



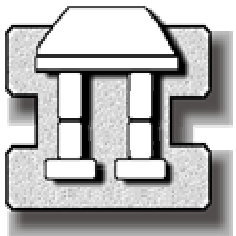
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CAMPUS IZTACALA

REPLICACIÓN, MOVIMIENTO Y ACUMULACIÓN DEL RNA SATÉLITE DE  
CMV EN HUÉSPEDES EXPERIMENTALES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ARRIAGA CANON CRISTIAN GABRIEL  
OLIVERIO

ASESOR: DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA



TLANEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología  
Molecular del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
del CINVESTAV-IPN, con la asesoría del Dr. Roberto Ruiz  
Medrano y la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares.**

*A mis padres:*

*Que han sido un gran ejemplo de  
amor, cariño y humildad.*

### **Agradecimientos**

A los Drs. Roberto Ruiz Medrano y Beatriz Xoconostle Cázares por el apoyo y asesoría que me brindaron a lo largo de todo el proyecto.

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente ante cualquier situación en la vida y por haberme enseñado que todo en la vida se construye a base de esfuerzos.

Al la familia Alfaro Arriaga por haberme brindado su amistad, apoyo y cariño.

A Elías Piedra Ibarra por su amistad, enseñanzas y consejos.

A mis amigos Luis, Rosana, Sarai, Mónica, Alfonso, José Luis, Jonathan, Erick por haberme dado su gran amistad.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera: Charles, David (El pocho), Dante, Ramse, Sonia, Nadia, Jessica, Adriana, Erick (Ra), Angel, Moisés, Lizeth, Uriel (El cuyo), Mónica, Felipe, Dario, Saulo, Julio, Nayelli, Erick Centenero, MAC, Luis (Caballo), Nayo, Maribel, Oswaldo, Gil, y todos los demás con los que compartí diferentes momentos en la carrera.

A mis sinodales, Dr. Rodolfo de la Torre, Dr. Diego Arenas, Dra. Beatriz Xoconostle y al Biol. Alejandro Cruz Monsalvo por los consejos y por la atención que tuvieron al revisar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular por haberme brindado su amistad y por los consejos que me dieron a lo largo de la elaboración del presente trabajo.

### **Dedicatoria**

A mis padres y mi hermano por haberme acompañado en las diferentes etapas de mi vida y por haberme dado la oportunidad y su apoyo, pude empezar y terminar una carrera. Gracias a ustedes lo logre. Recuerden que los amo y siempre los amaré.

A mis primos Efrén, Erick, Jorge, Miguel, Juan, Lorena, Morgan y Marlon por los momentos que compartimos.

A Elías Piedra Ibarra por ser mi amigo.

A Julián y Blanquita por su apoyo y por los diferentes momentos que compartimos a lo largo de nuestra amistad.

A Carlos, Vitorio, Víctor, Aseneth, Estela, Lourdes, Laura, Elisa, Conchita, Rocío, Edgar, José Luis, Héctor, Gabriel, Pilar, Aída, por el apoyo, consejos y momentos que compartimos en el laboratorio.

A Estela D' Abril por su cariño y amor.

A Mónica Monge por ser mi amiga de toda la vida.

A Rosana Picazo Mazatán por ser una mujer muy especial en mi vida; por su gran apoyo, por su gran cariño, por sus consejos, y por ser sobre todo mi amiga incondicional, gracias Ros.

---



---

**ÍNDICE GENERAL**

	Pag.
<b>Índice de figuras</b>	i
<b>Índice de Cuadros</b>	ii
<b>Abreviaturas</b>	iii
<b>Resumen</b>	iv
<b>Abstract</b>	v
<b>I. Introducción</b>	
1.1 Generalidades de los virus que infectan plantas.....	1
1.2 Replicación de virus de plantas.....	3
1.2.1 Replicación de virus de cadena positiva.....	3
1.2.2 Replicación de virus de cadena negativa.....	5
1.3 Movimiento célula a célula.....	5
1.4 Movimiento a larga distancia.....	7
1.5 Características generales del Virus mosaico del pepino (CMV).....	8
1.6 Agentes subvirales en plantas.....	10
1.6.1 Víroides.....	10
1.6.2 RNA satélites.....	11
1.6.3 Satélites de CMV.....	12
1.6.4 Mecanismos de patogenicidad de CMV satRNAs.....	13
1.6.5 Consideraciones evolutivas de los CMV satRNAs y viroides.....	14
<b>II. Justificación</b> .....	17
<b>III. Hipótesis</b> .....	18
<b>IV. Objetivos</b> .....	18
<b>V. Estrategia experimental</b> .....	19
<b>VI Materiales y métodos</b> .....	22
6.1 Recolección de <i>Leonotis nepetaefolia</i> con síntomas de virosis en Atlixco, Puebla.....	22
6.2 Caracterización molecular del CMV satRNA de <i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) Brown.....	22
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos.....	22
6.3 Extracción de RNA total de tejido vegetal.....	23
6.4 Amplificación, clonación y secuenciación del satélite.....	24
6.5 Preparación y transformación de células competentes.....	26
6.6 Extracción de DNA plásmidico de <i>E.coli</i> transformadas.....	27
6.7 Análisis filogenético de CMV satRNA Leo.....	28
6.8 Inoculación mecánica de plantas sanas con CMV Leo, CMV Bra y CMV satRNA.....	28
6.9 Análisis de la replicación, acumulación y movimiento de CMV satRNA Leo en huéspedes experimentales inoculados con CMV del grupo I y II.....	29
6.9.1 Síntesis <i>in vitro</i> de CMV satRNA Leo.....	30
6.9.2 Detección de los componentes genómicos de los patógenos mediante hibridación tipo Northern y Dot Blot.....	30

---

---

<b>VII Resultados</b> .....	33
<b>7.1</b> Descripción botánica de <i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) Brown.....	33
<b>7.2</b> Descripción del sitio de colecta.....	34
<b>7.3</b> Selección de plantas de <i>Leonotis nepetaefolia</i> infectadas con CMV y CMV satRNA para fuente de inóculo.....	34
<b>7.4</b> Caracterización molecular del RNA satélite asociado a CMV en <i>L. nepetaefolia</i> y del aislamiento de CMV brasileño.....	37
<b>7.5</b> Análisis del comportamiento de CMV satRNA Leo en huéspedes experimentales inoculado con dos aislamientos de CMV.....	42
<b>7.6</b> Determinación de replicación y acumulación de CMV y CMV satRNA Leo en las hojas inoculadas de los huéspedes experimentales.....	48
<b>7.7</b> Detección del movimiento a larga distancia y acumulación de CMV CP y CMV satRNA Leo en tejidos jóvenes de los huéspedes experimentales.....	50
<b>7.8</b> Análisis de la replicación, acumulación y movimiento de CMV satRNA en ausencia de CMV mediante inoculaciones con transcritos <i>in vitro</i> en huéspedes susceptibles.....	54
<b>VIII Discusión</b> .....	58
<b>IX Conclusiones</b> .....	64
<b>X Referencias</b> .....	65



ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.-</b> Relación de infecciones simples, dobles y triples de AMV, CMV y CMV satRNA en muestras de <i>Leonotis nepetaefolia</i> con mosaico, cálico y reducción foliar, determinado mediante hibridación en punto.....	35
<b>Figura 2.-</b> Amplificación de los virus en <i>Leonotis nepetaefolia</i> presuntamente infectada con CMV y CMV satRNA.....	36
<b>Figura 3.-</b> Árbol filogenético sin raíz elaborado con la secuencia nucleotídica de CMV satRNA Leo y de satélites reportados en otras partes del mundo mediante un modelo de distancia genética.....	38
<b>Figura 4.-</b> Árbol filogenético sin raíz construido con la secuencia nucleotídica de CMV satRNA Leo y secuencias de satélites depositadas en el GenBank mediante un modelo de máxima parsimonia.....	39
<b>Figura 5.-</b> Alineamiento múltiple de la secuencia de CMV satRNA de <i>L. nepetaefolia</i> y WL2 (clorótico) y CMVKN (necrogénico).....	41
<b>Figura 6.-</b> Árbol filogenético sin raíz construido mediante máxima parsimonia con algunas secuencias de la CP depositadas en el GenBank incluyendo a CMV Leo y CMV Bra.....	43
<b>Figura 7.-</b> Huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva conteniendo la combinación CMV Leo / CMV satRNA Leo.....	46
<b>Figura 8.-</b> Huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva conteniendo la combinación CMV Bra / CMV satRNA.....	47
<b>Figura 9.-</b> Detección de CP de CMV Leo, CMV Bra y CMV satRNA en las hojas inoculadas de los huéspedes experimentales mediante hibridación tipo Northern Blot.....	49
<b>Figura 10.-</b> Detección de CMV CP de CMV Leo, CMV Bra y CMV satRNA en las hojas jóvenes de los huéspedes experimentales mediante hibridación tipo Northern Blot.....	52
<b>Figura 11.-</b> Mapa del vector pDrive con el inserto de CMV satRNA utilizando la enzima de restricción HindIII que reconoce y corta río abajo del promotor T7 y productos de reacciones de transcripción <i>in vitro</i> utilizando T7 polimerasa y pDrive:CMV satRNA Leo....	54

<b>Figura 12.-</b> Detección de CMV satRNA y CMV CP mediante hibridación en punto en hojas inoculadas y jóvenes de <i>C. pepo</i> inoculada con CMV satRNA sintetizado <i>in vitro</i> .....	56
<b>Figura 13.-</b> Plantas de <i>C. pepo</i> inoculadas con diferentes combinaciones virales.....	57

---

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
<b>Cuadro 1.-</b> Síntomas desarrollados en huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva de los aislamientos CMV Leo y CMV Bra.....	45
<b>Cuadro 2.-</b> Síntomas desarrollados en huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva de los aislamientos CMV Leo / CMV satRNA Leo y CMV Bra / CMV satRNA Leo.....	45
<b>Cuadro 3.-</b> Concentración relativa de CMV CP Leo, CMV CP Bra y CMV satRNA en hojas locales y jóvenes de huéspedes experimentales inoculados con mezclas del satélite y de aislamientos virales.....	53

---

---

**ABREVIATURAS**


---

AMV	Virus mosaico de alfalfa
CARNA-5	RNA-5 asociado a CMV
CCR	Región central conservada
CMV	Virus mosaico del pepino
CMV satRNA	RNA satélite de CMV o CARNA-5
CP	Proteína de la cápside
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNA dc	DNA de doble cadena
DNA cs	DNA cadena sencilla
kDa	kilo Daltones
dpi	Días posteriores a inoculación
MP	Proteína del movimiento
mRNA	RNA mensajero
nm	nanómetros
NP	Nucleoproteico
ORF	Marco de lectura abierto
ORSV	Virus de la mancha anillada del <i>Odontoglossum</i>
P	Dominio de patogenidad
PCD	Muerte celular programada
PSV	Virus del enanismo del cacahuete
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional
RCNMV	Virus del mosaico necrótico del trébol rojo
RdRp	RNA polimerasa RNA dependiente
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNA cs	RNA de cadena sencilla
RNA dc	RNA de doble cadena
RNP	Ribonucleoproteico
SEL	Limite de exclusión
TL	Terminal izquierdo
TMV	Virus mosaico del tabaco
TRSV	Virus de la mancha anular del tabaco
TR	Terminal derecho
V	Dominio variable

---

## RESUMEN

Los virus de plantas frecuentemente contienen RNA de bajo peso molecular conocidos como RNA satélite, estos no presentan homología con el genoma viral y dependiendo del huésped, del virus y del RNA satélite pueden incrementar o disminuir los síntomas causados por el virus nodriza. Los síntomas provocados por infecciones mixtas en algunas plantas pueden aumentar o decrecer respecto a los generados por infecciones simples. Las pérdidas ocasionadas en cultivos de jitomate asociadas con infecciones de CMVsat/CMV junto con la posibilidad de utilizar al RNA satélite para proteger a plantas cultivadas contra infecciones virales estimularon el interés en la caracterización molecular y el discernimiento de las interacciones que a nivel molecular establecen los RNA satélites, virus y huéspedes. En México, se ha reportado la presencia de complejos virales en malezas en los cuales se encuentra CMV y un satélite asociado. El objetivo en este trabajo fue analizar la transmisión, replicación, acumulación, movimiento a larga distancia y efectos fenotípicos de CMV satRNA en algunos huéspedes experimentales en combinación con aislamientos de CMV del grupo I y II. Se amplificó, clonó y secuenció el genoma del satélite y se determinó mediante análisis filogenéticos el grupo de satélites al que pertenece. Adicionalmente, se hicieron inoculaciones mixtas con CMV leo, CMV satRNA leo y un aislamiento de CMV obtenido en Brasil a fin de probar si ambos virus apoyan la replicación y el movimiento de CMV satRNA, así como inoculaciones con el transcrito correspondiente a CMV satRNA para probar si algunos factores del huésped son capaces de suplir al virus nodriza. Los resultados sugieren que en algunos huéspedes experimentales el RNA satélite puede replicarse y moverse a larga distancia inclusive en ausencia de CMV.

**ABSTRACT**

The virus of plants frequently contains RNAs of low molecular weight it known as RNAs satellites, they don't present homology with the viral genoma and depending on the host, virus and the RNA satellite they can increase or decrement the symptoms caused by the helper virus. The symptoms induced by several types of viruses in mixed infections increase or decrease the symptoms caused by simple infections in some susceptible plants. The losses associated to infections of CMVsat/CMV in tomato crops together with the possibility of using the satellite to protect cultivated plants against viral infection, has stimulated the Interest in the molecular characterization and discernment of the satellite-virus and host interactions a molecular level. In Mexico, it has been reported the presence of complex viral in overgrowths in which CMV and an associated satellite. Based on these antecedents, the aim of this work was to analyze the transmission, replication, accumulation, long distance movement and phenotypic effects of CMV satRNA in some experimental hosts in combination with isolations of CMV from group I and II. For this, we proceeded to the amplification, clonating and sequencing of the RNA satellite genome. Phylogenetic analysis was done for group of satellites using distance models and maximum parsimony. Mixed inoculations were made with CMV leo, CMV satRNA leo and an isolation of CMV obtained in Brazil in order to prove if both virus supports the replication and the movement of CMV satRNA. The results suggest that in some experimental hosts the RNA satellite can replicate and move long distance in some susceptible hosts, with no detectable CMV present.

## RESUMEN

Los virus de plantas frecuentemente contienen RNA de bajo peso molecular conocidos como RNA satélite, estos no presentan homología con el genoma viral y dependiendo del huésped, del virus y del RNA satélite pueden incrementar o disminuir los síntomas causados por el virus nodriza. Los síntomas provocados por infecciones mixtas en algunas plantas pueden aumentar o decrecer respecto a los generados por infecciones simples. Las pérdidas ocasionadas en cultivos de jitomate asociadas con infecciones de CMVsat/CMV junto con la posibilidad de utilizar al RNA satélite para proteger a plantas cultivadas contra infecciones virales estimularon el interés en la caracterización molecular y el discernimiento de las interacciones que a nivel molecular establecen los RNA satélites, virus y huéspedes. En México, se ha reportado la presencia de complejos virales en malezas en los cuales se encuentra CMV y un satélite asociado. El objetivo en este trabajo fue analizar la transmisión, replicación, acumulación, movimiento a larga distancia y efectos fenotípicos de CMV satRNA en algunos huéspedes experimentales en combinación con aislamientos de CMV del grupo I y II. Se amplificó, clonó y secuenció el genoma del satélite y se determinó mediante análisis filogenéticos el grupo de satélites al que pertenece. Adicionalmente, se hicieron inoculaciones mixtas con CMV leo, CMV satRNA leo y un aislamiento de CMV obtenido en Brasil a fin de probar si ambos virus apoyan la replicación y el movimiento de CMV satRNA, así como inoculaciones con el transcrito correspondiente a CMV satRNA para probar si algunos factores del huésped son capaces de suplir al virus nodriza. Los resultados sugieren que en algunos huéspedes experimentales el RNA satélite puede replicarse y moverse a larga distancia inclusive en ausencia de CMV.

**ABSTRACT**

The virus of plants frequently contains RNAs of low molecular weight it known as RNAs satellites, they don't present homology with the viral genoma and depending on the host, virus and the RNA satellite they can increase or decrement the symptoms caused by the helper virus. The symptoms induced by several types of viruses in mixed infections increase or decrease the symptoms caused by simple infections in some susceptible plants. The losses associated to infections of CMVsat/CMV in tomato crops together with the possibility of using the satellite to protect cultivated plants against viral infection, has stimulated the Interest in the molecular characterization and discernment of the satellite-virus and host interactions a molecular level. In Mexico, it has been reported the presence of complex viral in overgrowths in which CMV and an associated satellite. Based on these antecedents, the aim of this work was to analyze the transmission, replication, accumulation, long distance movement and phenotypic effects of CMV satRNA in some experimental hosts in combination with isolations of CMV from group I and II. For this, we proceeded to the amplification, clonating and sequencing of the RNA satellite genome. Phylogenetic analysis was done for group of satellites using distance models and maximum parsimony. Mixed inoculations were made with CMV leo, CMV satRNA leo and an isolation of CMV obtained in Brazil in order to prove if both virus supports the replication and the movement of CMV satRNA. The results suggest that in some experimental hosts the RNA satellite can replicate and move long distance in some susceptible hosts, with no detectable CMV present.

