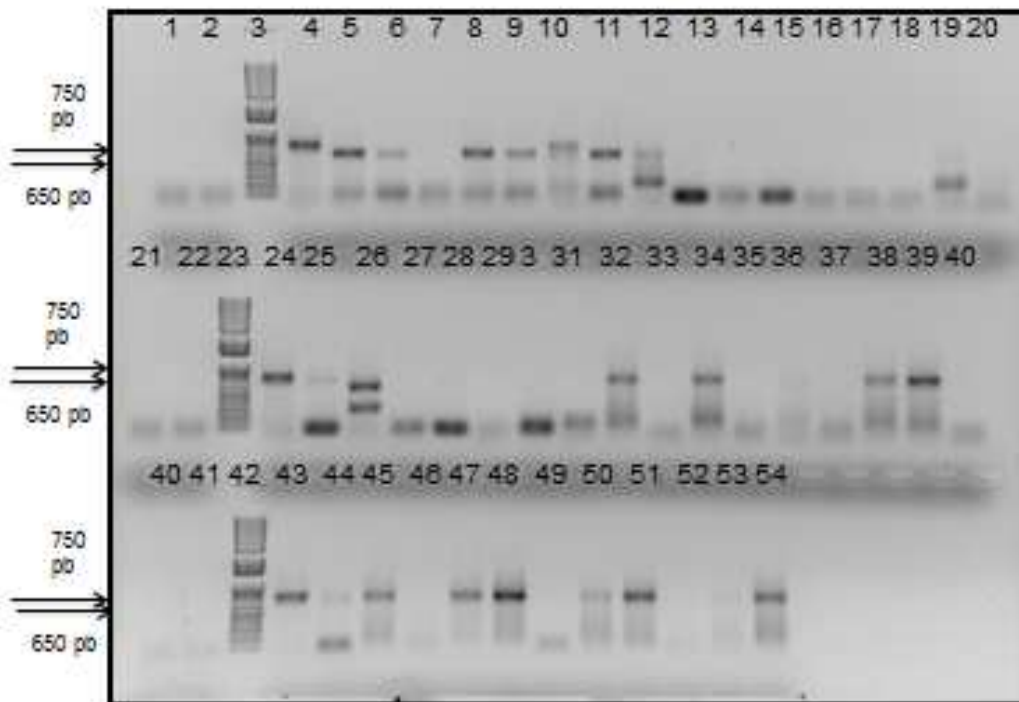
**Figura 13. Sintomatología presentada en las plantas de chile. A, amarillamiento intervenal moderado. B, amarillamientos. C, Deformación de hojas. D, mosaicos severos.**

**Cuadro 4.** Muestras colectadas de chile y tomate en el norte de Sinaloa.

Localidad	Muestra/Positiva	Begomovirus		Muestra/Positiva	Begomovirus	
		Chile	Begomovirus		Tomate	Begomovirus
		650 pb	750 pb		650 pb	750 pb
<b>Guasave</b>						
Calle 8	15/7	6	1	7/1	1	---
Bamoa	---	---	---	15	---	---
Tamazula	---	---	---	14/1	---	1
<b>Ahome</b>						
La Piedrera	---	---	---	29/15	---	15
Arrocera	---	---	---	10/2	---	2

### 7.8. Detección de begomovirus en plantas de tomate y chile de campo mediante PCR anidado.

Una vez extraído el DNA del tejido foliar y frutos de las muestras se realizó la detección de begomovirus mediante PCR anidado. De las 75 muestras de tomate analizadas en una se logró amplificar el fragmento esperado de 650 pb que corresponde a un begomovirus bipartitas (Figura 14, carril 25) y en 19 muestras se amplifica una banda de 750 pb que se presume es TYLCV (Figura 14). Así mismo, el análisis de las 15 muestras de chile indica que en seis muestras se amplifica una banda de 650 pb (Figura 14, carriles 5, 6, 8, 9, 11 y 12) y en una muestra se observa una banda de 750 pb (Figura 14, carril 10). Cabe señalar, que durante el ciclo agrícola 2005-2006 el virus TYLCV ocasionó pérdidas totales en aproximadamente 6000 ha. en el cultivo de tomate en Sinaloa (Gámez-Jiménez 2008). Sin embargo, durante este periodo SiMSV seguía siendo detectado únicamente en su hospedante natural *Sida* spp.



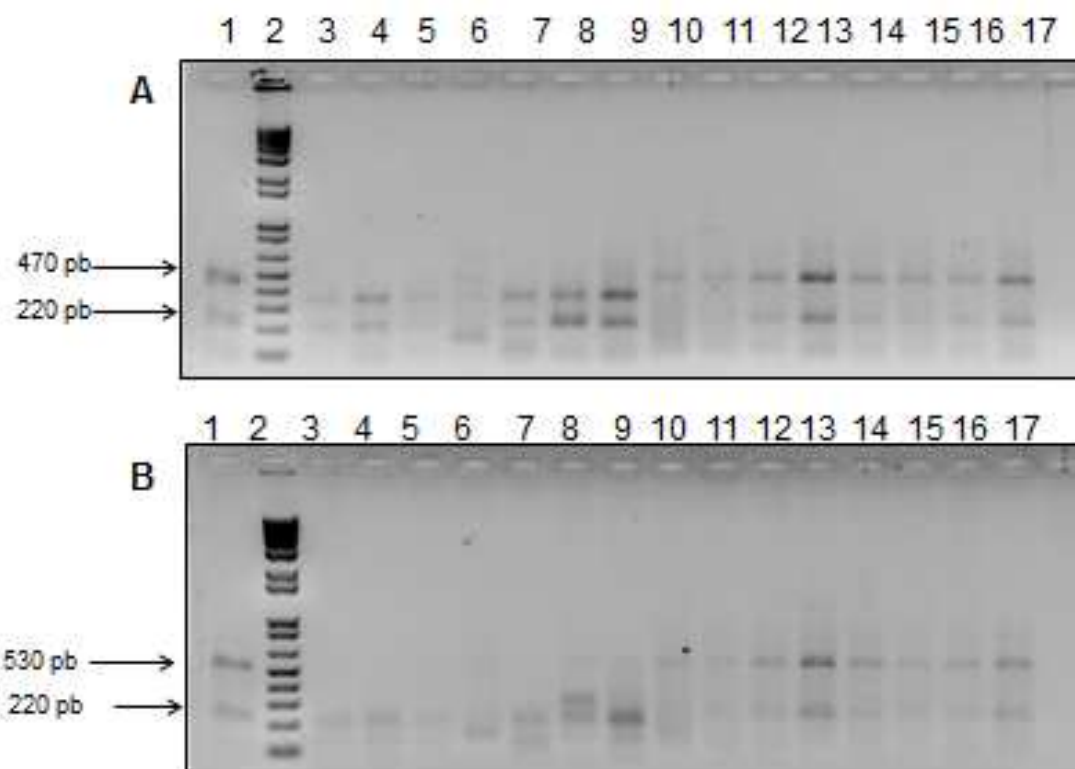
**Figura 14.** Detección de Begomovirus en plantas de tomate y chile de campo mediante PCR anidado. Carriles 1, 2, 21, 22, 40 y 41: controles negativos, carriles 4, 24 y 43: controles positivos TYLCV, carriles 3, 23 y 42: Marcador peso molecular 1 Kb, carriles 5-14: plantas de chile, carril 15: tomate follaje 10, carril 16: tomate follaje 11, carril 17: tomate follaje 12, carril 18: tomate follaje 13, carril 19: tomate follaje 13, carril 20: tomate tallo 15, carril 25: tomate fruto 17, carril 26: tomate fruto 18, carril 27: tomate follaje 17, carril 28 tomate tallo 17, carril 29: tomate fojalle 18, carril 30: tomate tallo 18, carril 31 tomate follaje 19, carril 32: tomate tallo 19, carril 33: tomate follaje 20, carril 34 tomate tallo 20, carril 35: tomate follaje 21, carril 36: tomate tallo 21, carril 37 tomate follaje 22, carril 38: tomate tallo 22, carril 39: tomate fruto 22, carril 40 tomate follaje 23, carril 44: tomate tallo 23, carril 45: tomate fruto 23, carril 46 tomate follaje 24, carril 47: tomate tallo 24, carril 48: tomate fruto 24, carril 49 tomate follaje 25, carril 40: tomate tallo 25, carril 51: tomate fruto 25, carril 52 tomate follaje 26, carril 53: tomate tallo 26, carril 54: tomate fruto 26.