## I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades de los virus que infectan plantas

Los virus son parásitos intracelulares obligados cuyos ácidos nucleicos se encuentran envueltos por una cápside de naturaleza proteica y contienen la información necesaria para la replicación y diseminación viral. Para cumplir con estas funciones los factores virales actúan en coordinación con parte del sistema enzimático de los huéspedes (bacterias, hongos, animales o plantas). Durante mucho tiempo se creyó que los virus que infectan plantas almacenaban su información genética exclusivamente en moléculas de RNA dado que alrededor del 99% lo hacen en moléculas de RNA de cadena sencilla (RNAs) o de doble cadena (RNAdc), sin embargo paulatinamente se fueron encontrando virus que contienen información genética en moléculas de DNA de cadena sencilla (DNAs) o de doble cadena (DNAdc), como los miembros de los grupos *Caulimovirus* y *Geminivirus*, que generan daños importantes en plantas de interés comercial. Estos virus contienen genes o marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican dos subunidades de la polimerasa viral, una proteína que participa en el movimiento dentro del huésped y uno más que codifica las subunidades de la cubierta proteica. En algunos virus estos genes están contenidos en una sola molécula por lo que se les denomina monopartitas (ejem. Tobamovirus, Potyvirus, etc.), en los bipartitas los genes están distribuidos en dos segmentos (ejem. Tobamovirus, Geminivirus, Comovirus, Furovirus etc.), mientras que en los tripartitas o multipartitas los genes están contenidos en tres segmentos (ejem. Bromoviridae, Hordeivirus, etc.) (Mathews, 1991).

La morfología de los virus varía desde los icosaédricos (ejem. Timovirus, Bromovirus, Cucumovirus, Tombusvirus y Sobemovirus, entre otros) hasta los filamentosos o de varilla flexible (ejem. Potexvirus, Closterovirus, etc) pasando por los filamentos de varilla rígida (ejem. Tobamovirus, Tobavirus, Ordeovirus, etc). Entre estos virus se encuentran algunos grupos que poseen envoltura membranosa (ejem. Rhabdovirus y Tospovirus) y



han sido relacionados con algunos virus que infectan animales. El tamaño de estos parásitos también varía en un rango muy amplio, por ejemplo la talla de los icosaédricos generalmente oscila entre los 17 y 70 nanómetros (nm), el de los basiliformes alrededor de 300nm y el de los virus en forma de varilla desde los 700 hasta los 2000nm de longitud (Mathews, 1991).

La clasificación y nomenclatura tradicional de los virus atendía a los síntomas producidos en huéspedes específicos, así por ejemplo el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) corresponde con un aislamiento que sistemáticamente produce manchas verde-amarillentas en las hojas de esas plantas y el virus del enanismo del cacahuate (PSV) tomó su nombre dado que impide el crecimiento normal de las plantas de cacahuate infectadas con ese virus (Mathews, 1991). Ese sistema de nomenclatura y clasificación presentó inconvenientes ya que los síntomas producidos por algunos virus pueden variar con la naturaleza y fenología del huésped, con las condiciones ambientales y con la naturaleza del aislamiento viral. Por esto se diseñó un sistema de clasificación que atiende a la naturaleza molecular del genoma, al número de segmentos hereditarios, a la posibilidad de la transcripción reversa y a la polaridad del genoma. Siguiendo estos criterios los virus están distribuidos en 240 géneros, de los cuales 211 han sido agrupados en 68 familias, los géneros restantes no han sido asignados a taxones superiores hasta la fecha. En la clasificación actual el Orden *Caudovirales* agrupa a virus de DNAdc distribuidos en tres familias (*Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*), el Orden *Mononegavirales* está integrado por virus, de RNAs de sentido negativo que infectan animales o plantas, distribuidos en cuatro familias (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y *Bornaviridae*) y el Orden *Nidovirales* contiene virus de RNAs de sentido positivo agrupados en dos familias (*Coronaviridae* y *Arteviridae*) (Pringle, 1999; Mayo, 2002).

## **1.2 Replicación de virus de plantas**

La mayoría de las plantas son susceptibles a la infección de virus y/o de otras entidades relacionadas (Virus crípticos, virus satélites, viroides, RNA satélites, etc.), cuando estas entidades son capaces de replicarse y moverse en plantas de interés económico pueden ocasionar la disminución en la productividad y por tanto pérdidas económicas cuantiosas.

Después de la entrada del virus a la célula vegetal, los ácidos nucleicos se exponen a la maquinaria enzimática del huésped y se expresan los genes que codifican las proteínas involucradas en la replicación y movimiento viral. Las replicasas o polimerasas virales (RdRp), junto con factores del huésped, sintetizan cadenas positivas y negativas e incluso realizan modificaciones (metilaciones) al RNA viral. La participación de factores codificados por el huésped en estos procesos ha permitido explicar la incapacidad de algunas RdRp virales para completar de manera autónoma el ciclo de replicación y ha despertado el interés por esclarecer el mecanismo en el que se engarzan los factores del huésped tanto en la replicación como en el movimiento de los virus en la planta (Bustamante y Hull, 1998).

### **1.2.1 Virus de cadena positiva**

La replicación de estos virus se realiza en el citoplasma mediante un proceso que se puede dividir en desencapsidación, traducción y replicación. Como ya se mencionó, en la primera etapa los ácidos nucleicos se exponen a la maquinaria celular y se sintetizan proteínas virales entre las que se encuentran las RdRp que unidas a la membrana celular llevan a cabo la replicación del genoma viral. La síntesis de las proteínas virales se realiza de manera secuencial, en la traducción temprana se sintetizan las RdRp y la proteína del movimiento, mientras que en la traducción tardía se sintetizan las proteínas que constituyen la cápside (CP). Inmediatamente después de la traducción temprana se inicia la multiplicación del genoma viral; primero las RdRp usan las cadenas positivas como

templado y sintetizan los RNA genómicos y subgenómicos a partir de los cuales las polimerasas sintetizan cadenas positivas que serán utilizados durante la traducción tardía, cuando es sintetizada la proteína que compone la cápside o envoltura y que finalmente, permite la formación de partículas virales o viriones (Bustamante y Hull, 1998).

El proceso replicativo de virus de cadena positiva más estudiado corresponde al de los Bromovirus, los virus de este grupo presentan generalmente una estructura icosaédrica y la información genética está almacenada en tres moléculas de RNA de cadena sencilla. La RNA polimerasa está codificada por los RNA 1 y 2 mientras que las proteínas requeridas para la infección sistémica (MP y CP) están codificadas en el RNA 3, sin embargo la CP es traducida a partir de un mRNA subgenómico (RNA 4) el cual es sintetizado a partir de la cadena negativa del RNA 3. La proteína sintetizada a partir del RNA 1 oscila entre los 109 kDa y contiene, además de un dominio de helicasa en su extremo carboxilo, un dominio metiltransferasa el cual probablemente está involucrado en la metilación del extremo 5' del RNA viral. Por otro lado, la proteína de 94 kDa codificada por el RNA 2 contiene un dominio central homólogo al de las polimerasas. Por su parte, las proteínas de la cápside presentan un peso que oscila entre los 25 y 40 kDa, contienen un dominio de unión a RNA en el extremo amino, y además de la protección del genoma, se le ha involucrado en el complejo de replicación y, en algunos casos, en los complejos ribonucleoproteínicos que participan en el movimiento del genoma del virus (Callaway *et al*, 2001). Las proteínas del movimiento viral (MP) oscilan entre los 30 KDa, están involucradas en el incremento del límite de exclusión de los plasmodesmos, forman estructuras tubulares e interactúan con el citoesqueleto, además que poseen la capacidad de unirse a ácidos nucleicos (Melcher, 2000).

### **1.2.2 Virus de cadena negativa**

El RNA de estos virus se encuentra formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) en los que el genoma (antigenoma) está asociado a nucleoproteínas (NP) e incorporado en la cápside junto con la polimerasa viral. Posterior a la entrada del virus a la célula y a la liberación del genoma, los RNA sirven como templado para la síntesis de los mRNA que permitirán la síntesis proteica y la síntesis de cadenas completas que podrán servir como moldes de más cadenas negativas o bien que podrán ser incorporadas en los RNP en las cubiertas virales (Bustamante y Hull, 1998).

### **1.3 Movimiento célula a célula**

Para explicar el movimiento de una célula a otra se ha propuesto que los virus aprovechan las rutas de comunicación (plasmodesmos y tejido vascular) que normalmente utilizan las plantas para trasladar los aminoácidos, proteínas, azúcares, RNA, fitoreguladores, etc, requeridos para su crecimiento y desarrollo (Lucas y Lee, 2004; Gilbertson, *et al*, 2001). Se propone que una vez que el virus se ha replicado en las células inicialmente infectadas procede a la invasión de las células adyacentes a través de una serie de conexiones o redes simplásmicas: los plasmodesmos. En este proceso participa la proteína del movimiento y, en algunos casos, también la proteína de la cápside en coordinación con proteínas codificadas por el huésped. El Virus del Mosaico del Pepino (CMV) representa al grupo de virus que dependen tanto de la MP como de la CP para su movimiento de una célula a otra, por su parte, el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) es el ejemplo mejor conocido de los virus que pueden realizar ese movimiento solamente con la participación de la MP.

La microscopia electrónica y otras aproximaciones experimentales han permitido establecer que los virus de plantas se pueden transportar por los plasmodesmos como complejos RNP (que incluyen a la CP y MP) o bien como partículas virales. Como se

mencionó previamente, las MP presentan dominios que permiten su unión tanto a ácidos nucleicos como a proteínas de la cápside, éstas a su vez interactúan con productos del huésped que favorecen su unión a proteínas de los plasmodesmos y finalmente su transporte de una célula a otra. Mediante la microscopia electrónica y marcadores fluorescentes también se ha establecido que las MP modifican el límite de exclusión (SEL) de los plasmodesmos permitiendo la translocación de moléculas comparativamente grandes mediante un mecanismo que no ha sido esclarecido (Carrington, *et al*, 1996; Gilbertson, *et al*, 2001; Lucas, 2006; Lough y Lucas, 2006).

Una gran diversidad de virus realizan su translocación entre células adyacentes mediante un mecanismo en el que solamente participa la proteína del movimiento. Entre estos virus el proceso mejor caracterizado corresponde al TMV. El proceso se ha dividido en tres etapas, durante la primera las MP interactúan con proteínas receptoras ancladas en los plasmodesmos provocando el aumento en su límite de exclusión, facilitando la transferencia de moléculas relativamente grandes. Normalmente los plasmodesmos permiten el tráfico de moléculas de alrededor de 800 Daltones; interactuando con la MP de TMV se permite el tráfico de moléculas en un rango de más de 15 kDa (Haywood *et al*, 2002). En la segunda etapa, los complejos MP-genoma se trasladan utilizando chaperonas, proteínas acompañantes y motores moleculares que constituyen los mecanismos moleculares que normalmente transportan moléculas a las células adyacentes; es probable que esta etapa involucre la fosforilación y desfosforilación de la MP mediada por GTPasas asociadas a los plasmodesmos. Finalmente, una vez que el complejo RNP ha sido trasladado a la célula receptora, se libera mediante un mecanismo que no ha sido esclarecido a la fecha (Carrington, *et al*, 1996; Heinlein, 2002; Lucas, 2006; Lough y Lucas, 2006;)

Adicionalmente, evidencias experimentales han sugerido que algunos virus se mueven de una célula a otra adhiriéndose a microtúbulos que atraviesan las paredes celulares o los

plasmodesmos. Se ha demostrado que unas proyecciones tubulares con diámetro aproximado al de las partículas virales están compuestas por la proteína del movimiento y posiblemente por factores del huésped. El modelo propuesto sugiere que, las MP virales favorecen la remoción de los desmotúbulos, se polimerizan formando microtúbulos anclados a proteínas de la membrana plasmática y/o al citoesqueleto de una o de ambas células favoreciendo de esa manera un crecimiento unidireccional. De esta manera, la interacción entre las MP de los microtúbulos con las CP de los viriones permitiría el movimiento de las partículas virales hacia las células adyacentes (Carrington, *et al.*, 1996; Gilbertson, 2001; Lucas, 2006; Lough y Lucas, 2006).

#### **1.4 Movimiento a larga distancia**

El movimiento a larga distancia, sistémico o vía floema, implica la capacidad del virus para entrar y salir de diferentes tejidos hasta alcanzar el tejido vascular, atravesando los plasmodesmos de las células acompañantes, y diseminarse por toda la planta invadiendo órganos no infectados. Las características morfofisiológicas de los plasmodesmos que conectan a los tubos cribosos con células acompañantes difieren de las presentadas por los plasmodesmos que conectan a las células del mesófilo. En los primeros, el lado que da hacia los tubos cribosos carece de retículo endoplasmático (RE) lo cual hace suponer que los procesos que permiten la salida de los virus o RNP de esas células involucra un proceso en el que participan factores virales y del huésped.

Los virus que presentan movimiento de una célula a otra independiente de la CP (como el TMV), requieren de esa proteína para su movimiento a larga distancia; análisis con TMV y RCNMV mutantes en CP muestran que se pueden mover eficientemente de célula a célula pero son incapaces de moverse sistémicamente. Por otro lado, genomas híbridos de TMV con la MP de ORSV son capaces de moverse célula a célula en plantas de tabaco pero son incapaces del movimiento a larga distancia. Análisis más específicos

muestran que la eliminación de 11 aminoácidos en el extremo carboxilo de la MP de ORSV confiere al TMV híbrido movimiento a larga distancia en tabaco, pero altera el movimiento célula a célula, estas evidencias ponen de manifiesto que la MP de ORSV además de tener funciones específicas en el movimiento célula a célula también participa en el movimiento a larga distancia (Carrington, *et al*, 1996, Canto *et al*; 1997; Gilbertson, *et al* 2001).

### **1.5 Características generales del Virus Mosaico del Pepino (CMV)**

El virus del mosaico del pepino, descrito en 1916 por Doolittle (Jagger, 1916 citado en Roossinck, 2001), es miembro del género *Cucumovirus* perteneciente a la familia *Bromoviridae*, sus partículas icosaédricas son de aproximadamente de 29 nm de diámetro y están compuestas por 180 subunidades proteicas (capsómeros). Con base en características serológicas, biológicas y atendiendo a su distribución geográfica los aislamientos se han agrupado en dos; los aislados de zonas tropicales e inductores de síntomas severos en la mayoría de sus huéspedes, corresponden al subgrupo I, mientras que los aislados de zonas templadas y asociados generalmente con síntomas leves, pertenecen al subgrupo II (Palukaitis, *et al*, 1992; Brunt, *et al*, 1996). El análisis filogenético con la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de la proteína de la cápside, así como de la región 5' no traducida del RNA 3 han conducido a proponer una reagrupación de las variantes de CMV en la cual los miembros del grupo I se han dividido en los subgrupos A y B (Roossinck, *et al*, 1999).

El genoma tripartita de CMV codifica cinco proteínas, el RNA 1 codifica la proteína (1a) que contiene los dominios de metiltransferasa y helicasa requeridos para la replicación viral (Kadaré and Haenni, 1997; Rozanov *et al*; 1992). El RNA 2 codifica la proteína (2a) con actividad de polimerasa (Ishima and Barbier, 1994; O' Reilly and Kao, 1998) y una proteína (2b) relacionada con la inhibición o supresión del silenciamiento génico

postranscripcional (PTGS) en virus del grupo II (Béclin *et al*, 1998). El RNA 3 codifica dos proteínas, la MP expresada del ORF del extremo 5' y la CP traducida a partir de un RNA subgenómico (RNA 4) sintetizado a partir de un promotor interno, ambas proteínas como ya se describió, son requeridas para el movimiento del virus de una célula a otra y para su diseminación a larga distancia (Canto *et al*; 1997).