### 7.9 Identificación preliminar de begomovirus en tomate y chile de campo mediante PCR-RFLP.

Una vez detectado la presencia de begomovirus bipartitas y monopartitas en plantas de tomate y chile, los fragmentos amplificados por PCR anidado se sometieron a un análisis de restricción con las enzimas *MspI* y *HhaI*. Como se

describió anteriormente estas enzimas permiten la diferenciación e identificación preliminar por el patrón de restricción generado.

El análisis de restricción de los fragmentos de 650 pb amplificados de las plantas de chile con las enzimas *MspI* y *HhaI* definen un patrón similar de dos bandas de aproximadamente 340-220 pb y 200-180 pb respectivamente (Figura 15 A y B, carriles 3-7); por los resultados previos se infiere que dicho patrón es similar al SiMSV. En el caso de las muestras de tomate el patrón de restricción obtenido es similar a lo anterior con ambas enzimas (Figura 15 A y B, carril 7). Para los fragmentos amplificados de un tamaño de 750 pb en muestras de chile y tomate se observa dos bandas de aproximadamente 470 y 220 pb con la enzima *MspI* y con la enzima *HhaI* se observa de igual forma dos bandas de 530 y 220 pb (Figura 15 A y B, carriles del 10-17). Cabe señalar, que dichos patrones de bandeo son similares a los obtenidos para el virus TYLCV. Es importante destacar que el SiMSV fue reportado por primera vez en *Sida sp.* en Sinaloa durante el ciclo agrícola 2010-2011 y estos resultados representan el primer reporte de este virus nativo de maleza infectando cultivos de interés comercial.



**Figura 15.** Identificación preliminar de begomovirus por PCR-RFLP obtenidos de las plantas de Chile y tomate. Panel A). Digestión con la enzima *MspI*, Panel B). Digestión con la enzima *HhaI*. . Panel A). Digestión con la enzima *MspI*, Panel B). Digestión con la enzima *HhaI*. Carril 1: Control positivo TYLCV, carril 2: Marcador de peso molecular 1 Kb plus, carriles 3 a 7: Chile bell, carril 8: Fruto de tomate, carril 9: Sida de campo, carril 10: Tallo de tomate 20, carril 11: Tallo de tomate 22, carril 12: Fruto de tomate 22, carril 13: Fruto de tomate 23, carril 14: Tallo de tomate 24, carril 15: Fruto de tomate 24, carril 16: Fruto de tomate 25, carril 17: Fruto de tomate 26.

## 7.10. Clonación y análisis molecular de los begomovirus detectados en tomate y Chile

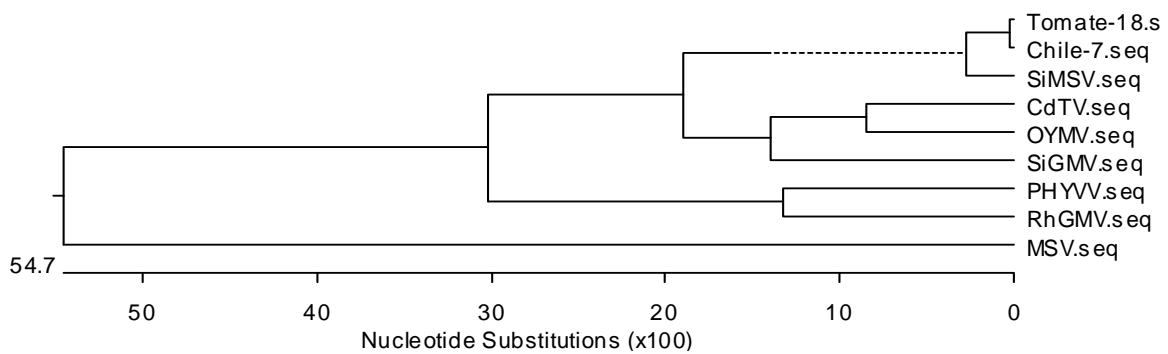
Con base en los análisis de PCR-RFLP se clonaron aquellos fragmentos de interés amplificados a partir de muestras de DNA's de plantas de Chile y tomate con patrones de restricción similares a SiMSV. Dato no mostrado.

### 7.10.1 Análisis filogenético y su relación con otros begomovirus

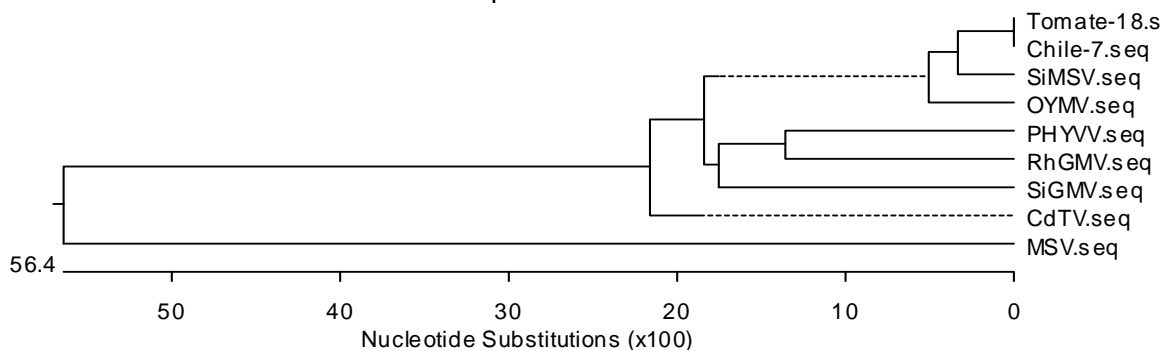
Las secuencias obtenidas fueron analizadas en una primera instancia con otras secuencias de begomovirus depositadas en la base de datos del GenBank del



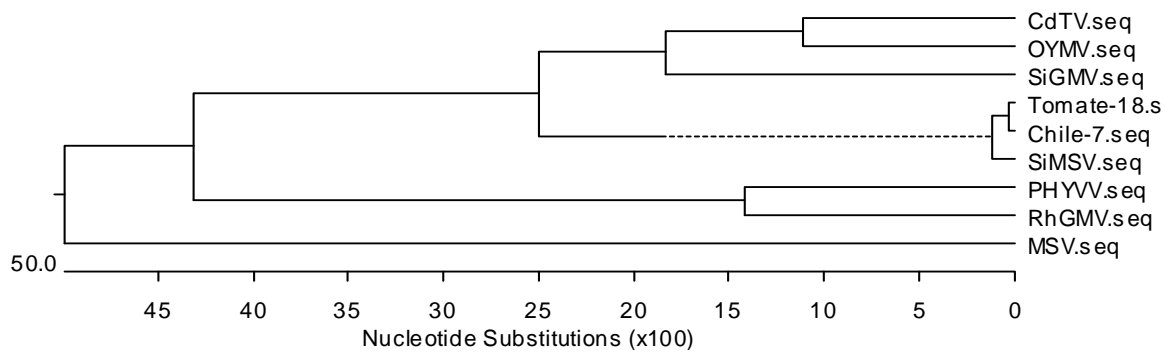
NCBI utilizando el BLAST-N. Las clonas de tomate y chile mostraron homologías del 87.8% y 87.5% con el *Virus del mosaico de la sida de Sinaloa* (SiMSV) respectivamente. Con base en estos resultado, se realizó un análisis utilizando el programa MegAling del DNASTAR (Vesion 1.02; DNASTAR Inc., Madison, WI) comparando la región N-terminal de la proteína de la cápside, la región N´terminal de la Rep y toda la región intergénica de las clonas secuenciadas El análisis de la región N-terminal de la proteína de la cápside de la clona de tomate y chile mostraron una mayor homología de 92.8% con el SiMSV; así mismo, el análisis de la región intergénica mostro una homologías del 85% y 84.7% con SiMSV respectivamente.



**Figura 16. Árbol filogenético.** Comparación de la secuencia del fragmento de 650 pb de clonas obtenidas de muestras de campo.



**Figura 17. Árbol filogenético.** Comparación de la secuencia de la región N-Terminal de la proteína de la cápside obtenidas de plantas de chile y tomate de campo.



**Figura 18. Árbol filogenético.** Comparación de la secuencia de la región intergénica obtenidas de plantas de chile y tomate de campo.

## **7.11. Transmisión de SiMSV mediante injerto a plantas de tomate y chile.**

Con base en los resultados obtenidos en los muestreos en los campos agrícolas de Guasave y Ahome donde se logró detectar la presencia de SiMSV en los cultivos de tomate y chile se definió realizar ensayos de transmisión de dicho virus a plantas de chiles y tomate de manera experimental, esto con la finalidad de determinar capacidad de transmisión y analizar su sintomatología en ambas plantas, libres de otros patógenos.

### **7.11.1. Obtención de inóculo SiMSV de plantas de *Sida acuta***

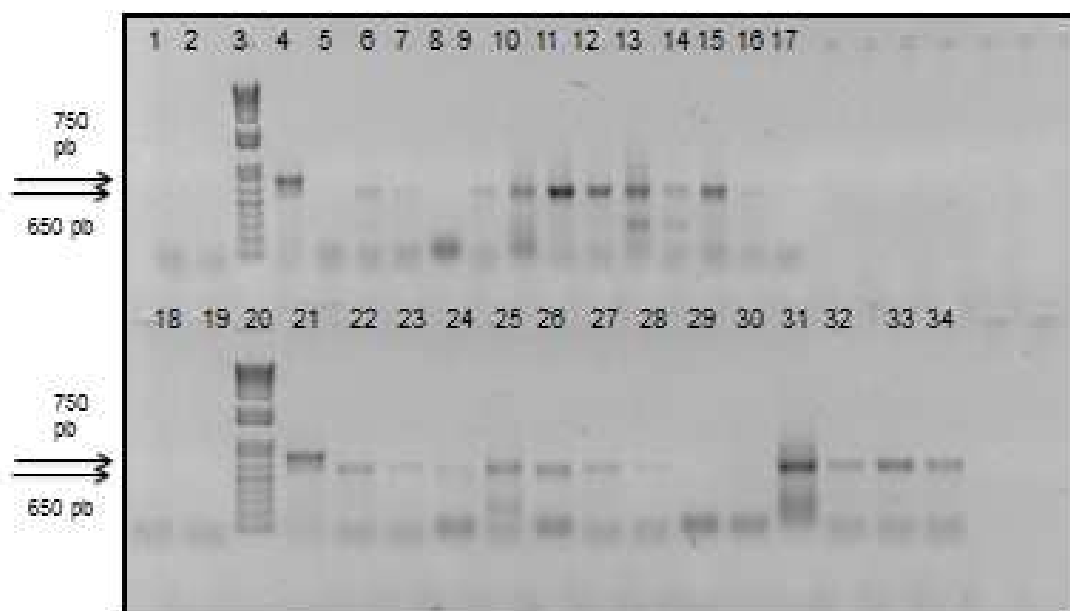
En total se colectaron 30 plantas de *Sida acuta* en campo con síntomas típicos de esta maleza (leves clorosis, amarillamientos, mosaicos severos y ampollamiento de las hojas), así como, plantas asintomáticas (Figura 19). Las plantas se mantuvieron en macetas para los ensayos experimentales.



**Figura 19.** Sintomatología presentada en las plantas de *sida acuta*. Panel A.- Amarillamiento y mosaico moderado. Panel B.- Asintomática. Panel C. Mosaico severo. Panel D.- Amarillamiento apical.

### 7.11.2. Detección de SiMSV en plantas de *Sida acuta* de campo mediante PCR anidado.

Una vez extraído el DNA del tejido foliar de las plantas se realizó la detección de begomovirus mediante PCR anidado. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de begomovirus bipartitas en 22 de las 26 plantas analizadas (Figura 20 carriles 6, 7, 9-16, 22-28 y 31-34), así mismo algunas muestras resultaron negativas (Figura 20 carriles 5,8, 29 y 30). Lo que permite inferir que la incidencia del virus en campo es alta.



**Figura 20.** Detección de SiMSV en plantas de *Sida acuta* mediante PCR anidado. Carril 1-2 y 18-19: controles negativos, carriles 4 y 21: Marcador peso molecular 1 Kb, carriles 5-34: plantas de *Sida acuta*.

### 7.11.3. Identificación preliminar de begomovirus en plantas de sida de campo mediante PCR-RFLP.

Una vez confirmada la presencia de begomovirus en plantas de sida por PCR anidado, los fragmentos amplificados por PCR anidado se sometieron a un análisis de restricción (RFLP) con las enzimas *MspI* y *HhaI*.

El análisis de PCR-RFLP de las 22 plantas de *Sida acuta* digeridas con la enzima *MspI* definió un patrón similar a SiMSV observándose dos bandas de aproximadamente 340 y 220 pb (Figura 21A, carriles 10-34); así mismo, en el análisis realizado con la enzima *HhaI* (Figura 21B, carriles 10-34) se definió un patrón de restricción con dos bandas de aproximadamente 200 y 180 pb el cual de igual forma es similar para SiMSV. Es importante señalar que con base en estos resultados la incidencia de SiMSV en las plantas de *Sida acuta* es de aproximadamente del 85%.



**Figura 21.** Identificación preliminar de begomovirus por PCR-RFLP obtenidos de las plantas *sida acuta*. Panel a). Digestión con la enzima *MspI*, Panel b). Digestión con la enzima *HhaI*. Carriles 35 y37: Control positivo TYLCV, carril 36: Marcador de peso molecular 1 Kb plus, carriles 10-34: plantas de *Sida acuta*.

### 7.11.3. Transmisión de SiMSV mediante injerto de plantas de chile y tomate con *Sida acuta*.

Para analizar porcentajes de transmisión de este virus se injertaron 15 plantas con 40 días de de tomate y chile (Figura 22); cabe señalar, que en ambos casos se uso controles negativos del experimento realizando injertaron con varetas de plantas de *Sida* donde no se detectó begomovirus (figura 20); así mismo, plantas sin injertar (Cuadro 4). Una vez terminado el proceso de injertado las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero para sus posteriores análisis.



**Figura 22.** Injerto de las plantas de chile con *sida acuta*. Panel A.- Corte de hojas basales y corte de tallo. Panel B.- Inserto de la planta de sida a la planta de chile. Panel C. Planta de chile injertada. Panel D.- Planta de chile injertada.