El CMV es de los virus con rango de huéspedes más numeroso, infecta a más de 1000 especies pertenecientes a 85 familias entre las que hay una gran cantidad de plantas de importancia económica (Roossinck, 2001). En el año de 1972 los cultivos de jitomate en Francia fueron devastados por una enfermedad necrótica que inicialmente fue asociada con un variante de CMV que supuestamente se habría originado de los aislamientos no dañinos comunes en los cultivos de jitomate en esa región; años después, en muestras de esas plantas, se detectó un RNA de bajo peso molecular que aparentemente dependía del CMV para su replicación y movimiento, y que asociado a las variantes de CMV comunes en Francia habrían provocado el fenotipo necrótico (Kaper y Waterworth, 1977). Veinte años más tarde en el este de España una enfermedad parecida acabó con los cultivos de jitomate, los análisis moleculares permitieron concluir que el agente causal de esta enfermedad era una variante de CMV también asociado a un RNA de bajo peso molecular que al parecer dependía del virus nodriza para su replicación y encapsidación al que se le había denominado RNA satélite de CMV (CMV satRNA o CARNA-5) (Escriú *et al*, 2000).

## **1.6 Agentes subvirales en plantas**

### **1.6.1 Viroides**

Los viroides son moléculas de RNA de cadena sencilla, circular, con longitud aproximada de 300nt que infectan gran cantidad de plantas económicamente importantes causando pérdidas severas. El genoma de estos patógenos carece de ORF por lo que se supone



dependen de enzimas codificadas por el huésped para su replicación y diseminación sistémica, debido a esa carencia de productos proteicos también se ha propuesto que los síntomas provocados en algunos huéspedes son generados por la interacción directa de la molécula de RNA con factores endógenos aún desconocidos, lo cual alteraría los patrones de expresión genética, el desarrollo y el crecimiento de la planta. En la estructura secundaria adoptada por la molécula circular de los viroides se han caracterizado cinco dominios estructurales: un dominio central (C) que contiene una región conocida como región central conservada (CCR), la cual está involucrada en la replicación, un dominio de patogenicidad (P) que se ha asociado con la expresión de síntomas, un dominio variable (V) que presenta una alta variabilidad entre viroides y dos dominios terminales, uno izquierdo (TL) y uno derecho (TR), que son intercambiables entre viroides y están involucrados en el movimiento a través de toda la planta. A estos parásitos se les ha agrupado en dos familias, los pertenecientes a *Avsunviroidae* carecen de una secuencia conservada en la región central del genoma (CCR), en los miembros de la familia *Pospiviroidae* esta región es capaz de adoptar una estructura secundaria, que al parecer, es importante en la replicación y procesamiento. Los *Avsunviroidae* tienen la capacidad de auto catalizar los concatámeros formados durante su replicación por círculo rodante. Por otro lado, los miembros de la familia *Pospiviroidae* contienen CCR pero carecen de actividad autocatalítica. Así, los miembros de la familia *Avsunviroidae* se replican y se acumulan en los cloroplastos mientras que los miembros de la familia *Pospiviroidae* se replican y acumulan en el nucleolo por lo que se ha propuesto que la replicación es realizada por las RNA polimerasa II DNA dependiente del huésped (Góra-Sochacka, 2004).

### 1.6.2 RNA satélites

Frecuentemente en las plantas infectadas por virus se encuentran RNAs con longitud en un rango de 200 a 1500 nt sin homología con el genoma viral ni con el del huésped y, al parecer, dependientes del virus nodriza para su replicación, movimiento y encapsidación dado que carecen de ORF funcionales. Aún cuando en los satélites largos se han detectado secuencias que podrían constituir marcos de lectura, no se les ha encontrado una función biológica. Los satRNA cortos carecen de ORF y pueden presentar alternativamente estructuras moleculares lineares o circulares, a estos últimos se les ha denominado virusoides haciendo referencia a su parecido estructural con los viroides (Roossinck, *et al*, 1992).

La primera evidencia de los RNA satélites fue obtenida por Schneider en 1969, este satRNA estaba asociado al virus de la mancha anular del tabaco (TRSV) y dependía del virus nodriza tal como el virus depende de factores del huésped, así la replicación del satélite estaba sujeta a la interacción molecular entre un complejo formado por el huésped, el virus nodriza y el propio satélite (Roossinck, *et al*, 1992). A la fecha, pese que se conocen satélites asociados a una gran diversidad de virus y, que se han analizado y determinado los dominios estructurales que las secuencias pueden adoptar en condiciones *in vivo*, se desconocen aún la interacciones que permiten su replicación y las que provocan la alteración fenotípica.

Los satRNA pueden exacerbar o atenuar, dependiendo de la naturaleza del huésped, los síntomas inducidos por el virus nodriza (Roossinck, *et al*, 1992). Regularmente la atenuación se acompaña por la reducción en la concentración del genoma viral por lo que se ha sugerido que la atenuación se asocia con una competencia entre el virus y el satélite por las polimerasas (Wu, *et al*, 1991), en contraste, otras evidencias han mostrado que la reducción de síntomas no se relaciona siempre de la reducción en la concentración del nodriza por lo que se duda de la dependencia por las polimerasas virales (Wang and

Simon, 1999). Por otro lado, entre los satélites que incrementan los síntomas inducidos por el virus nodriza, los mejor caracterizados corresponden a los RNA satélites asociados con CMV, en la secuencia de éstos se han ubicado los determinantes genéticos asociados con la necrosis, clorosis y con la atenuación de los síntomas aún cuando se desconocen los mecanismos precisos en los que esos determinantes participan (Rossinck, *et al*, 1992; Rossinck, y Havelda, 2004).

### **1.6.3 Satélites de CMV**

En aislamientos de CMV de distintas partes del mundo frecuentemente se ha encontrado que el genoma del virus está asociado con una pequeña molécula de RNA capaz de aumentar o disminuir los síntomas del virus nodriza en huéspedes específicos, a esas secuencias se les ha denominado RNAs satélites de CMV (CMV satRNAs o CARNA-5). Las moléculas presentan una estructura molecular linear, longitud entre 330 y 405nt, carecen de ORF funcionales y, en la mayoría de los casos atenúan los síntomas inducidos por el virus nodriza, aún cuando se han reportado, aislado y caracterizado algunos aislamientos que generan necrosis en variedades de jitomate cultivadas en Europa (Prados-Alonso, *et al*, 1998; Rossinck y Havelda, 2004). Además de las variantes que afectan al jitomate, se han encontrado variantes que inducen daños severos en cultivos de melón (Sacristán, *et al*, 2004), necrosis o clorosis en tabaco (*Nicotiana sp.*) o en jitomate (*Lycopersicon*). El análisis de estas variantes ha permitido establecer que el determinante del fenotipo clorótico está ubicado entre los nucleótidos 120 y 160 nt (Sleat y Palukaitis, 1992) y el que induce la necrosis entre los residuos 290 y 310 (Hidaka y Hanada, 1994).

#### 1.6.4 Mecanismos de patogenicidad de CMV satRNA.

En los satRNA aislados de diversas partes del mundo capaces de inducir necrosis en jitomate se ha encontrado una secuencia conservada de 16nt (5'AAGGCUUAUGCUAUGC 3') ubicada hacia el extremo 3' del satélite. A la fecha se desconocen los mecanismos moleculares en los que participa esta región para desencadenar el fenotipo necrótico (Hidaka y Hanada, 1994), en este sentido, algunos estudios con plantas de jitomate inoculadas con CMV satRNA D4 sugirieron que en el fenotipo necrótico estaba involucrado el proceso de muerte celular programada (PCD), dado que en esas plantas se observaron fenómenos como fragmentación nuclear y degradación del DNA, los cuales han sido relacionados con la PCD. La necrosis se detectó inicialmente, debajo del meristemo apical en las células del floema en desarrollo, posteriormente fueron afectadas las células vasculares vecinas y entre 24 y 48 horas después se detectó necrosis sistémica y el colapso de toda la planta. La amplitud y los patrones de progresión espacial-temporal de la necrosis parecieron ser afectados por algunos factores ambientales así como por la etapa del desarrollo en el que las plantas fueron inoculadas. En este estudio se encontraron cadenas positivas y negativas del satélite solamente en los haces vasculares que presentaron PCD, además se determinó que, mientras el nivel de la cadena positiva se incrementó y permaneció elevado durante todo el proceso, el nivel de la cadena negativa aumentó drásticamente solo antes de que sucediera la PCD, lo cual sugirió que el aumento en la concentración de la cadena negativa es la responsable de disparar esa respuesta. (Xu y Roossinck, 2000; y Xu, *et al*, 2003).

Algunos CMV satRNA inducen sistemáticamente amarillamiento de las hojas de plantas de jitomate y tabaco, otros como CMV satRNA WL-2 inducen clorosis blanca en jitomate al parecer como consecuencia de la pérdida de clorofilas y carotenoides asociada a la disminución del tamaño de los cloroplastos (Jassi citado en Rossinck y Habedla, 2004).

Por otro lado, CMV satRNA B5 induce clorosis amarilla en jitomate y no produce efecto evidente en plantas de tabaco, el análisis de los determinantes genéticos ha relacionado a una secuencia de aproximadamente 60 nucleótidos localizada en la región media del genoma con esa respuesta; particularmente se ha establecido que al menos tres residuos son esenciales: la Adenina en la posición 127, las Citosina en la posición 149 y 153. El nucleótido en la posición 149 parece relacionarse además con la inducción de la clorosis huésped específico, de manera que un U en esa posición determina el fenotipo clorótico en plantas de tomate mientras que C determina el fenotipo clorótico en tabaco (Sleat y Palukaitis, 1992). Sin embargo a la fecha no se han elucidado los procesos moleculares ni la manera en que estos determinantes definen ese fenotipo. (Sleat y Palukaitis, 1992; Roossinck, y Habelda, 2004).

#### **1.6.5 Consideraciones evolutivas de los CMV satRNAs y los viroides.**

El origen de los satélites se ha intentado elucidar mediante estudios de comparación de secuencias entre el genoma del satélite, de los virus nodriza y de las plantas huésped. En análisis de ese tipo utilizando al genoma de *Arabidopsis thaliana* no evidenciaron homología sugiriendo que estos elementos pudieron originarse de otras fuentes. Roossinck y Habelda plantean la posibilidad de que los satRNAs pudieran haber sido generados mediante arreglos de material genético del huésped que posteriormente sufrió divergencia, para apoyar la propuesta se cita que en algunos huéspedes se enciende el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) como consecuencia de la infección por CMV generándose micro RNA cuya recombinación y divergencia produciría los satRNAs (Roossinck y Habelda, 2004). Una alternativa planteada para el origen de los satélites alude que mediante inicios reiterados y terminaciones prematuras de la transcripción así como replicaciones abortivas por las RdRp del huésped hubieran generado fragmentos que arreglados generarían a los satRNA, la identidad de los fragmentos se habría

enmascarado con alteraciones incorporadas durante replicaciones sucesivas (Roossinck y Habelda, 2004).

En los estudios que abordan la evolución de la virulencia de los satélites se ha encontrado que la variante CMV satRNA B5, que causa clorosis en jitomate cuando el virus nodriza es del subgrupo II y atenúa los síntomas cuando el virus es del subgrupo I, puede generar una variante inductora de clorosis en jitomate tras una serie de pases aún cuando el nodriza es del grupo I. Estos estudios demostraron que la capacidad de inducir clorosis está determinada por la secuencia del satélite y no por la naturaleza del nodriza. Por otro lado, se ha propuesto que las variantes necróticas pudieron originarse en huéspedes en los que no se causa ese fenotipo, de esa manera esas variantes pudieron diseminarse y eventualmente infectaron especies susceptibles con respuesta necrótica (Roossinck y Habelda, 2004).

A partir del descubrimiento de los viroides, de la información aportada por la secuencia de su genoma, estructura molecular así como del conocimiento de los mecanismos que permiten su replicación se han propuesto al menos dos hipótesis en las que se plantea un origen monofilético con los satRNAs (Diener, 2001). La propuesta se basa en que tanto las RNA polimerasas de eucariontes como las RNA y DNA polimerasas de *Escherichia coli* son capaces de transcribir *in vitro* el genoma de viroides generando copias complementarias de DNA y RNA (Góra-Sochacka, 2004), así los viroides pudieron originarse a partir de retrovirus o de transposones mediante la eliminación de secuencias internas, o bien de intrones que escaparon y divergieron posteriormente, también se ha propuesto que pudieron haber sido RNA de procariontes que adquirieron independencia evolutiva durante la infección a plantas. Alternativamente, la capacidad de autoprosesamiento de algunos viroides y de algunos satRNA han permitido sugerir que ambos elementos pudieran constituir relictos de los RNA que precedieron a la organización celular y que asumieron una existencia intracelular durante la evolución

temprana de los organismos, toda vez que algunos de estos elementos (viroides, satRNA) presentan autoprosesamiento debido a actividades enzimáticas como las que debieron presentar las enzimas de RNA antiguas. De esta manera las hipótesis evolutivas consideran un origen monofilético entre los viroides, RNA satélites y moléculas semejantes a los viroides. De esta manera, el esclarecimiento de los mecanismos de replicación y diseminación en las plantas utilizados por los viroides y satRNA, así como las semejanzas y diferencias podrían abundar en torno al origen de estos patógenos subvirales.

## **II. Justificación**

Los virus causan grandes pérdidas económicas en la agricultura al deteriorar la calidad y cantidad de los productos, de tal manera que la capacidad de algunos RNA satélites para modular los síntomas inducidos por el virus nodriza han sido considerados como controles biológicos, sin embargo dada la gran diversidad de los aislamientos virales que afectan a las distintas zonas agrícolas del mundo, es necesario establecer con precisión la naturaleza de los satélites que los acompañan, así como los riesgos a los que están expuestas las variedades cultivadas cuando los satélites están en combinación con aislamientos virales indígenas o con diferentes aislamientos virales.



### III. Hipótesis

Aislados de CMV replicarán y moverán a larga distancia a CMV satRNA de manera diferencial en diversos huéspedes experimentales. Además, CMV satRNA podría depender de factores del huésped en vez de factores codificados por el virus para su replicación y dispersión.

### IV. Objetivos

#### Objetivo general

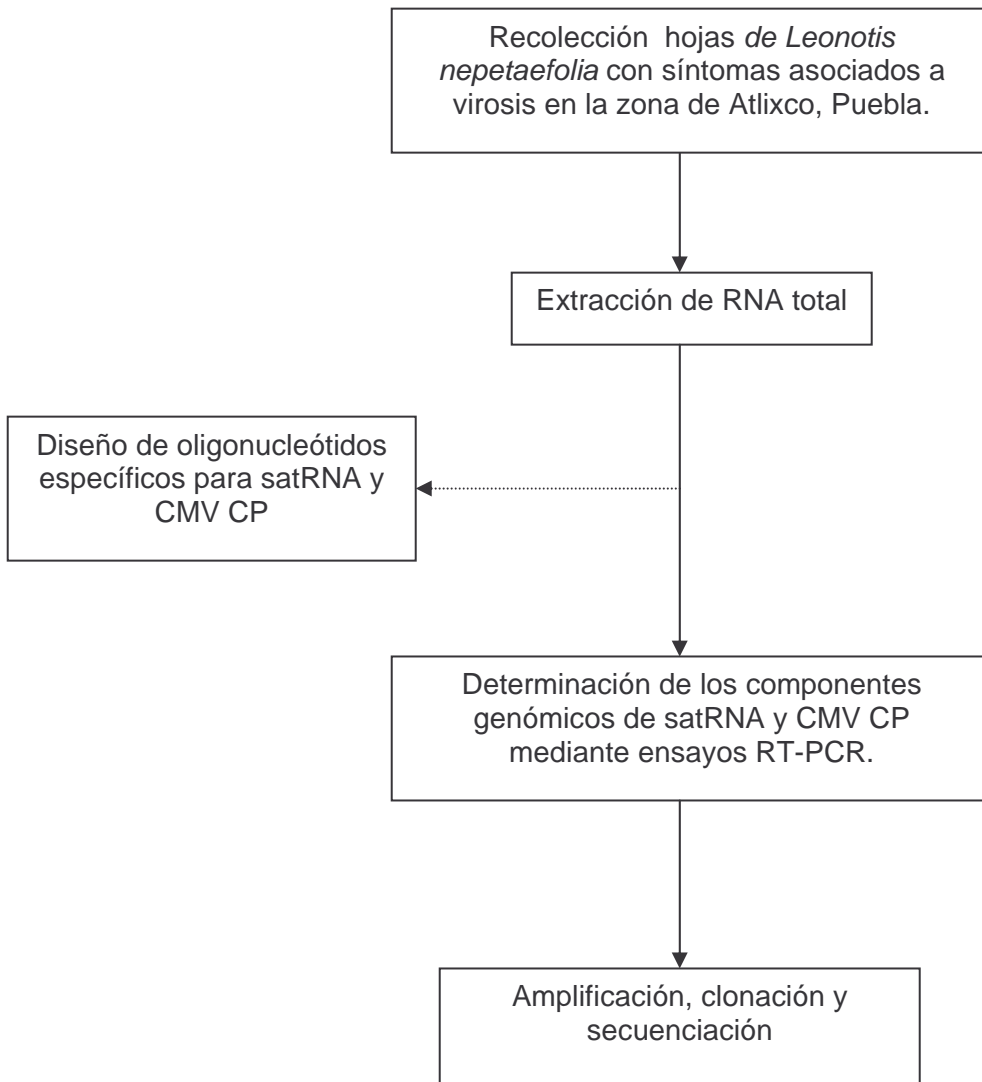
Analizar la transmisión, replicación, acumulación, movimiento a larga distancia y efectos fenotípicos de CMV satRNA en algunos huéspedes experimentales en combinación con aislamientos virales de CMV del grupo I y II.