**Cuadro 5.** Transmisión por injerto de SiMSV de plantas de campo a chile y tomate.

Planta	No. de plantas	Fuente de inóculo/Sida positiva	Fuente de inóculo/Sida negativa	Planta sin inocular	Plantas positivas
Chile Anaheim	15	15/15	0/15	0/15	11/15
Chile Anaheim	2	0/2	1/2	1/2	0/2
Chile Jalapeño	15	15/15	0/15	0/15	5/15
Chile Jalapeño	2	0/2	1/2	1/2	0/2
Tomate	15	15/15	0/15	0/15	6/15
Tomate	2	0/2	1/2	1/2	0/2
Tomate	15	15/15	0/15	0/15	1/15
Tomate	2	0/2	1/2	1/2	0/2

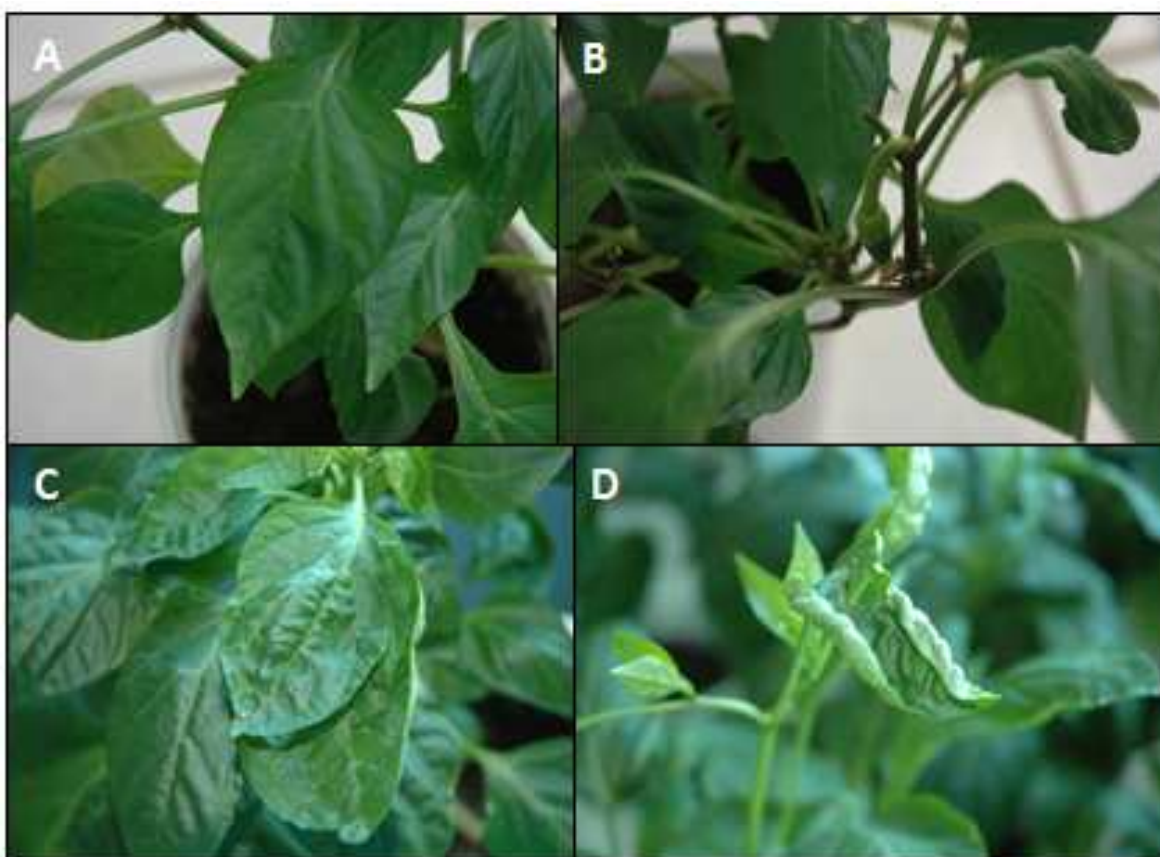
Después de haber realizado los injertos, las plantas se pasaron a condiciones controladas de temperatura de 25°C y fotoperiodos 16 horas luz y 8 oscuridad.

#### **7.11.4. Sintomatología observada en plantas de chile y tomate injertadas sida acuta.**

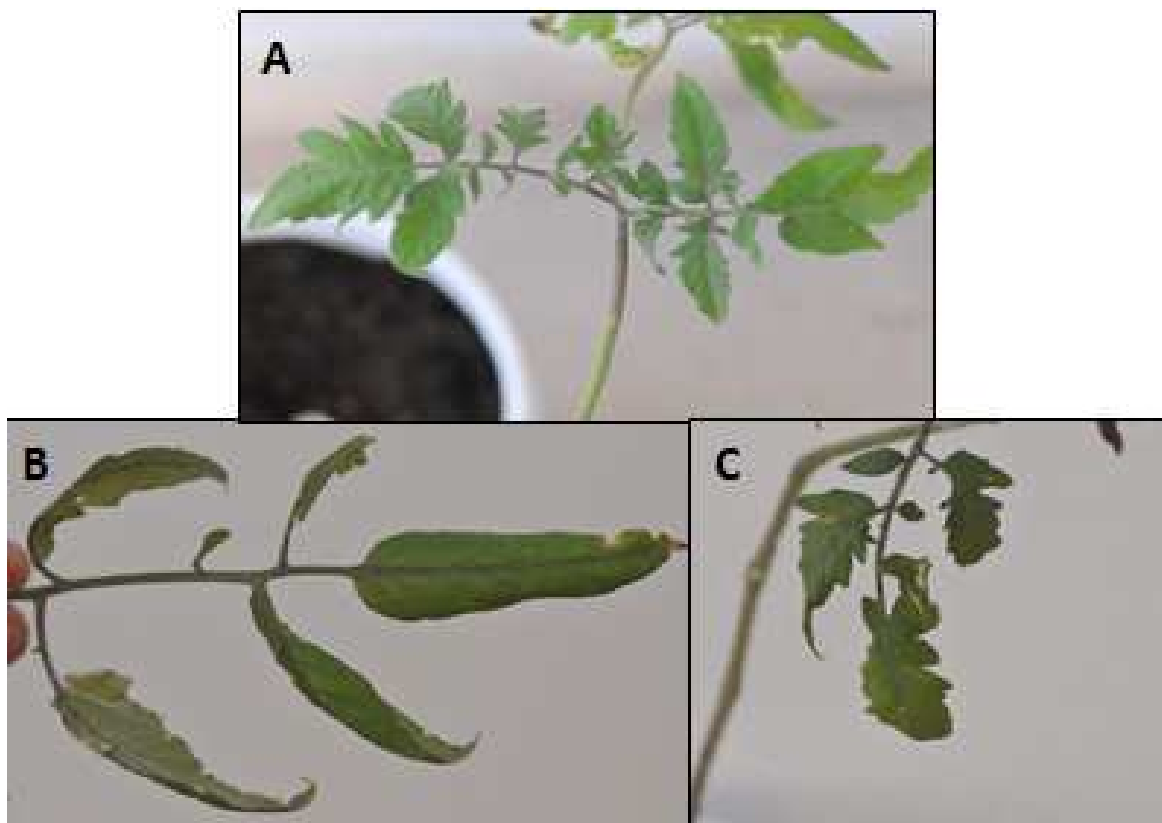
Las plantas injertadas se estuvieron monitoreando diariamente, esto con la finalidad de observar la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad viral causada por SiMSV, ya que no existen reportes acerca de los síntomas causados por este virus en cultivos de interés agrícola.



Los primeros síntomas en las plantas de chile se observaron a los 12 dpi, los cuales se manifestaron como arrugamientos y enchinamiento de las hojas (Figura 23). En cuanto a las plantas de tomate los primeros síntomas aparecieron a los 10 dpi, los cuales se manifestaron como amarillamientos leves y acucharamiento de los folíolos. Cabe señalar, que la sintomatología presentada en general fue ligera (Figura 24).



**Figura 23.** Síntomas en plantas de chile con *sida acuta*. Panel A.- Control negativo asintomático. Panel B.- Control negativo asintomático. Panel C. Arrugamiento de la hoja. Panel D.- Enchinamiento de la hoja.

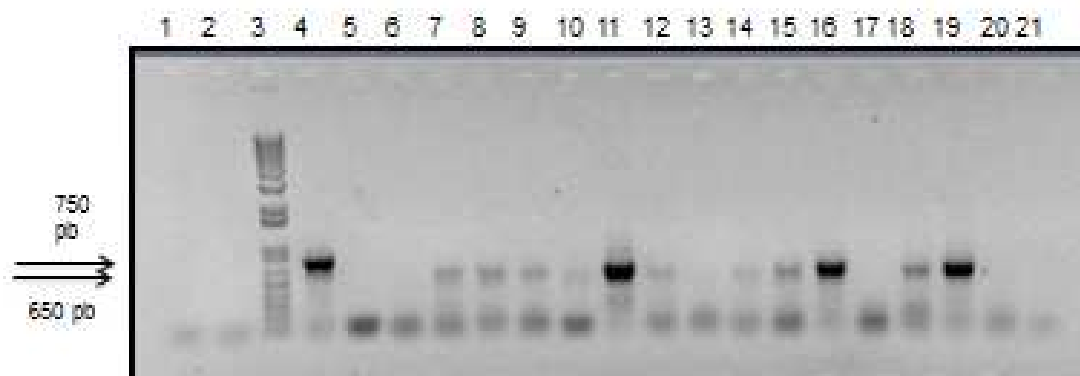


**Figura 24.** Síntomas en plantas de tomate con *Sida acuta*. A, control negativo asintomático. B, ligero acucharamiento de los folíolos. C, ligero amarillamiento

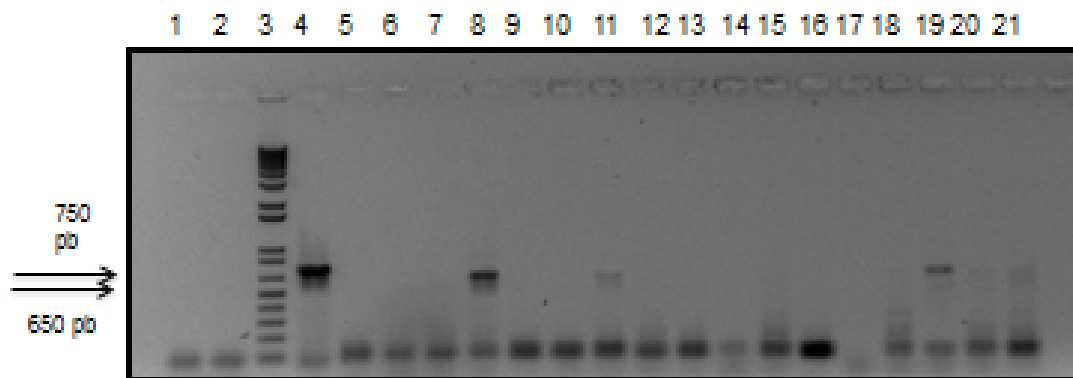
#### **7.11.5. Detección de SiMSV en plantas de chile y tomate injertadas con *Sida acuta* mediante PCR anidado.**

Se analizaron en total 58 plantas injertadas con *Sida acuta* de campo en las cuales se había detectado previamente SiMSV por PCR anidado. Los resultados obtenidos indican la presencia de begomovirus el cual presuntamente se asocia a SiMSV en 16 plantas de chile injertadas (Figura 25 carriles 7-12, 14-16 y 18-19 y Figura 26 carriles 8, 11, 19, 20 y 21) de igual forma se detectó la presencia de begomovirus en 7 plantas de tomate (Figura 26 carriles 6-11 y 15 y Figura 27 carril 15). Se considera importante resaltar que SiMSV el cual es un begomovirus nativo de maleza que aparentemente ahora es capaz de infectar cultivos de interés comercial pudiendo ser una enfermedad emergente tal y como se ha descrito con el *Virus del mosaico dorado de la Rhynchosia* (*Rhynchosia golden mosaic virus*, RhGMV) el cual de igual forma es un begomovirus nativo de una maleza y ocasionó pérdidas importantes al cultivo del tabaco en Chiapas y en el noroeste de Sinaloa se reportó a

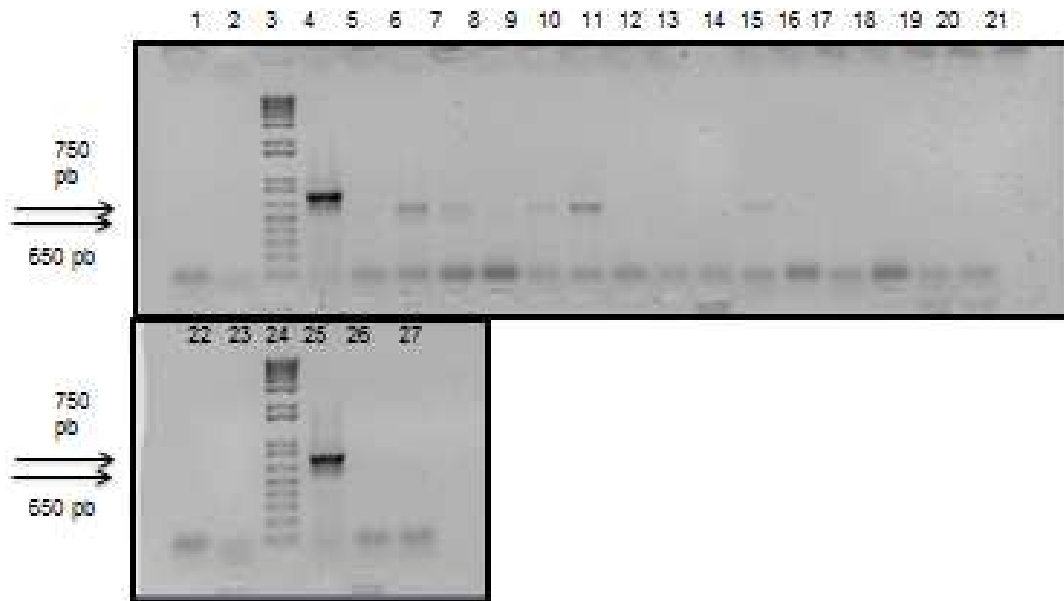
RhGMV afectando cultivos de soya (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002; Méndez-Lozano *et al.*, 2006). Es relevante señalar que acorde a la detección se determinó un porcentaje de transmisión del 53.3% de transmisión de SiMSV a plantas de chile y un 25% de transmisión hacia plantas de tomates.



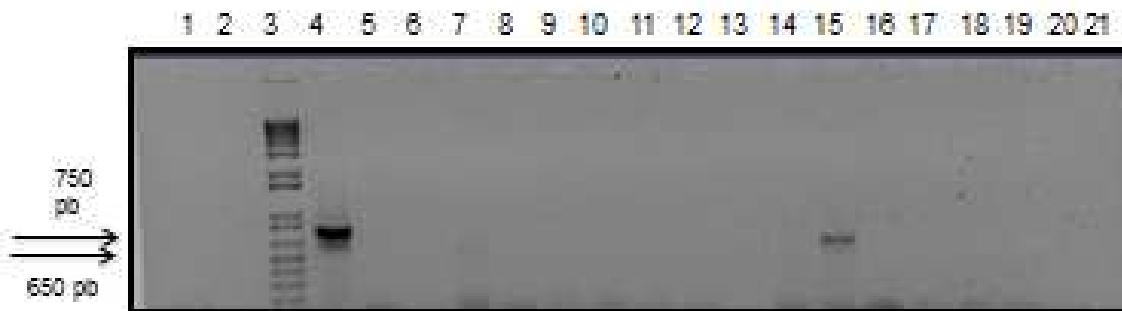
**Figura 25.** Detección de SiMSV en plantas de chile injertadas con *sida acuta* mediante PCR anidado. Carriles 1 y 2: Controles negativos, carril 3: Marcador peso molecular 1 Kb Carril 4: TYLCV (750 pb), carril 5: Planta de chile sin injertar, carril 6: Planta de chile injertada con sida libre de virus, carril 7-21: Planta de chile injertadas con sida.