#### Objetivos particulares

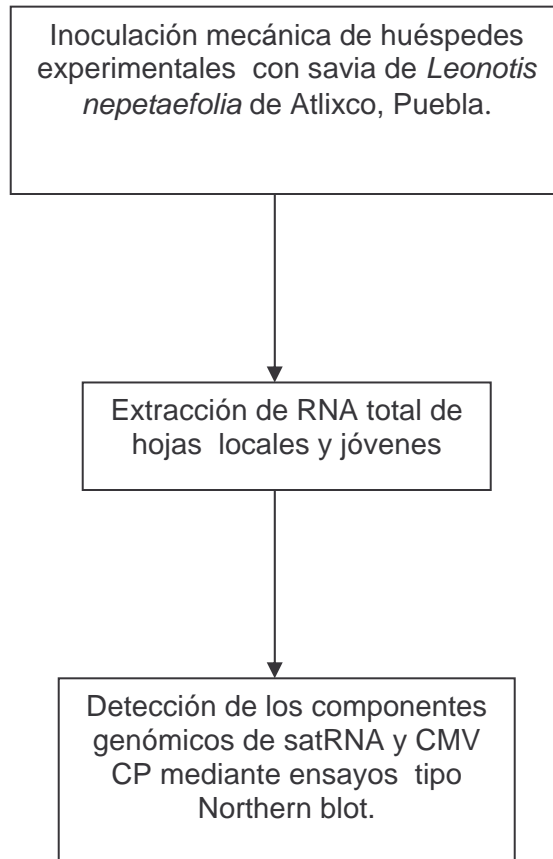
- Determinar la presencia de CMV satRNA y CMV en *Leonotis nepetaefolia* de Atlixco, Puebla a través de la detección de sus componentes genómicos.
- Determinar la capacidad de replicación, acumulación y movimiento a larga distancia de CMV satRNA Leo en huéspedes experimentales a través de inoculaciones mecánicas del satélite en combinación con aislamientos de CMV del grupo I o II.
- Determinar si CMV satRNA es capaz de replicarse y moverse a larga distancia en ausencia de CMV en algunos huéspedes experimentales.

**V. Estrategia experimental**

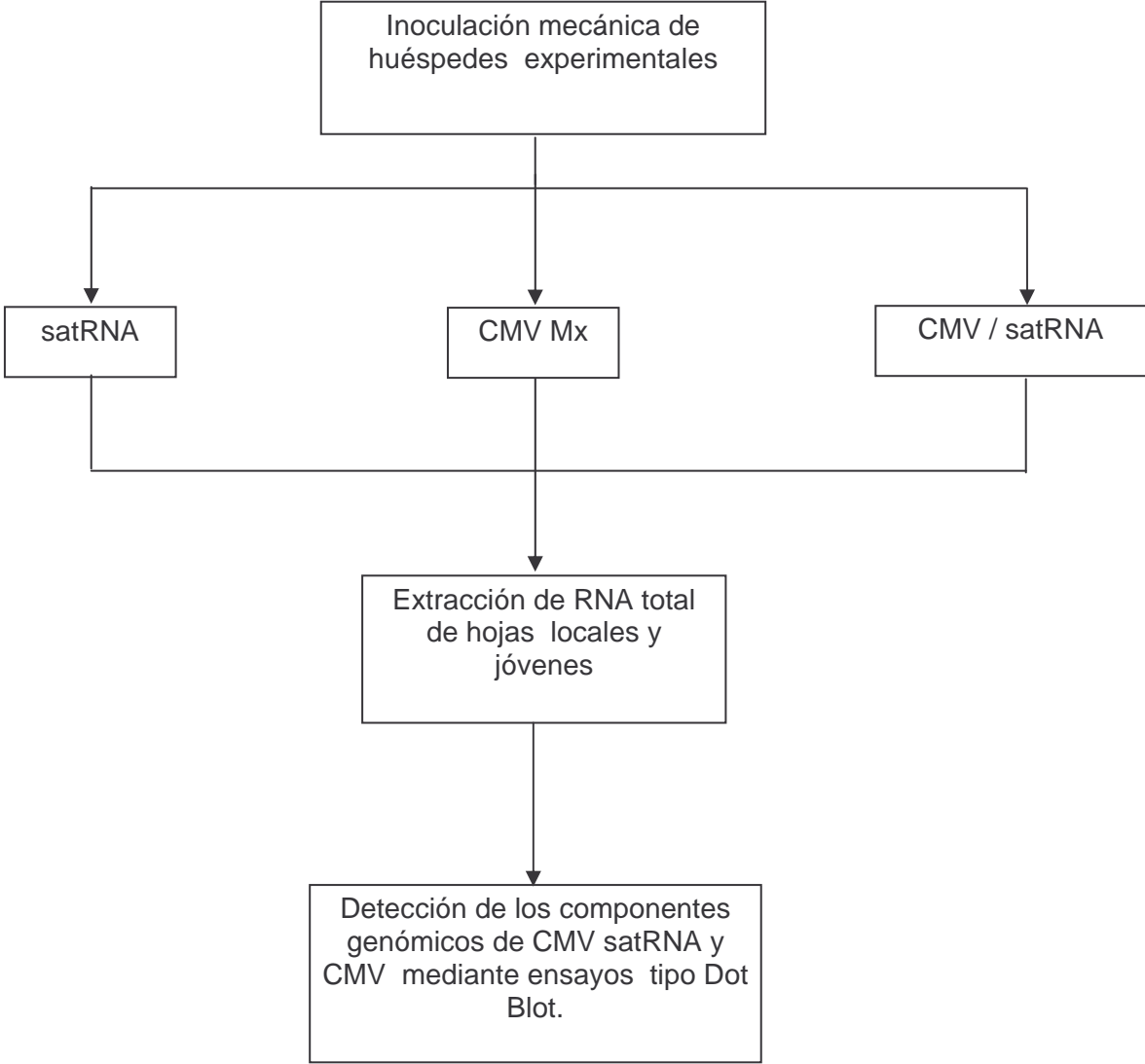
## PRIMERA FASE



## SEGUNDA FASE



TERCERA FASE



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Recolección de *Leonotis nepetaefolia* con síntomas de virosis en Atlixco, Puebla.

Cien muestras biológicas fueron colectadas en la región agrícola de Atlixco Puebla durante el mes de enero del 2003 en las poblaciones de *Leonotis nepetaefolia* asociadas con cultivos comerciales. Se seleccionaron plantas con mosaico, cálico y reducción foliar, se etiquetaron y fueron trasladadas al laboratorio para los ensayos de aislamiento y caracterización biológica, parte de las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la obtención del RNA total.

### 6.2 Caracterización molecular del CMV satRNA de *Leonotis nepetaefolia*.

#### 6.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Secuencias del CMV y CMV satRNA obtenidas del banco de información genética del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) fueron alineadas con el programa ClustalX (Thompson, *et al*, 1997) utilizando los parámetros preestablecidos para el alineamiento pareado y para el múltiple. En los alineamientos múltiples se identificaron las secuencias más conservadas para diseñar los iniciadores directo y reverso.

Para amplificar fragmentos del virus mosaico del pepino se diseñaron los iniciadores CMV CP directo 5' ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AGT GCY GGT3' y reverso 5' TCA RAC TGG AGC ACC CCA GAY GTG GGA ATA 3' los cuales amplificarían la totalidad del marco abierto de lectura de la proteína de la cápside generando un fragmento de 650pb. Para amplificar el RNA satélite asociado con CMV se diseñaron iniciadores parcialmente degenerados (CARNA 5 directo 5' GAG AMY YGC GYR GAG GWT RTA TAT YYR YGY 3', reverso 5' TCG AAA GAA ACA CTC TGT AGG TGG TAT 3') que flanquean la región que se extiende del nucleótido 15 al 230 en las variantes que

carecen de las inserciones intermedias produciendo un fragmento de aproximadamente 240 pb. Una vez confirmada la presencia del CMV satRNA se diseñaron iniciadores (CARNA 5 directo 5´ GGG TCC TGT AGT GGA ATG ATA GAC ATT CAC 3´, reverso 5´ CCC CGC AAT TCT CCG ACA AAC AAA AAA 3´) que amplificarían un fragmento incluyendo la secuencia asociada con la inducción de la necrosis.

### 6.3 Extracción de RNA total de tejido vegetal

Se utilizó el protocolo reportado por Logemann, *et al*, (1987) con pequeñas modificaciones. Un gramo de tejido vegetal fue molido en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se agregaron 2 volúmenes de buffer de extracción (Cloruro de Guanidinio 8M, MOPS, 50 mM), el homogeneizado fue vertido en tubos eppendorf agregándoles 700µl de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1), la mezcla fue agitada en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea la cual fue centrifugada a 13000 rpm a 4°C durante cuarenta y cinco minutos. El sobrenadante fue recuperado y vertido en un tubo eppendorf estéril agregándole 700µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó en las mismas condiciones pero esta vez sólo durante 15 minutos. Al sobrenadante recuperado de la segunda centrifugación se agregó 0.7 volúmenes de etanol absoluto y 0.2 volúmenes de ácido acético 1M, la suspensión fue mezclada y almacenada a -80°C durante toda la noche. La mezcla se descongeló en hielo y fue centrifugada a 13000 rpm y 4 °C durante 15 minutos, el sobrenadante fue desechado, a la pastilla se agregó 1 ml de acetato de sodio (3M, pH 5.2) se agitó vigorosamente en vórtex y centrifugada en las condiciones descritas durante 10 minutos. La pastilla fue lavada dos veces con etanol 70% durante dos veces y secada al aire libre. Finalmente se resuspendió en 20µl de Agua bidestilada, desionizada, tratada con DEPC y estéril, la mezcla fue almacenada a -70°C hasta su uso.

Para determinar la calidad y calcular la concentración aproximada del RNA, las muestras fueron sometidas a separación electroforética en geles desnaturizantes (formaldehído 2.2M) de agarosa (1.2%) utilizando buffer de corrimiento MOPS 0.02 M pH 7.0, Acetato de Sodio 8mM, EDTA 1mM, pH 8.0 (Maniatis, *et al*, 2001). 3µl de muestra fueron mezcladas suavemente con 2 volúmenes de buffer de desnaturización (Formaldehído, MOPS y Formamida 1:2:4), se incubaron a 65°C durante 15 minutos y se enfriaron durante dos minutos en hielo. Antes de cargar la mezcla en el gel se le agregó 2µl de buffer de carga (Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.25%, Xylen cyanol FF 0.25%). La electroforesis se realizó a 60 Volts y temperatura ambiente (Sambrook, 2001).

#### **6.4 Amplificación, clonación y secuenciación del satélite**

Para amplificar los fragmentos de CMV satRNA se utilizó la enzima SuperScript II RNasa H- (GibcoBRL) para sintetizar la primera cadena y Taq polimerasa (Biolabs) para la amplificación del cDNA atendiendo los protocolos indicados por los proveedores. Se utilizaron de 0.5 a 5µg de RNA total, se adicionó 1µl de los iniciadores directo y reverso (100 ng/µl) se mezclaron suavemente e incubaron durante 10 minutos a 65°C, al cabo, se transfirieron rápidamente a hielo y se mantuvieron durante 2 minutos. A la mezcla se agregó 4µl de Buffer de primera cadena (HCl 10 mM pH 8.3, KCl 75 mM, Cl<sub>2</sub>Mn 3mM) y 2 µl de DTT 0.1 M, se homogeneizó cuidadosamente y se incubó a 42°C durante 90 minutos.

En la amplificación del cDNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó 1µl del producto de la reacción de reverso transcripción, se le agregó 2.5µl de buffer de PCR (Tris HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), 1µl del iniciador directo y del reverso (100 ng/µl), 1µl de mezcla 10 mM de los dNTP, 0.2 unidades de Taq DNA polimerasa llevando a un volumen total de 25 µl por reacción. La reacción se hizo en un termociclador marca

BIOMETRA modelo T-Gradient Termoblock con un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de amplificación utilizando temperaturas de alineamiento de 52 y 55°C para el fragmento de 240 y 350 pb respectivamente, así como extensión de 60 segundos a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación fueron extraídos del gel utilizando el kit de purificación de DNA (QIAquick PCR purification 250) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al fragmento del gel que contenía el producto de interés se adicionaron aproximadamente 5 volúmenes de buffer de solubilización (PB), la mezcla se homogeneizó, se depositó en una columna de sílica gel, se colocó en un tubo colector de 1.5 ml y se centrifugó a 6000 rpm durante 60 segundos. El DNA se lavó depositando 250µl de la solución PE en la columna y centrifugándola durante 60 segundos a la máxima velocidad. Para eliminar el exceso de PE, las columnas fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos; el DNA se eluyó depositando 50µl de agua bidestilada estéril y centrifugándola durante 2 minutos a 13000 rpm, el fluido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Una vez purificados, los productos de PCR fueron ligados en vectores de clonación comerciales (pDRIVE Qiagen, USA) atendiendo las indicaciones del proveedor. Se utilizaron de 1 a 3µl del producto de PCR purificado, 0.5µl de vector (50 ng/µl), 2.5µl buffer de ligación 2X, la mezcla se homogenizó suavemente y aforó a 5µl. Las mezclas se incubaron 16°C durante toda la noche, el producto de la reacción fue utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* TOP10.



### 6.5 Preparación y transformación de células competentes

Colonias aisladas de *E. coli* TOP 10 fueron sembradas en 10ml de medio Luria y cultivadas en agitación constante a 37°C durante toda la noche, 5ml de ese cultivo fueron agregados a 30ml de LB e incubados en agitación constante a 37°C hasta que la población alcanzó la fase inicial del crecimiento exponencial. Posteriormente, con 5 ml de ese cultivo se inocularon 200ml de LB, se incubó con agitación constante a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.3 a 600 nm, ese cultivo fue transferido a tubos de 50ml estériles, centrifugado a 5000 rpm y 4°C durante 10 minutos, la pastilla fue resuspendida en 16ml de buffer 1 (RbCl 100mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y Glicerol 15% w/v), y se incubó en hielo durante 45 minutos. Enseguida las células fueron compactadas por centrifugación a 5000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, el botón celular fue resuspendido en 5ml de Buffer 2 (RbCl 10mM, MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, Glicerol 15% w/v, pH 6.8) e incubado en hielo por 10 minutos. Finalmente, se hicieron alícuotas de 200µl en tubos eppendorf y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para realizar la transformación bacteriana con los plásmidos recombinantes, las células competentes fueron descongeladas en hielo, se les adicionó de 10 a 20 ng de DNA del plásmido, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos e inmediatamente después se les sometió a un choque térmico al incubarlas a 42°C durante 90 segundos, posteriormente se transfirieron rápidamente a hielo donde se les mantuvo durante 2 minutos al cabo de los cuales se adicionó 800µl de medio Luria y se incubaron a 37°C durante 90 minutos. Las células se compactaron mediante 1 minuto de centrifugación a 5000 rpm, se desechó 2/3 del sobrenadante, el botón celular se resuspendió en el medio remanente y fue esparcido uniformemente en cajas Petri con medio Luria sólido, Ampicilina o Kanamicina (50 µg/ml), IPTG (100 µg/ml) y Xgal (1.6 mg/ml). Las cajas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche, posteriormente se seleccionaron las colonias candidatas (colonias blancas) a poseer el plásmido recombinante (Maniatis, *et al*, 2001).

### 6.6 Extracción del DNA plásmidico de *E.coli* transformadas

Las colonias candidatas positivas fueron sembradas en 3ml de medio Luria con ampicilina (50 µg/ml) y cultivadas en agitación constante a 37°C durante toda la noche. Las células fueron compactadas por centrifugación a 5000rpm durante 60 segundos, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 100µl de solución I (Glucosa 50mM, Tris HCl 25mM, EDTA 10mM pH 8.0), se añadió 200µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 0.1%) y se incubó en hielo durante 10 minutos. Una vez que las células se lisaron, se añadió 0.7ml de Acetato de Sodio 3M pH 5.2, la mezcla fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo estéril, se adicionaron 450µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente antes de centrifugarlo durante 10 minutos a 13000rpm. El sobrenadante fue recuperado y transferido a otro tubo estéril, se añadió 350µl de isopropanol e incubó a -20°C durante 10 minutos. Después la suspensión fue centrifugada a 13000rpm durante 10 minutos y la pastilla fue lavada tres veces con etanol al 70%, eliminando el exceso de etanol y resuspendiendo el DNA 50µl de agua bidestilada estéril (Maniatis, *et al*, 2001).