**Figura 26.** Detección de SiMSV mediante PCR anidado en plantas de chile injertadas con *Sida acuta*. Carriles 1 y 2: Controles negativos, carril 3: Marcador peso molecular 1 Kb Carril 4: TYLCV (750 pb), carril 5: Planta de chile sin injertar, carril 6: Planta de chile injertada con sida libre de virus, carril 7-21: Planta de chile injertadas con sida.



**Figura 27.** Detección de SiMSV mediante PCR anidado en plantas de tomate injertadas con *Sida acuta*. Carriles 1,2, 22 y 23: Controles negativos, carriles 3 y 24: Marcador peso molecular 1 Kb, carriles 4 y 25: control positivo TYLCV (750 pb), carril 26: Planta de tomate sin injertar, carril 27: Planta de tomate injertada con sida libre de virus, carriles 5-21: Planta de tomate injertadas con sida.

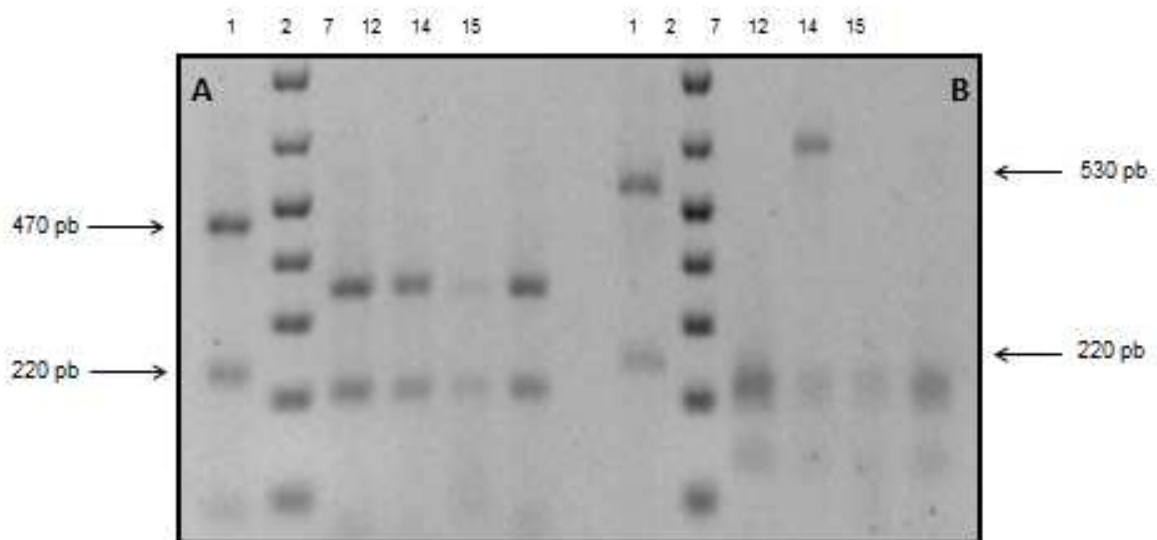


**Figura 28.** Detección de SiMSV mediante PCR anidado en plantas de tomate injertadas con *Sida acuta*. Carriles 1 y 2: Controles negativos, carril 3: Marcador peso molecular 1 Kb, carril 4: control positivo TYLCV, carril 5: Planta de tomate sin injertar, carril 6: Planta de tomate injertada con sida libre de virus, carriles 7-21: Planta de tomate injertadas con sida.

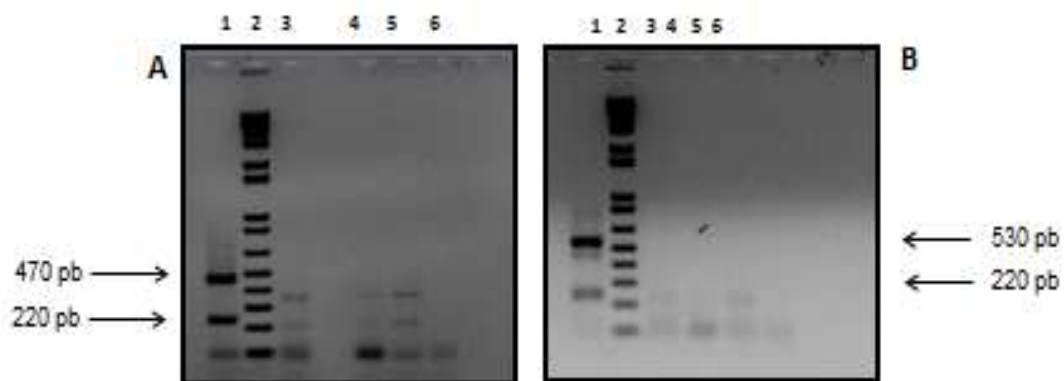
#### 7.11.6. Identificación preliminar de begomovirus en plantas de chile y tomate injertadas con *Sida acuta* mediante PCR-RFLP.

Una vez confirmada la presencia de begomovirus en plantas de sida por PCR anidado, los fragmentos amplificados por PCR anidado se sometieron a un análisis

de restricción (RFLP) con las enzimas *MspI* y *HhaI*. El análisis de RFLP de las plantas de chile y tomate injertadas con *Sida acuta* digeridas con la enzima *MspI* muestran un patrón similar a SiMSV, observándose dos bandas de aproximadamente 340 y 220 pb (Figura 29A carriles 7-15 y Figura 30A carriles 3-6); así mismo, en el análisis realizado con la enzima *HhaI* (Figura 29B carriles 7-15 y Figura 30B carriles 3-6) se definió un patrón de restricción con dos bandas de aproximadamente 200 y 180 pb el cual de igual forma es similar para SiMSV.



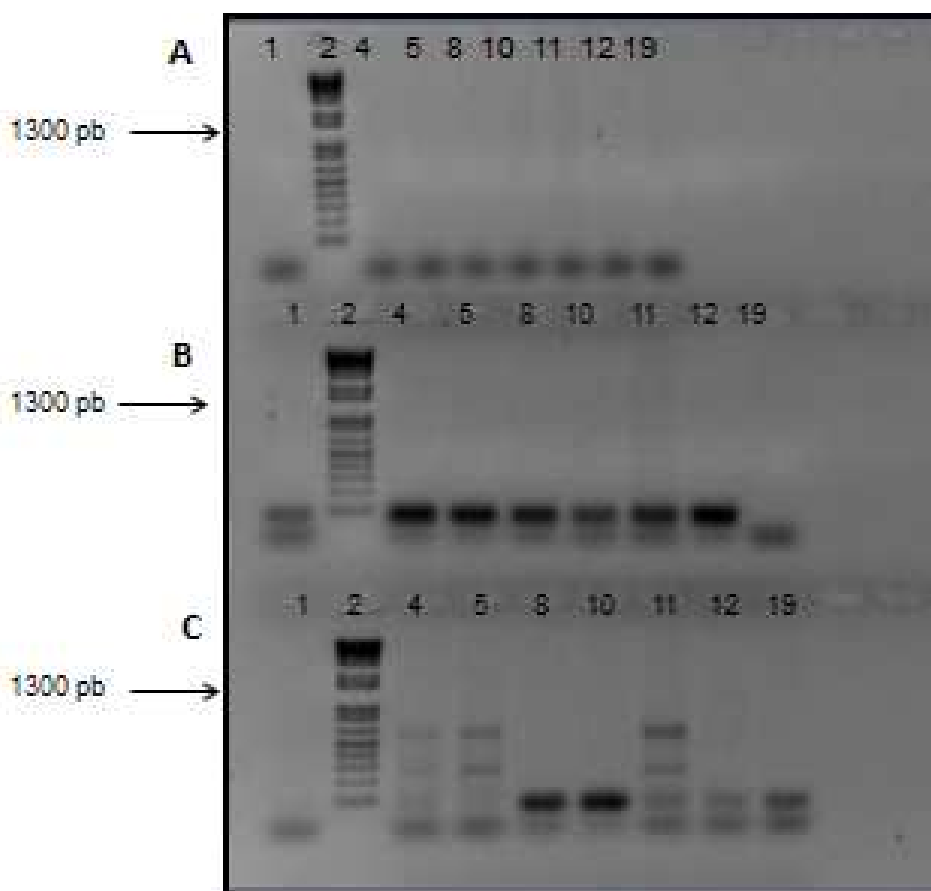
**Figura 29.** Identificación preliminar de begomovirus por PCR-RFLP obtenidos de las plantas de chile injertadas con *sida acuta*. Panel a). Digestión con la enzima *MspI*, Panel b). Digestión con la enzima *HhaI*. Carril 1: Control positivo TYLCV, carril 2: Marcador de peso molecular 1 Kb plus, Carriles 7-15: Planta de chile injertadas con *Sida acuta*.