Los plásmidos fueron purificados utilizando el kit de purificación de DNA (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito anteriormente y sometidos a reacción de secuenciación en un secuenciador de capilar (Genetic Analyzer Model 3100 en UBIPRO FESI, UNAM) utilizando los iniciadores universales directo y reverso del vector.

### 6.7 Análisis filogenético de CMV satRNA Leo

Se obtuvieron alrededor de 100 secuencias de satélites de CMV depositadas en el Gen Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), las cuales fueron utilizadas junto con la secuencia de CMV satRNA Leo en el análisis filogenético. Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa ClustalX 1.83 (<http://www.biolinux.org/clustalx.html>) con la penalización preestablecidas para la apertura y extensión de los gaps y la matriz de sustitución nucleotídica IUB. Los alineamientos fueron editados utilizando el programa SEAVIEW (Galtier, *et al*, 1996), el alineamiento óptimo fue seleccionado considerando la suma de pares calculada con el programa Genedoc (Nicholas y Nicholas, 1997). El análisis filogenético se realizó en el programa PAUP 4.0beta10 (Swofford, 2000) utilizando los modelos de dos parámetros de Kimura 80 y el de máxima parsimonia con una prueba de robustez de 1000 bootstrap, el árbol consenso fue construido con la regla de la mayoría, las ramas con un apoyo menor al 50% fueron colapsadas.

### 6.8 Inoculación mecánica de plantas sanas con CMV Leo, CMV Bra y CMV satRNA

Plantas infectadas CMV Leo, CMV Bra y CMV Leo/CMVsatRNA fueron utilizadas para inocular mecánicamente a las plantas de los grupos experimentales utilizando savia infectiva. El tejido de las plantas infectadas fue macerado con solución amortiguadora de fosfatos DIECA (0.02 M, pH 7.2) y esparcido con un hisopo de algodón sobre las hojas cotiledonales de las especies experimentales *Lycopersicon esculentum* Mill. var. floradade y rio grande, *Datura stramonium* L., *Cucurbita pepo* L., *Cucumis sativus* L., *Capsicum annum* L. var. guajillo, *Leonotis nepetaefolia* (L.) Brown., *Physalis ixocarpa* Brot., *Pisum sativum* L. y *Chenopodium amaranticolor* (L.), previamente espolvoreadas con tierra de diatomita (Científica Vela Quin, México).

Plantas en otros conjuntos experimentales fueron inoculadas con aproximadamente 10mg del RNA total de plantas infectadas con CMV Leo o CMV Bra, con RNAdc

correspondiente al satélite de CMV y/o con el producto de una reacción de transcripción *in vitro* de CMV satRNA resuspendidos 50µl de NaCl 100mM. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en invernadero durante 60 días aproximadamente; a los siete días se extrajo el RNA total de las hojas inoculadas y posteriormente a los quince dpi se extrajo el RNA total de las hojas jóvenes (no inoculadas) para así determinar la presencia de los componentes genómicos de los patógenos.

### **6.9 Análisis de la replicación, acumulación y movimiento de CMV satRNA Leo en huéspedes experimentales inoculados con CMV del grupo I o II**

Para analizar el movimiento a larga distancia, la acumulación y replicación de CMV satRNA se utilizaron dos aislamientos de CMV, el aislado de *L. nepetaefolia* (L.) Brown., y un aislamiento de CMV obtenido y caracterizado por el Dr. Gilbertson del Plant Pathology de California University en Davis, Ca que se obtuvo a partir de plantas colectadas en Brasil (Cita que dijo Roberto). Plantas de grupos experimentales integrados por 5 plantas de 10 especies fueron inoculados mecánicamente con savia infectiva, con RNA total, RNAdc o con transcritos *in vitro* para lograr las combinaciones: CMV Leo, CMV Bra, CMV Leo/CMV satRNA y CMV Bra/CMV satRNA. Las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero, 7 y 15 días postinoculación se extrajo el RNA total de las hojas inoculadas y de las jóvenes respectivamente. La presencia de los componentes genómicos del satélite y de los virus fue determinada mediante ensayos de hibridación tipo Northern y Dot blot (Sambrook, *et al*, 2001).

### **6.9.1 Síntesis *in vitro* de CMV satRNA Leo.**

Las clonas bacterianas conteniendo a pDrive:CMV satRNA Leo fueron mantenidas en congelación (-70°C) y cultivadas en medio Luria para posteriormente obtener los transcritos *in vitro* utilizados en las inoculaciones mecánicas. Se procedió a linealizar 5µg de pDrive:CMV satRNA Leo, evitando el uso de RNasa, utilizando Hind III en la reacción de restricción. El producto de la reacción de restricción se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, 0.2 volúmenes de Acetato de sodio 3M, pH 5.2, 4µl acrilamida lineal y se incubó por lo menos 1 hora a -20°C, se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos, la pastilla se lavó por centrifugación (13000 rpm) dos veces adicionando 400µl de etanol absoluto, al cabo se desechó el sobrenadante, finalmente la pastilla se resuspendió en 25µl de agua bidestilada, desionizada y estéril. Para la transcripción se usó 1µg de templado linealizado, 2µl de buffer de transcripción (10X), 1µl 10mM de cada ribonucleótido, 0.5 µl de RNasin y 15 Unidades de T7 RNA polimerasa, la mezcla se incubó 37°C durante 1 hora, luego se centrifugó a 13000rpm durante 60 segundos, finalmente, para precipitar el producto de la transcripción adicionamos 0.7 volúmenes de etanol absoluto, 0.2 de Acetato de sodio 3M pH 5.2 y 5µl de acrilamida lineal, la mezcla fue incubada a -20°C durante 1 hora, centrifugada 13000rpm durante 15 minutos, y lavada dos veces por centrifugación con 400µl de etanol al 70%, finalmente la pastilla fue resuspendida en 25µl de agua bidestilada, desionizada y estéril almacenando a -20°C hasta su uso.

### **6.9.2 Detección de los componentes genómicos de los patógenos mediante hibridación tipo Northern y Dot Blot**

Las sondas radiactivas fueron sintetizadas utilizando iniciadores al azar mediante el kit (Rediprime II, Amersham Biosciences) para lo cual se diluyeron de 2.5 - 25 ng del fragmento de DNA (CMV CP o CMV satRNA) en 45µl de amortiguador Tris-EDTA (1mM), se incubó a 95°C durante 5 minutos y se colocó rápidamente en hielo, una vez enfriado se

transfirió al tubo de reacción al que se le añadió  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP a una concentración en la mezcla de reacción de 10mM, se homogeneizó y se incubó a 37°C, al cabo de 10 minutos la reacción fue detenida con 5 $\mu\text{l}$  de EDTA 0.2 M. La sonda radiactiva se incubó a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo y para posteriormente agregarlas al tubo con las membranas (Maniatis, *et al*, 2001).

El RNA total fue separado en geles preparativos para determinar su integridad y concentración aproximada. Una vez normalizada la concentración y separado el RNA por electroforesis, fue transferido por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa utilizando SSC (NaCl 1.5M, Acetato de sodio 0.15M) como solución de transferencia y fijado a la membrana mediante un minuto de radiación a 254 nm. Las membranas fueron bloqueadas incubándolas con solución de prehibridación (Albúmina de suero de bovino 1%, EDTA 1 mM, Buffer de fosfatos 0.5 M, SDS 7% w/v) a 65°C con agitación suave durante 24 horas, al cabo, se añadió la sonda desnaturalizada y marcada con  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP y se continuó la incubación durante 12hs. La solución con la sonda radiactiva no hibridada fue retirada y la membrana se lavó cuatro veces, dos con SSC 2X y dos con SSC 0.1X a 65 °C durante 20 minutos, se cubrió con papel plástico transparente y fue colocada sobre película fotográfica en cartucho de exposición para rayos X y mantenida a -70°C hasta su revelado (Maniatis, *et al*, 2001).

Para la detección de los patógenos en ensayos de hibridación tipo Dot blot, se utilizaron aproximadamente 100ng de RNA total en un volumen máximo de 4 $\mu\text{l}$  el cual se aforó a 6  $\mu\text{l}$  con buffer de desnaturalización de RNA, la mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. La suspensión se colocó por goteo en una membrana de nitrocelulosa evitando que la suspensión se dispersara y hacer contacto con la membrana, la membrana se secó a temperatura ambiente y se expuso a radiación

a 254 nm por 4 minutos. Las membranas fueron bloqueadas, hibridadas, lavadas, expuestas y reveladas tal como se indica en el párrafo anterior.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Descripción botánica de *Leonotis nepetaefolia* (L.) Brown.

Planta herbácea, anual de tallos simples o ramificados desde la base, erectos, hasta 2m de alto, con pubescencia retrorsa; hojas sobre pecíolos de 2 a 10 cm de largo, limbo ovado a ovado-deltoideo, en ocasiones lanceolado, de 2 a 12cm de largo, por 1 a 6cm de ancho, ápice obtuso o agudo, borde crenado a lobulado, base atenuada a subcordada, pubescente; inflorescencia en verticilios globosos, de 4 a 6cm de diámetro, interruptor a lo largo del eje principal y en los secundarios, pedicelos de 1 a 2 mm de largo, brácteas ovadas o lanceoladas, pubescentes, bractéolas de 8 a 12mm de largo, pubescentes, atenuadas en una punta rígida; cáliz de 1 a 1.5cm (o 2.5cm en fruto) de largo, glabro, con 8 a 10 dientes triangulares, el diente posterior sumamente largo y ancho, los demás pequeños; corola de 1.5 a 4cm de largo, de color rojizo-naranja, muy vistosos, de aspecto aterciopelado, labio superior densamente pubescente, el inferior glabro o con escasos pelos; filamentos de 1.5 a 1.7 cm de largo; estilo de 3.8 a 4 cm de largo, mericarpos de más o menos 3mm de largo. Es una planta Sudafricana probablemente introducida como ornamental y naturalizada en muchas partes de América (Rzedowski y de Rzedowski, 1985).

En Brasil *L. nepetaefolia* es considerada una de las malezas más importantes, se ha analizado los mecanismos que le permiten resistir a ciertos herbicidas (Procopio *et al*, 2003), además se ha establecido que en condiciones naturales esta planta funciona como huésped alternativo para el virus del jaspeado del tabaco (TEV). En las poblaciones de esta maleza distribuidas en la región Atlixco, Puebla se ha determinado que estas poblaciones funcionan como huéspedes alternos para al menos tres virus de RNA y para un RNA satélite (Piedra-Ibarra, *et al.*, 2005).



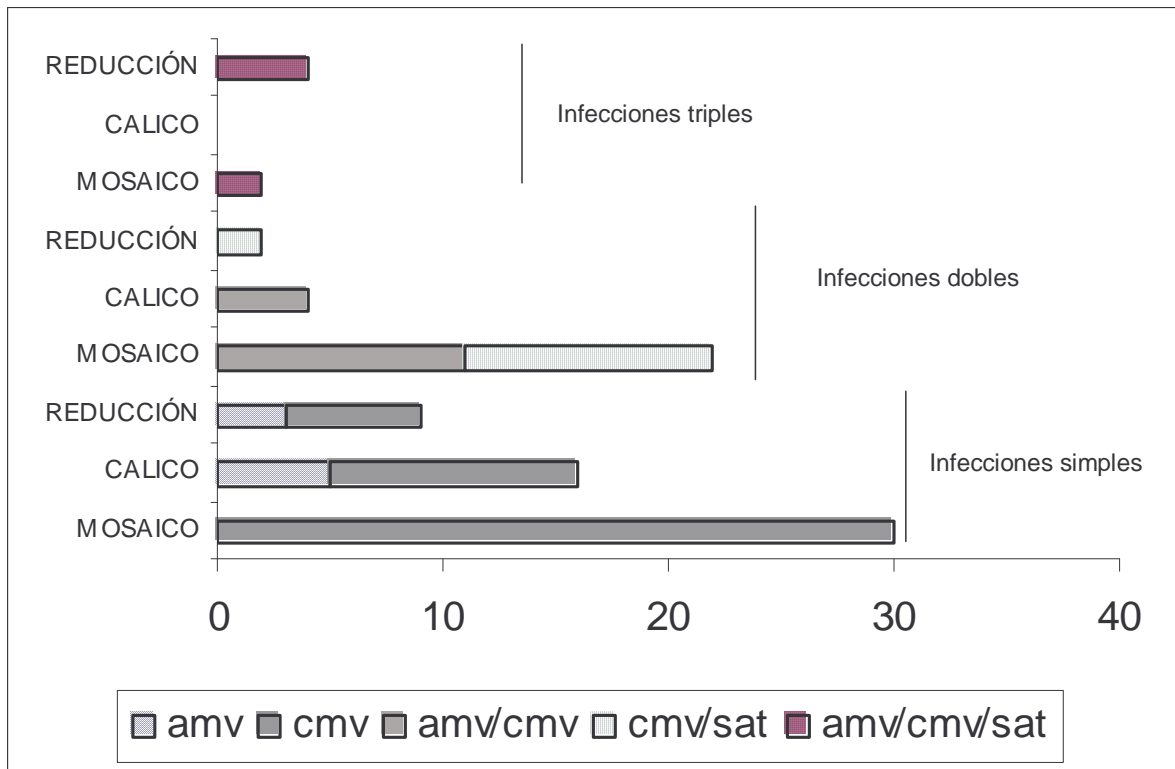
## 7.2 Descripción del sitio de colecta.

El municipio de Atlixco Puebla se localiza entre los 18° 55' latitud norte, 97° 56' de longitud oeste con altitud de 1840msnm. El clima corresponde a un templado lluvioso con temperatura media del mes mas frío entre -3 y 18°C del más caliente, el cual se presenta antes del solsticio de verano, con temperatura media mayor a 10°C Cb(w1)(w)igw, la oscilación anual de las temperaturas medias mensuales es menor de 5°C. La localidad presenta régimen de lluvias en verano, porcentaje menor al 5% de lluvias en invierno y canícula. El suelo predominante es fluvisol eútrico, el secundario es regosol eútrico ambos con textura gruesa. Es una región agrícola de riego dedicada a cultivos anuales y semipermanentes, principalmente: maíz, cebolla, jitomate, calabaza, gladiolo, zempoalxóchitl, terciopelo y alfalfa (INEGI Cartas de uso de suelo y vegetación y Carta edafológica) (Piedra-Ibarra, 2000).

## 7.3 Selección de plantas de *Leonotis nepetaefolia* infectadas con CMV y CMV satRNA para fuente de inóculo

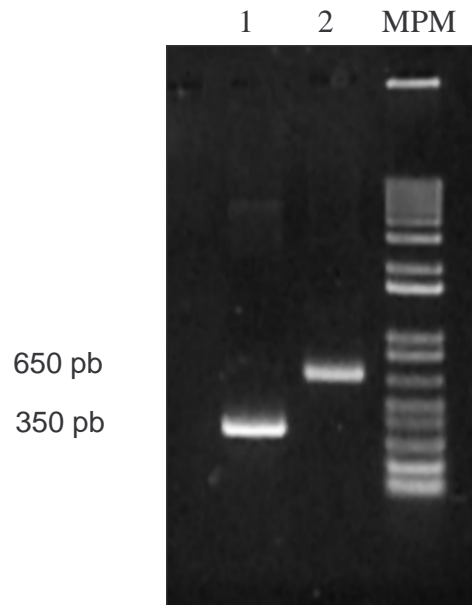
Dado que las poblaciones de *L. nepetaefolia* en la región agrícola de Atlixco, Puebla han sido reportadas como huésped natural para mezcla de virus en las que se ha detectado al Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV), del Mosaico de Tabaco (TMV), del Mosaico del Pepino (CMV) y para el CMV satRNA (Piedra-Ibarra *et al.*, 2005) y con la finalidad de obtener el material biológico con CMV y su satélite, que se utilizaría en los ensayos posteriores, se colectaron muestras de cien plantas de *L. nepetaefolia* con mosaico, cálico y reducción foliar y se determinó por hibridación en punto (Dot Blot) los patógenos presentes. La figura 1 muestra que en esas muestras sólo se detectó al AMV, CMV y CMV satRNA siendo CMV el más frecuente (84/100), en 49 plantas CMV era el único virus, de ellas, 32 presentaban mosaico, 13 cálico y 4 reducción foliar; en las 35 plantas

restantes CMV era parte de complejos virales. El virus del Mosaico de la alfalfa fue determinado en 29 muestras, en 8 era el único virus, 5 de las cuales con cálico y 3 con reducción foliar. CMV y AMV estaban en 15 muestras: 11 con mosaico y 4 con cálico. El Satélite de CMV fue determinado en 19 muestras, en 13 plantas asociado a CMV, de las cuales 11 presentaban mosaico y 2 reducción foliar, en los seis casos restantes el satélite estaba asociado tanto a CMV como AMV, 2 plantas presentaban mosaico y 4 reducción foliar (figura 1).



**Figura 1.-** Relación de infecciones simples, dobles y triples de AMV, CMV y CMV satRNA en muestras de *Leonotis nepetaefolia* con los síntomas de mosaico, cálico y reducción foliar, determinado mediante hibridación en punto.

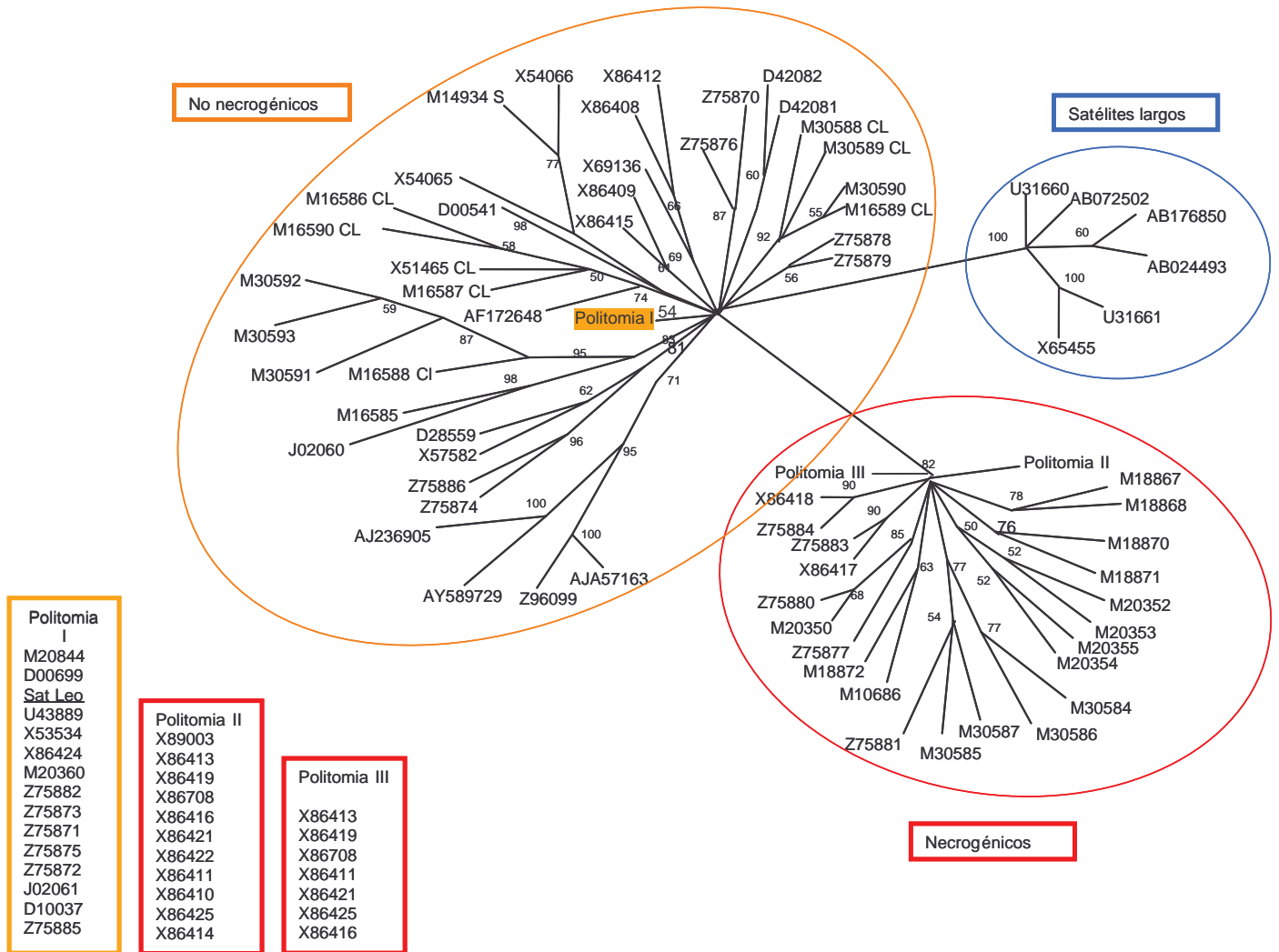
Posteriormente se seleccionaron las plantas que solo contenían CMV y su satélite para inocular las plantas experimentales disminuyendo la posibilidad de involucrar a otros virus asociados a *Leonotis nepetaefolia*. Antes de inocular plantas sanas se probó la ausencia de otros virus mediante reacciones de reverso transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando los iniciadores para amplificar fragmentos pertenecientes a la CP de los virus reportados (TMV, AMV, CMV y CMV satRNA) en esta maleza (figura 2).



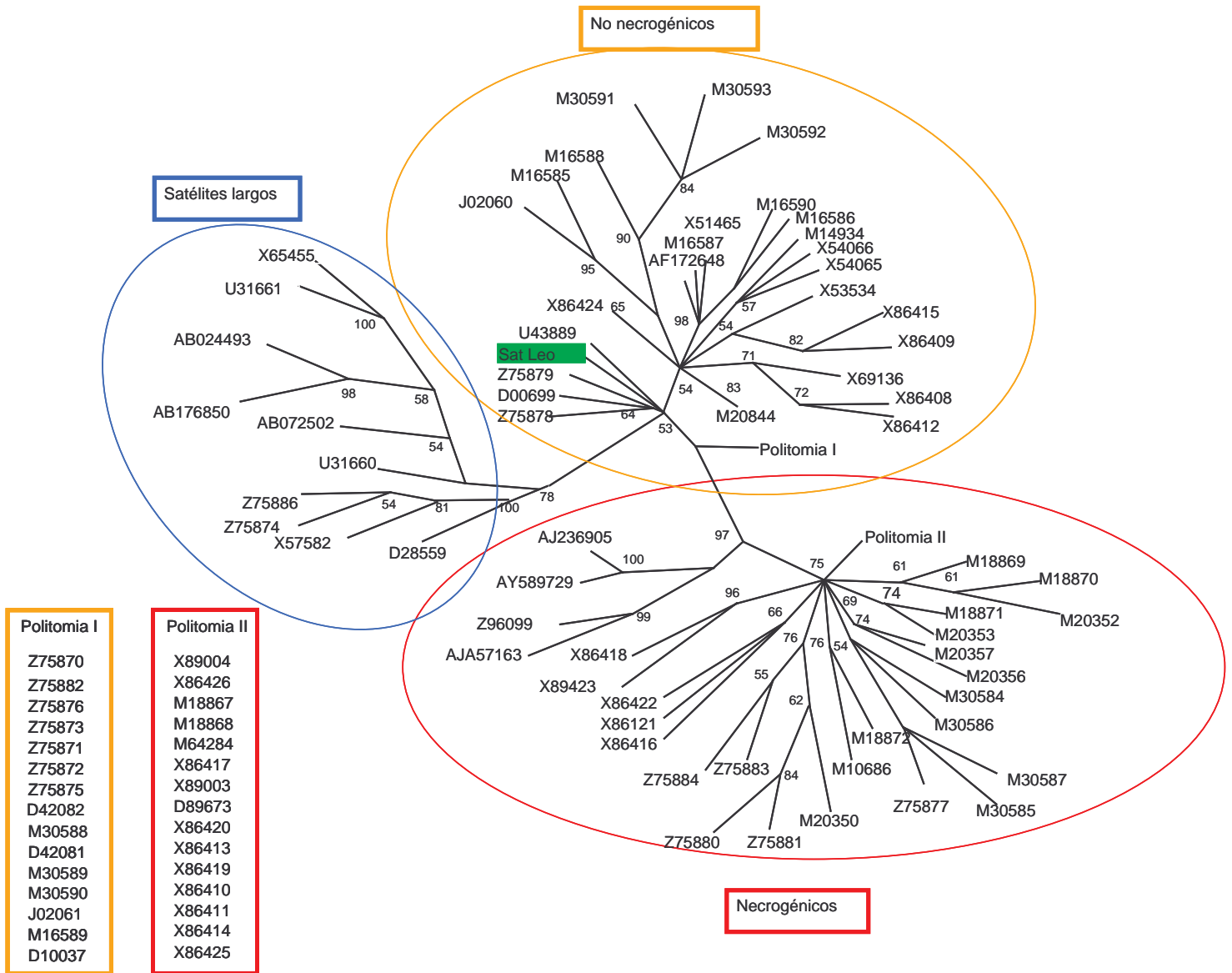
**Figura 2.-** Amplificación de los virus en *Leonotis nepetaefolia* presuntamente infectada con CMV y CMV satRNA. Gel de Agarosa 1%; carril 1 CMV satRNA, carril 2 CMV CP y carril 3 Marcador de peso molecular 1 Kb plus.

#### **7.4 Caracterización molecular del RNA satélite asociado a CMV en *L. nepetaefolia***

El fragmento de 350 pb del CMV satRNA fue ligado en vector comercial de clonación (pDrive) y clonado en bacterias químicamente competentes (*E. coli* TOP 10), las candidatas positivas fueron sometidas al menos a dos reacciones de secuenciación utilizando los iniciadores universales directo y reverso del vector. Los sitios inciertos fueron verificados mediante el análisis de los electroferogramas con el programa Chromas 2.1. La secuencia obtenida fue comparada en el banco de genes mediante una búsqueda heurística utilizando el programa BLASTn ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) el cual reportó valores de expectativa menores a 0.01 con alrededor de 100 secuencias de satélites de RNA asociados con CMV. La secuencia nucleotídica de CMV satRNA Leo y las de mayor identidad fueron sometidas a un análisis filogenético utilizando modelos de distancia y de máxima parsimonia, la topología de ambos árboles consenso es básicamente la misma (Figuras 3 y 4), sin embargo la máxima parsimonia permite establecer las relaciones entre algunas secuencias que la distancia genética agrupa en politomias (politomía I, II y III en las figuras respectivas). En ambos árboles las secuencias se separan, apoyados por valores de bootstrap elevados, en dos grupos grandes. Uno de ellos agrupa a 45 secuencias entre las cuales se encuentran las secuencias que han sido reportadas como inductoras de necrosis, el otro grupo, es más numeroso aunque con menor diversidad nucleotídica (Índice de Nei de 0.0023), agrupa a secuencias que han sido caracterizadas como inductoras de clorosis en plantas de tabaco y tomate junto con otras que atenúan los síntomas inducidos por el virus nodriza. En este grupo de satélites no necrogénicos se separa un clado con las secuencias de satélites largos que han sido reportadas principalmente en Japón. La secuencia de CMV satRNA Leo forma parte del grupo no necrogénico en la politomía I que agrupa principalmente a satélites que atenúan los síntomas producidos por el virus nodriza en una gran cantidad de huéspedes.



**Figura 3.-** Árbol filogenético sin raíz elaborado con la secuencia nucleotídica de CMV satRNA Leo y de satélites reportados en otras partes del mundo mediante un modelo de distancia genética (Kimura 80). Los números de acceso al GenBank se indican en los nodos terminales; en los recuadros los miembros de las politomias y cerca de los nodos internos los valores porcentuales en un análisis de 1000 bootstrap.



**Figura 4.-** Árbol filogenético sin raíz construido con la secuencia nucleotídica de CMV satRNA Leo y secuencias de satélites depositadas en el GenBank mediante un modelo de máxima parsimonia. Los números de acceso se indican en los nodos terminales, en los recuadros los miembros de las politomias y cerca de los nodos internos los valores porcentuales en un análisis de 1000 bootstrap.

A fin de establecer con precisión la naturaleza del satélite satRNA Leo, se alineó su secuencia nucleotídica con las de WL2 (no necrogénico, inductor de clorosis) y CMVKN (inductor de necrosis, de 405 bases) (Sleat y Palukaitis, 1992; Hidaka, 1994). En la figura 4 se presenta el alineamiento múltiple, CMV satRNA Leo presenta al menos 58 sustituciones nucleotídicas y 12 eliminaciones respecto a las dos secuencias en comparación, las variaciones mayoritariamente se agrupan hacia la mitad 5' de la secuencia del aislamiento mexicano. Tanto satRNA Leo como WL2 carecen de dos regiones de 28 y 34 nt (IS I y II) respectivamente presentes en el aislamiento CMVKN y en los aislamientos largos reportados principalmente en Japón. WL2 es un aislamiento inductor de la clorosis, la secuencia de aproximadamente 60 nt localizada en la región media de los satélites ha sido involucrada en la inducción de este fenotipo; en esta región CMV satRNA Leo presenta al menos 6 sustituciones y una eliminación, en la posición 158 el aislamiento mexicano presenta una C en lugar del U que ha sido asociado con la inducción de la clorosis en plantas de tomate específicamente (Sleat y Palukaitis, 1992) por su parte CMVKN en la región media presenta al menos 14 sustituciones y 3 inserciones de las cuales la tercera (IS II) consiste de aproximadamente 34 nt e interrumpe la región inductora de la clorosis.

La región asociada con la inducción de la necrosis (Hidaka, 1994) consta de 16nt en CMVKN, la secuencia correspondiente en satRNA Leo presenta 6 sustituciones y tres inserciones. El aislamiento inductor de clorosis (WL2) se diferencia del aislamiento mexicano por la transversión U por A que coincide con la región de tres bases eliminada en el aislamiento largo necrogénico.

```

          10          20          30          40          50
Leo      GTTTTTTTGT  TGTCGGAGAA  TTGCGGGGAG  GGGTTG.ATC  TACGTGAGGA
WL2      ..G-----  ---TA-----  ----TA----  ----AT----  -----
CMVKN    ..G-----  --ATA-----  ----C-----  --ATAT----  -G-----

          60          70          80          90          100
TCTGTCACTC  GCGGGTGTGG  GTTACCTCCC  TG.....
---A-----  -A-----  -A-----  -A-----  -A-----
---A-----A  -----  GT-----  --GGTAGCTG  CATGGTGGTG
                                     IS I

          110         120         130         140         150
.....C TACGG..CGG  GTTGAGCTGA  CG.CACGTCG  GACTGGGGAC
.....- --A--..---  -----T---  --G--C---  -----
ACAGCCCAC- -GTA-TC---  -----  .---  --.---TC---  -----

          160         170         180         190         200
.....CGCTGGC...  TTGCG.AGCT  ATGTCCGCTA  CTC.....
-----AC...  -----  -----G  ---.....
-T----GAA --AA-T---  -A-----G  -C-?CGATGG  TGGGATACCT
                                     S II

          210         220         230         240         250
.....C ACCACTACGC  ACTCA.TTTG  AGCCCCCGCT
.....T- -G-----  -----A---  -----
CCTAACGGAG  GCTATTT- T- -G-T--G---  -T-TCATTTG  -----

          260         270         280         290         300
CAGTTTGCTA  ACAAACCCG  GCCCATGGTA  TGCCGTTACC  GTGGA.AATT
-----G-----  ---G-----  -----  -C---.T-
-----A--G-----  --A-----T  C-----  AT--C--A-

          310         320         330         340         350
TCGAAAGAAA  CACTCTGTAA  GGTGGTATCA  GTGACGACGC  ACGCAGGGAG
-----TA-----  -----  -----  -----  -----

          360         370         380         390         400
AGGCTAA AAC CTATATGGTC  ATGCTGATCT  CCGTGAATGT  CTAT.CATTC
-----A-----  -----  -----  -----  -----
-----GG- T---...GCT  -----  -----  -----  -----

          410
CACTACAGGA CCC
-T-----
-T-----

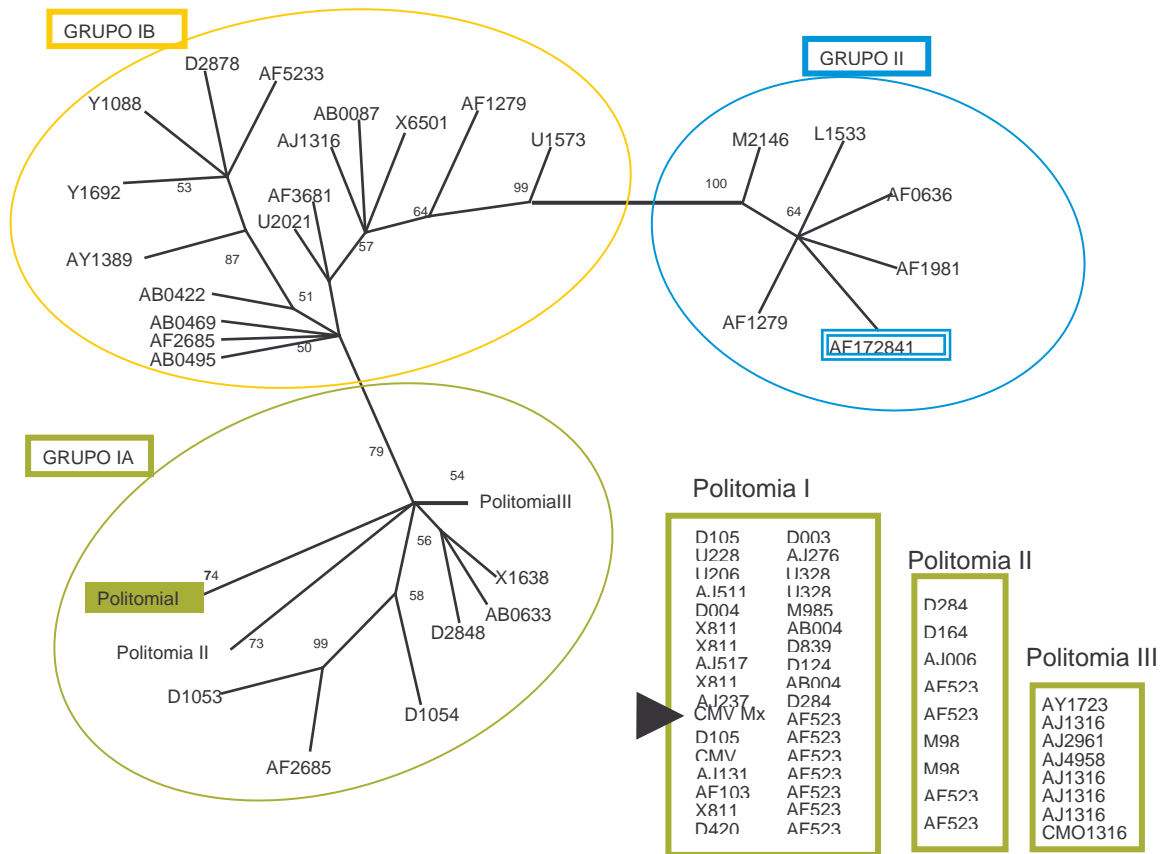
```



**Figura 5** Alineamiento múltiple de la secuencia de CMV satRNA de *L. nepetaefolia* y WL2 (clorótico) y CMVKN (necrogénico). Los fragmentos subrayados corresponden a las inserciones I (83 al 109nt) y II (183 al 245nt), los recuadros a las regiones asociadas a la inducción de la clorosis (151 a 245nt) y de la necrosis (355 a 374nt), los guiones representan bases idénticas a CMV satRNA Leo y los puntos, bases eliminadas.