**Figura 30.** Identificación preliminar de begomovirus por PCR-RFLP obtenidos de las plantas de tomate injertadas con *sida acuta*. Panel A). Digestion con enzima MspI, Panel B). Digestión con enzima HhaI. Carril 1: Control positivo TYLCV, Carril 2: Marcador de peso molecular 1kb plus, Carriles 3-6: Plantas de tomate injertadas con *Sida acuta*.

### 7.12. Detección de partículas subvirales asociadas a SiMSV mediante PCR en plantas de *sida acuta*.

Para determinar la presencia de partículas subvirales alpha y beta-satélites asociadas a begomovirus se utilizaron DNAs totales de las plantas de *sida acuta* portadoras de SiMSV las cuales fueron utilizadas para los bioensayos transmisión mediante injerto. El análisis de las plantas de *sida acuta* fue negativo ya que no se logró amplificar los fragmentos esperados de 1300 pb aproximadamente (Figura 31).



**Figura 31.** Detección de partículas subvirales asociadas a SiMSV mediante PCR. Panel A). Detección de alphasatélites con primers DNA 101 y 102, Panel B). Detección de alphasatélites con primers UN101-102. Panel C). Detección de betasatélites con primers Beta01-02 Carril 1: Control negativo, Carril 2: Marcador de peso molecular 1 Kb plus, Carriles 4-19: Plantas de *Sida acuta* de campo.

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Se determinó la capacidad de SiMSV para transmitirse a través de semilla en su hospedante natural. Representando la primera evidencia en el mundo para el género *Begomovirus*.
- ❖ Se confirmó a SiMSV infectando cultivos de chile y tomate en el norte de Sinaloa. Este hecho representa la adaptación de un virus nativo de maleza a cultivos de importancia comercial.
- ❖ Se confirmó la capacidad de SiMSV de infectar plantas chile a nivel experimental.
- ❖ Los resultados indican que SiMSV es un begomovirus nativo de maleza que en ensayos de laboratorio es capaz de inducir síntomas en plantas de chile.
- ❖ Se confirmó la capacidad de SiMSV de infectar plantas tomate a nivel experimental.
- ❖ No se logró detectar partículas subvirales asociadas a infecciones de begomovirus en plantas de *sida acuta*.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Academic press, London and New York.
- ❖ Accotto, G., M. Bragaloni, D. Luison, S. Davino, and M. Davino. 2003. First report of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Italy. *Plant Pathology* 52: 799.
- ❖ Agrios, G.N. 2005. *Fitopatología*. 2da edición. Editorial UTEHA Noriega editores. Mexico, DF. 838 p.
- ❖ Ascencio-Ibañez J T., Arguello-Astorga G.R., Méndez-Lozano, J, and Rivera Bustamante R F. 2002. First report of Fhynchosia golden mosaic virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86:692.
- ❖ Ascencio-Ibañez, J., R. Díaz-Plaza, J. Méndez-Lozano, Z. Monsalve-Fonnegra, G. Arguello-Astorga and R. Rivera-Bustamante. 1999. First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease*. 83:1178.
- ❖ Atiri G (1984) Okra mosaic virus in weeds (*Sida* spp.). *Journal of Plant Protection in the Tropics*. 1: 55-57.
- ❖ Benton, J. 2001. *Compendium of Tomato Diseases*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. Ed. Mundi-Prensa. 74 pp.
- ❖ Bird J (1975) *Tropical Diseases of Legumes*, 1 edn. Academic Press, New York.
- ❖ Brown, J. K., and J. Bird. 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Disease*. 76: 220–225.
- ❖ Carrington, J.C. 1995. Transgenic complementation in virus-resistance plant an new plant viruses. *Proceeding of workshop*. 20-21, April.
- ❖ Chivasa S, Ekpo EJA, Hicks RGT (2001) New hosts of *Turnip mosaic virus* in
- ❖ Costa AS (1955) Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift* 24:
- ❖ Costa AS, Bennett CW (1953) A probable vector of *Abutilon mosaic virus* on species of sida in Florida. *The Plant Disease Reporter* 37: 92-93.

- ❖ Costa AS, Carvalho AM (1960) Mechanical transmission and properties of the *Abutilon mosaic virus*. *Phytopathologische Zeitschrift* 37: 259-272.
- ❖ Duffus, J.E., and Gold, A.H. 1973. Infectivity neutralization used in serology test with partially purified Beet curly top virus. *Phytopathology*. 63:1107-1110.
  
- ❖ Creamer, R., Luque-Williams, M., and Howo, M. 1996. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. *Plant Dis*. 80:533-535.
  
- ❖ Egley GH (1976) Germination of developing prickly sida seeds. *Weed Science* 24: 239-243.
- ❖ Espinoza-Mancillas, M.G. 2008. Analisis de la diversidad genética de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en cultivos de tomate en Sinaloa. *Biotecnología Agrícola*. Guasave, Sinaloa, CIIDIR-SIN, IPN. Maestría en Ciencias. pp 112.
- ❖ FAO (Organización para la agricultura y la alimentación). 2009. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- ❖ Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148: 405-421.
- ❖ Fauquet, C. and J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of *Geminivirus* taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology*. 150:2151–2179.
- ❖ Fauquet, C., D. Bisaro, R. Briddon, J. Brown, B. Harrison, E. Rybicki, D. Stenger and J. Stanley. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of Begomovirus species. *Archives of Virology*. 148: 405–421.

- ❖ Fauquet, C., S. Sawyer, A. Idris and J. Brown. 2005. Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins. *Phytopathology*. 95:549-555.
- ❖ Franzotti EM, Santos CVF, Rodrigues HMSL, Mouro RHV, Andrade MR, Antonioli AR (2000) Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *Journal of Ethnopharmacology* 72: 273-277
- ❖ Frischmuth T, Engel M, Lauster S, Jeske H (1997) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted, sida-infecting bipartite geminiviruses in Central America. *Journal of General Virology* 78: 2675-2682.
- ❖ Gallegos, H. 1978. Enchinamiento del tomate (chino disease of tomato). In *Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa*. Sinaloa, México. Secretaria Agricultura. Recursos Hidráulicos. 119 p.
- ❖ Gámez-Jiménez, C. 2007. Identificación y caracterización molecular del Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) y otros begomovirus asociados al cultivo de tomate en Sinaloa. Tesis para obtener el grado en maestro en ciencias. CIIDIR-SIN.
- ❖ Gámez-Jiménez, C., J. L. Romero-Romero, M. E. Santos-Cervantes, N. E. Leyva-López and J. Méndez-Lozano. 2009. Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) as a Natural New Host for Tomato yellow leaf curl virus in Sinaloa, México. *Plant disease*. 93:54.
- ❖ García, S., D. Miguel, S. Sánchez-Campos, J. Navas-Castillo and E. Moriones. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology*. 365:210–219.
- ❖ Ghosal S, Chauhan RBPS, Mehta R (1975) Alkaloids of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry* 14: 830-832.
- ❖ Goodman, R.M., Shock, T.L., Haber, S., Browning, K.S., Bowers, G.R. 1980. The composition of vean golden mosaic virus and its single-stranded DNA genome. *Virology* 106:168-172.
- ❖ Heald FD (1933) *Manual of Plant Diseases*, Second edn. Mcgraw-Hill book company, New York.