### **7.5 Análisis del comportamiento de CMV satRNA Leo en huéspedes experimentales inoculados con dos aislamientos de CMV**

Una vez caracterizado el satélite se procedió a establecer los efectos a nivel fenotípico generados por inoculaciones alternativas con aislamientos de CMV de distinto grupo en huéspedes experimentales. Previo a la inoculación se procedió a establecer el grupo al que pertenece el CMV aislado y caracterizado por el Dr. Gilbertson (Universidad de California en Davis) mediante el análisis filogenético con la secuencia nucleotídica parcial de la CP. En la Figura 6 se presenta el árbol filogenético consenso elaborado por máxima parsimonia con el fragmento de 502 bases correspondientes al gen de la proteína de la cápside depositada en el banco de genes (Número de acceso AF172841). En ese árbol los aislamientos forman al menos dos grupos apoyados por valores de bootstrap elevados. Los aislamientos del grupo IA reportados en trabajos previos forman el grupo más numeroso e incluye a CMV Leo, en este grupo al menos 51 secuencias se distribuyen en tres politomías. Los aislamientos IB y II forman el otro gran grupo dentro del cual se forma un clado (bootstrap de 100) en el que se encuentran las secuencias del grupo II e incluyen a CMV Bra.



**Figura 6** Árbol filogenético sin raíz construido mediante máxima parsimonia con algunas secuencias de la CP depositadas en el Gene Bank incluyendo a CMV Leo y CMV Bra. Los números de acceso se indican en los nodos terminales, en las ramas intermedias los valores porcentuales obtenidos en un análisis de bootstrap con 1000 iteraciones y en los recuadros los OTU incluidos en las politomias I, II y III.

Con el fin de evaluar el comportamiento del satélite, de los virus nodriza (CMV IA o CMV II) y de algunos huéspedes experimentales, se inocularon mecánicamente conjuntos de plantas sanas con savia de plantas indicadoras que contenían a algún aislamiento viral y otros conjuntos en los que se incluyó a los virus más el fragmento de RNAdc del satélite purificado a partir de plantas de *L. nepetaefolia* que lo contenían. Generalmente los

síntomas se manifestaron a partir del séptimo día posterior a la inoculación; los Cuadros 1 y 2 resumen los fenotipos mostrados por las especies experimentales inoculadas únicamente con los virus y los mostrados por las plantas inoculadas con los aislamientos virales en combinación con el satélite. Ningún aislamiento indujo síntomas evidentes en *L. nepetifolia* (L.) Brown, *P. sativum* L., ni las variedades de *L. esculentum* Mill. en cambio el CMV brasileño indujo mosaico y deformación foliar severa en *D. stramonium* L., mientras que CMV Leo no indujo modificaciones fenotípicas evidentes, en las demás especies este aislamiento provocó la aparición de manchas verde amarillentas (mosaico) en las hojas, mientras que CMV Bra generó, además del mosaico, deformación foliar severa; las plantas de *C. amaranticolor* L. inoculadas con ambos aislamientos presentaron lesiones cloróticas y posteriormente puntos necróticos en las hojas inoculadas. El Cuadro 2 resume los síntomas (Figuras 7 y 8) desarrollados en los huéspedes inoculados con las combinación CMV Leo / CMV satRNA Leo y CMV Bra / CMV satRNA Leo; las plantas inoculadas con una u otra combinación presentaron básicamente los mismos síntomas que desarrollaron cuando fueron inoculadas únicamente con los aislamientos virales, excepto que en las plantas inoculadas con CMV Bra/CMV satRNA Leo el mosaico fue cualitativamente más leve que cuando se inoculó solamente al nodriza.

**Cuadro 1.-** Síntomas desarrollados en huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva, de los aislamientos CMV Leo y CMV Bra. Los síntomas generalmente se empezaron a manifestar siete días posteriores a la inoculación y fueron registrados transcurridos 15 dpi.

Especie	Aislamiento Viral	
	CMV leo	CMV Bra
<i>L. esculentum</i> (var. Floradade)	ninguno	ninguno
<i>Datura stramonium</i>	ninguno	Deformación foliar con mosaico y abultamiento
<i>Cucurbita pepo</i>	Mosaico	Mosaico
<i>Cucumis sativus</i>	Mosaico	Mosaico con deformación foliar
<i>Capsicum annum</i> (var. Guajillo)	Mosaico	Mosaico
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	ninguno	ninguno
<i>Physalis ixocarpa</i>	Mosaico	Mosaico con deformación foliar y abultamiento.
<i>L. esculentum</i> (var. Río grande)	ninguno	ninguno
<i>Pisum satium</i>	ninguno	ninguno
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Necrosis local	Necrosis local

**Cuadro 2.-** Síntomas desarrollados en huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva de los aislamientos CMV Leo / CMV satRNA Leo y CMV Bra / CMV satRNA Leo. Los síntomas generalmente se empezaron a manifestar siete dpi y fueron registrados transcurridos 15 dpi.

Especie	Mezcla viral	
	CMV Leo / satRNA	CMV Bra / satRNA
<i>L. esculentum</i> (var. Floradade)	ninguno	ninguno
<i>Datura stramonium</i>	Mosaico	Deformación foliar con mosaico y abultamiento
<i>Cucurbita pepo</i>	Mosaico	Mosaico
<i>Cucumis sativus</i>	Mosaico	Mosaico con deformación foliar
<i>Capsicum annum</i> (var. Guajillo)	Mosaico	Mosaico con deformación foliar
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	ninguno	ninguno
<i>Physalis ixocarpa</i>	Mosaico	Mosaico con deformación foliar y abultamiento.
<i>L. esculentum</i> (var. Río grande)	ninguno	ninguno
<i>Pisum satium</i>	ninguno	ninguno
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Necrosis local	Necrosis local



A



B



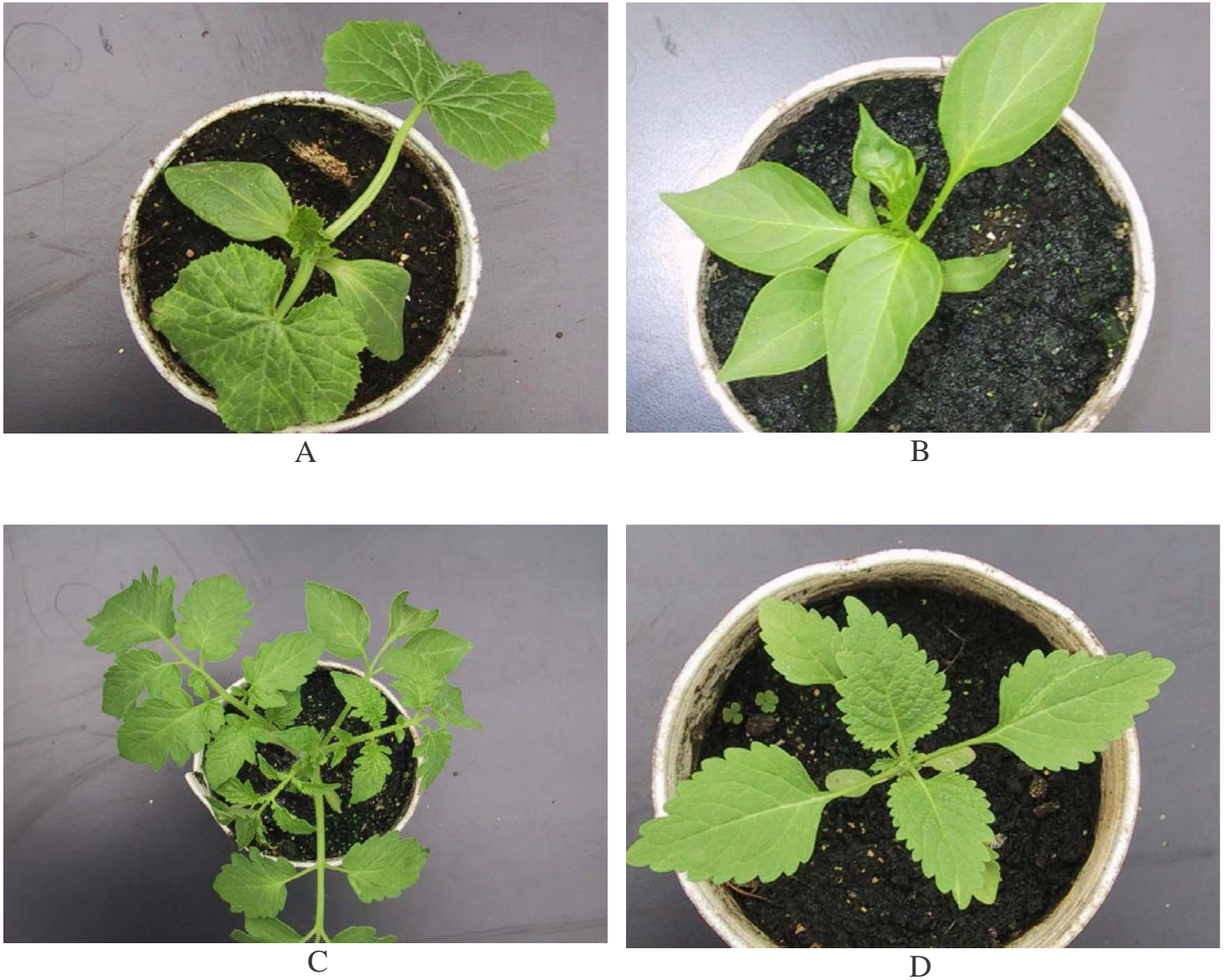
C



D

**Figura 7.-** Huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva conteniendo la combinación CMV Leo / CMV satRNA Leo. A, B: *C. pepo* y *C. annum* (var. Guajillo) con mosaico, C, D: *L. esculentum* y *L. nepetaefolia* sin síntomas evidentes.



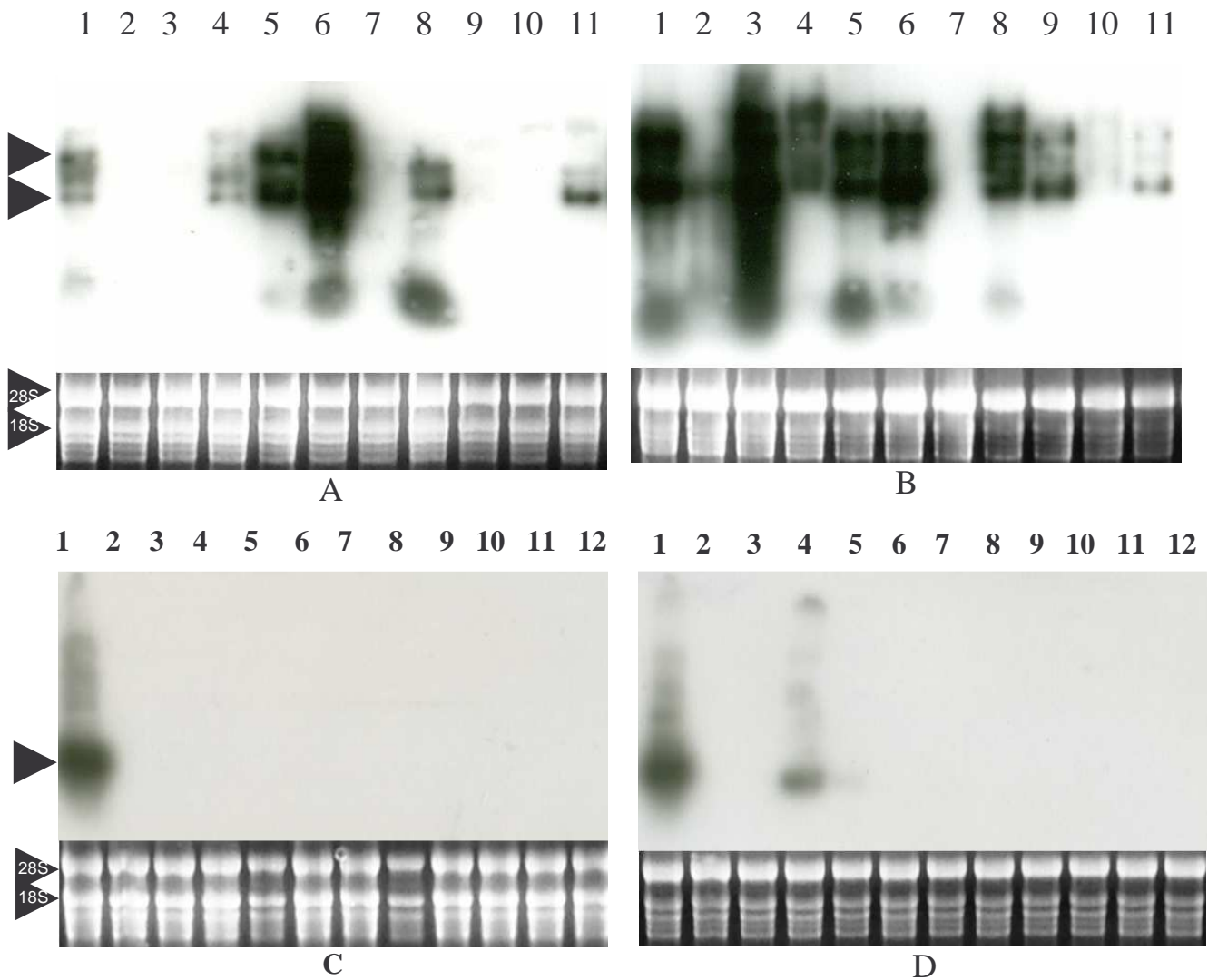


**Figura 8.-** Huéspedes experimentales inoculados con savia infectiva conteniendo la combinación CMV Bra / CMV satRNA Leo. A, B: *Cucurbita pepo* y *C. annum* (var. Guajillo) con mosaico y mosaico con deformación foliar, respectivamente; C, D: *L. esculentum* y *L. nepetaefolia* sin síntomas evidentes.

## 7.6 Determinación de la replicación y acumulación de CMV y CMV satRNA Leo en las hojas inoculadas de los huéspedes experimentales

Siete días posteriores a la inoculación se extrajo el RNA total de las hojas inoculadas y se determinó la presencia de los patógenos mediante ensayos de hibridación tipo Northern Blot utilizando como sonda radiactiva el fragmento del gen de la proteína de la cápside de CMV y el fragmento de 350 pb de CMV satRNA Leo. La figura 9 muestra que en las autorradiografías se detectan dos señales de hibridación, la superior que corresponde con un fragmento de aproximadamente 2000nt (que corresponde al RNA mensajero de la MP o RNA3) y la inferior con un fragmento de aproximadamente 1000nt (correspondiente al transcrito de la CP o RNA 4), además en algunos casos es evidente una señal de hibridación con fragmentos de longitud menor a 100nt. El aislamiento CMV Bra se replica y se acumula en la mayoría de los huéspedes inclusive en los que no se detectaron modificaciones fenotípicas, excepto *L. nepetifolia* (L.) Brown, (Figura 9, carril 7); CMV Leo se detectó en todos los huéspedes que mostraron síntomas, excepto en *D. stramonium* L. en las cuales se detectó un mosaico ligero.