- ❖ Hofer P, Engel M, Jeske H, Frischmuth T (1997) Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Journal of General Virology* 78: 1785-1790.
- ❖ Howell, S.H. 1984. Physical structure and genetic organization of the genome of maize streak virus (Kenyan isolate). *Nucleic Acids Res.* 12:7359:7375.
- ❖ Hull, R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Academic Press. Fourth Edition. San Diego, EUA. Pp. 1-12, 27-28, 56-58, 180.
- ❖ Hull, R. 2002. *Matthews Plant Virology*. Fourth Edition. Academic Press. 1001 p.
- ❖ Hunziker, A.T. 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London. pp49-85.
- ❖ Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T., and Jeske, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomovirus different from *Abutilon* mosaic virus. *Arch. Virol.* 149: 829-841.
- ❖ Kumar R, Ambasht RS, Srivastava A, Srivastava NK, Sinha A (1997) Reduction of nitrogen losses through erosion by *Leonotis nepetaefolia* and *Sida acuta* in simulated rain intensities. *Ecological Engineering* 8: 233.
- ❖ Kumar R, Ambasht RS, Srivastava AK, Srivastava NK (1996) Role of some riparian wetland plants in reducing erosion of organic carbon and selected cations. *Ecological Engineering* 6: 227-239.
- ❖ Kunkel LO (1925) Mosaic and related diseases. *American Journal of Botany* 12: 517-521.
- ❖ Kunkel LO (1930) Transmission of *Sida* mosaic by grafting. *Phytopathology* 20: 129-130.
- ❖ Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2006. *Biología de los microorganismos*. PEARSON. Prentice Hall. 1011 p.
- ❖ Magallanes-Tapia, M.A. 2008. Distribución del virus de la clorosis del tomate (ToCV) y el Virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV) infectando tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Sinaloa y su presencia en el noroeste de

México. Biotecnología Agrícola. Guasave, Sinaloa, CIIDIR-SIN, IPN. Maestría en Ciencias. pp86

- ❖ Martínez, Y., M. Quiñones, D. Fonseca and I. Miranda. 2003. Prospección nacional de Begomovirus presentes en el cultivo del tomate en Cuba. *Protección Vegetal*. 18: 168-175.
- ❖ Mendez, L.J., Torres, P.I., Fauquet, C.M. y Rivera. B.R.F. 2002. Interactions Between Geminiviruses in a Naturally occurring mixture: Pepper Huasteco Virus and Pepper Golden Mosaic virus. *The American Phytopathological Society*. 93:270-272 pp.
- ❖ Méndez-Lozano J., I. Torres-Pacheco, C.M. Fauquet and R. F. Rivera-Bustamante. 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Peppers golden mosaic virus. *Phytopathology*. 93:270-277.
- ❖ Méndez-Lozano, J. 2002. Aspectos Biológicos y Moleculares de la Interacción entre el Virus Huasteco del Chile y el Virus Mosaico Dorado del Chile. Ingeniería Genética. Irapuato, Guanajuato. CINVESTAV. Doctor en Ciencias. pp 159.
- ❖ Moriones, E. and J. Navas-Castillo. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*. 71:123-134.
- ❖ Moriones, E. and J. Navas-Castillo. 2008. Review. Rapid evolution of the population of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease after invasión of a new ecological niche. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6:147-159.
- ❖ Nakhla, M. and D. Maxwell. 1999. Epidemiology and management of tomato yellow leaf curl disease. Pages 565-583. in: *Plant Virus Disease Control*. A. Hadidi, R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- ❖ Polston, E. and K. Anderson. 1997. The Emergence Of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*. 81:1358-1369.

- ❖ Ramírez-Villapudua, J. and R. A. Sáinz-Rodríguez. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ª edición. Once Ríos Editores. 360 p.
- ❖ Ribeiro, S. G., B. Ambrozevicius, A. C. Avil, I. C. Bezerra, R. F. Calegario, J. H. Fernández, M. F. Lima, R. N. de Mello, H. Rocha and F. M. Zerbini. 2003. Distribution and genetic diversity of tomato infecting begomoviruses in Brazil. *Archives Virology*. 148: 281–295.
- ❖ Robinson EL (1975) Dormancy of *Sida spinosa* seeds. *Plant Physiology* 56: 85
- ❖ Rochester, D. E., McLaughlin, W.A., Nakhla, M.K., and Maxwell, D.P. 1977. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* spp., *Macroptilium lathyroides*, and *wissadula amplissima* from Jamaica.
- ❖ Ruelas-Ayala, R.D. 2007. Variabilidad genética en Begomovirus en soya y malezas en Sinaloa. Biotecnología Agrícola. Guasave, Sinaloa, CIIDIR-SIN, IPN. Maestría en Ciencias. pp 88.
- ❖ Ruiz-Herrera, J., D. Guzmán de Peña and J. Peña-Cabriales. 1997. Los Geminivirus: Patógenos de Plantas como Modelos En:“Perspectivas de la Microbiología en México”. Eds. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 323pp.
- ❖ Rybicki, E. 2008. Introduction to Molecular Virology. [http : // www. mcb. uct. ac. Za/tutorial/virtut2.html](http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/virtut2.html)
- ❖ Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd Ed. Journal.
- ❖ Sánchez-Campos, S., J. A. Díaz, F. Monci, E. R. Bejarano, J. Reina, J. Navas-Castillo, M. A. Aranda and E. Moriones. 1999a. High genetic stability of the begomovirus Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in southern Spain over an 8-year period. *Phytopathology*. 92: 842–849.
- ❖ Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Diaz, J. A., and Moriones, E. 1999b. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics ins Spain. *Phytopahology* 89:1038-1043.

- ❖ SIAP-SAGARPA (Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion). 2008. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- ❖ Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasmas-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*. 62:2988-2993.
- ❖ Smith FF (1926) Some cytological and physiological studies of mosaic diseases and leaf variegations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 13: 425-484.
- ❖ Strange, C. 2006. Interaccion planta-virus durante el proceso infectivo. *Ciencia e Investigacion Agraria* 33: 3-21.
- ❖ Torres-Pacheco, I., J. A. Garzon-Tiznado, J. K. Brown, A. Beccera-Flora and R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology*. 86: 1186–1192.
- ❖ Venkatesh S, Reddya YSR, Suresha B, Reddy BM, Ramesh M (1999) Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sida rhomboidea* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 229-232.
- ❖ Webster, R.G. and Granoff, A. 1994. *Encyclopedia of virology*. Vol 1. Academic Press. 516 p.
- ❖ Xie, Y. and X. P. Zhou. 2003. Molecular characterization of squash leaf curl Yunnan virus, a new begomovirus and evidence for recombination. *Archives Virology*. 148: 2047–2054.
- ❖ Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., and Kirkpatrick, B. C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay, *J. Virol. Methods* 71:45-50.
- ❖ Zimbabwe. *Plant Pathology* 51: 389.