El Cuadro 3 indica la concentración relativa de la CP; los niveles de CMV Leo, en las hojas inoculadas es similar en todos los huéspedes infectados, excepto *C. annum* L., en las cuales los niveles de CP triplican aproximadamente a los niveles en los demás huéspedes. Por otro lado, los niveles de CP en el aislamiento CMV Bra, en general, son superiores respecto a las de CMV Leo, en este caso *D. stramonium* L. y *C. annum* L. muestran niveles de CMV CP superiores al resto, correspondiendo al menos al triple y al doble respectivamente.



**Figura 9.-** Detección de CP de CMV Leo (A), CMV Bra (B) y CMV satRNA (C y D) en las hojas inoculadas de los huéspedes experimentales mediante hibridación tipo Northern Blot. Panel A y C, plantas inoculadas con CMV Leo / CMV satRNA Leo; Panel B y D, plantas inoculadas con CMV Bra / CMV satRNA Leo. Los huéspedes en los paneles corresponden de derecha a izquierda con: 1, control positivo, 2, *L. esculentum* Mill. (var. Floradade), 3, *Datura stramonium* L., 4, *Cucurbita pepo* L., 5, *Cucumis sativus* L., 6, *Capsicum annum* L. (var. Guajillo), 7, *Leonotis nepetaefolia* (L.) Brown, 8, *Physalis ixocarpa* Brot., 9, *L. esculentum* Mill. (var. Río grande), 10, *Pisum sativum* L., 11, *Chenopodium amaranticolor* L. En la parte inferior de los paneles se indica la concentración de los respectivos RNA.

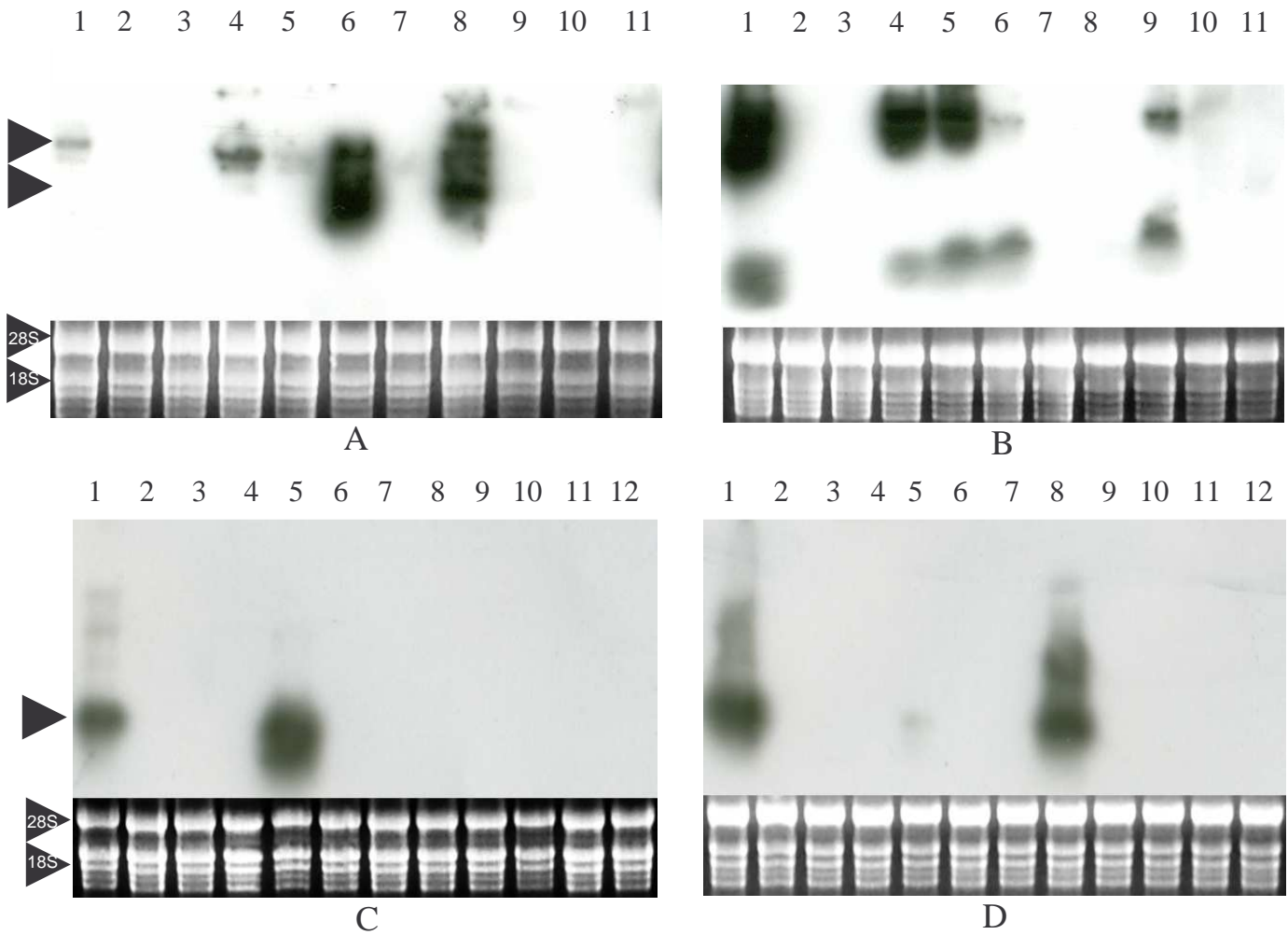


La replicación y acumulación de CMV satRNA fue analizada por hibridación con sonda radiactiva en ensayos tipo Northern blot utilizando el RNA total de las hojas inoculadas con CMV Leo / CMV satRNA (Figura 8, panel C) y CMV Bra / CMV satRNA (Figura 9, panel D). Solamente en las cucurbitáceas inoculadas con la mezcla que incluye a CMV Bra hay señales de hibridación con un fragmento que corresponde a un RNA de aproximadamente 300nt. Aún cuando la señal radiactiva es baja en ambas especies, los correspondientes a *C. pepo* al menos duplica los niveles mostrados en la otra especie.

### **7.7 Detección del movimiento a larga distancia y acumulación de CMV CP y CMV satRNA Leo en tejidos jóvenes de los huéspedes experimentales**

Quince días posteriores a la inoculación se extrajo el RNA total de los tejidos jóvenes y se determinó la presencia de CMV y del satélite mediante ensayos de hibridación tipo Northern Blot en los que se utilizó como sonda el fragmento del gen de la proteína de la cápside de CMV y el fragmento de 350 pb de CMV satRNA Leo. En la figura 10 se muestran los resultados, en la primera autorradiografía se detectan dos señales de hibridación, la superior corresponde con un fragmento de aproximadamente 2000nt (RNA 3) y la inferior con 1000nt aproximadamente (RNA 4). La señal correspondiente al RNA 4 es más intensa en las plantas inoculadas con CMV Leo, mientras que la correspondiente al RNA 3 es más intensa en las plantas inoculadas con el aislamiento CMV Bra. CMV Leo fue capaz de moverse a larga distancia y acumularse en los tejidos jóvenes en todos los huéspedes que mostraron síntomas, de manera interesante, *P. sativum* L. no mostró síntomas y el aislamiento solamente se detectó en las hojas inoculadas. Por su parte CMV Bra no se movió a larga distancia en *L. esculentum* Mill. var. Floradade, *D. stramonium* L. ni *P. ixocarpa* Brot. en los que si se detectó en las hojas locales.

En esas muestras se detectó al CMV satRNA utilizando como sonda el fragmento de 300 pb de CMV satRNA Leo, la figura 10 panel C y D muestran señal de hibridación correspondiente con un RNA de aproximadamente 300nt. Los dos aislamientos virales apoyan la replicación y movimiento a larga distancia en *C. sativus* L., mientras que en *P. ixocarpa* Brot. sólo el aislamiento brasileño apoya la acumulación en hojas jóvenes, en éstas plantas además del fragmento de 300 nt se observa señal de hibridación con un RNA de 700nt aproximadamente. En el Cuadro 3 se indica la concentración relativa de la CP y del satélite, en primer lugar, la concentración del aislamiento brasileño parece superar la del aislamiento de *Leonotis*, por otra parte la concentración de la CP, de ambos aislamientos, parece decrecer con la presencia del satélite.



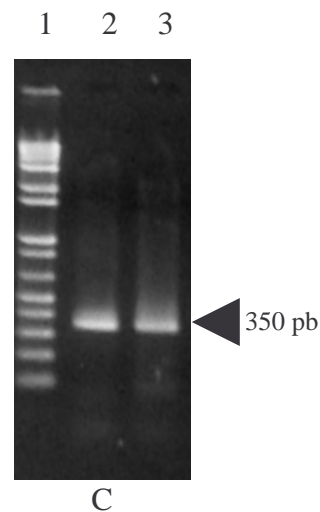
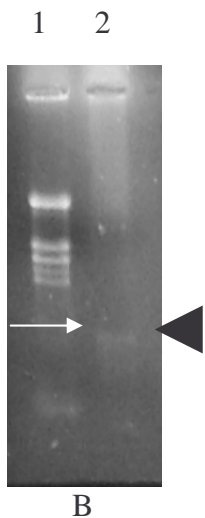
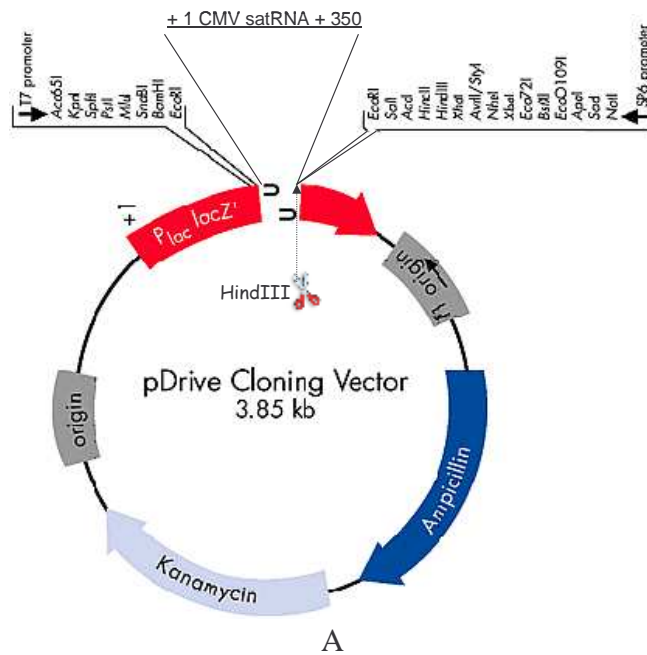
**Figura 10.-** Detección de CMV CP (RNA 3 y 4) de CMV Leo (A), CMV Bra (B) y CMV satRNA (C y D) en las hojas jóvenes de los huéspedes experimentales mediante hibridación tipo Northern Blot. En la parte inferior de cada panel se indica la concentración de los respectivos RNA. Panel A y C: plantas inoculadas con CMV Leo / CMV satRNA Leo; Panel B y D: plantas inoculadas con CMV Bra / CMV satRNA Leo. Los huéspedes en ambos paneles corresponden de derecha a izquierda con: 1, control positivo, 2, *L. esculentum* Mill. (var. Floradade), 3, *Datura stramonium* L., 4, *Cucurbita pepo* L., 5, *Cucumis sativus* L., 6, *Capsicum annum* L. (var. Guajillo), 7, *Leonotis nepetaefolia* (L.) Brown, 8, *Physalis ixocarpa* Brot., 9, *L. esculentum* Mill. (var. Río grande), 10, *Pisum sativum* L., 11, *Chenopodium amaranticolor* L.

**Cuadro 3.-** Concentración relativa de CMV CP Leo, CMV CP Bra y CMV satRNA en hojas locales y jóvenes de huéspedes experimentales inoculados con mezclas del satélite y de los aislamientos virales. (+) presencia, (-) ausencia.

Especie	Hojas Locales		Hojas jóvenes	
	CP Leo/sat	CP Bra/sat	CP Leo/sat	CP Bra/sat
<i>L. esculentum</i> (var. Floradade)	-/-	+/-	-/-	-/-
<i>D. stramonium</i>	-/-	+++++/-	-/-	-/-
<i>C. pepo</i>	+/-	++/++	+/-	+++/-
<i>C. sativus</i>	++/-	+++/+	-/++++	+++/+
<i>C. annuum</i> (var. Guajillo)	+++++/-	+++++/-	+++/+	+/-
<i>L. nepetaefolia</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>P. ixocarpa</i>	+/-	+++/-	+++/-	-/++++
<i>L. esculentum</i> (var. Río grande)	-/-	+/-	-/-	+/-
<i>P. sativum</i>	-/-	+/-	-/-	-/-
<i>Ch. amaranticolor</i>	+/-	+/-	-/-	-/-

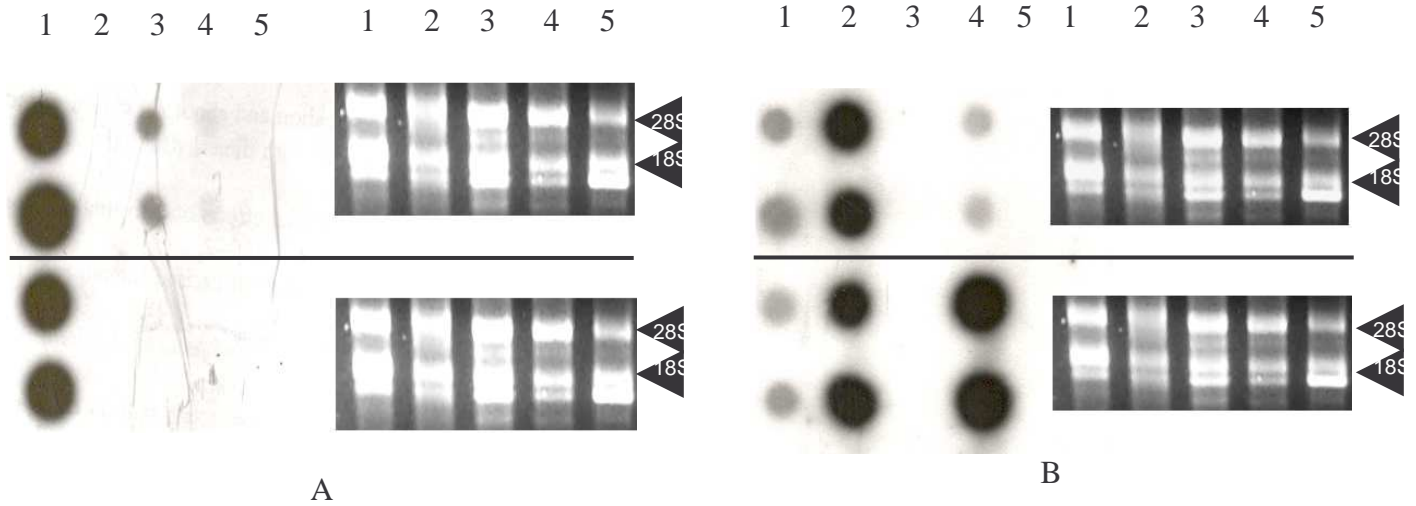
### 7.8 Análisis de la replicación, acumulación y movimiento de CMV satRNA en ausencia de CMV mediante inoculaciones de huéspedes susceptibles con transcritos *in vitro*

Se obtuvieron filamentos positivos de CMV satRNA mediante reacciones de transcripción *in vitro* utilizando la T7 polimerasa, se comprobó la presencia del satélite por RT PCR con iniciadores específicos que amplifican el fragmento completo de 350 bases de CMV satRNA (figura 11C).



**Figura 11.-** Mapa del vector PDRIVE con el inserto de CMV satRNA (350pb) utilizando la enzima de restricción HindIII que reconoce y corta río abajo del promotor T7. Producto de reacciones de transcripción *in vitro* utilizando T7 polimerasa y pDrive:CMV satRNA Leo (Panel B: carril 1, RNA total de *C. pepo*; carril 2, producto de transcripción *in vitro*). Producto de PCR utilizando iniciadores específicos para CMV satRNA y el transcrito sintetizado (Panel C: carril 1, marcador de peso molecular 1Kb Plus, 2, control positivo, 3, producto de RT PCR).

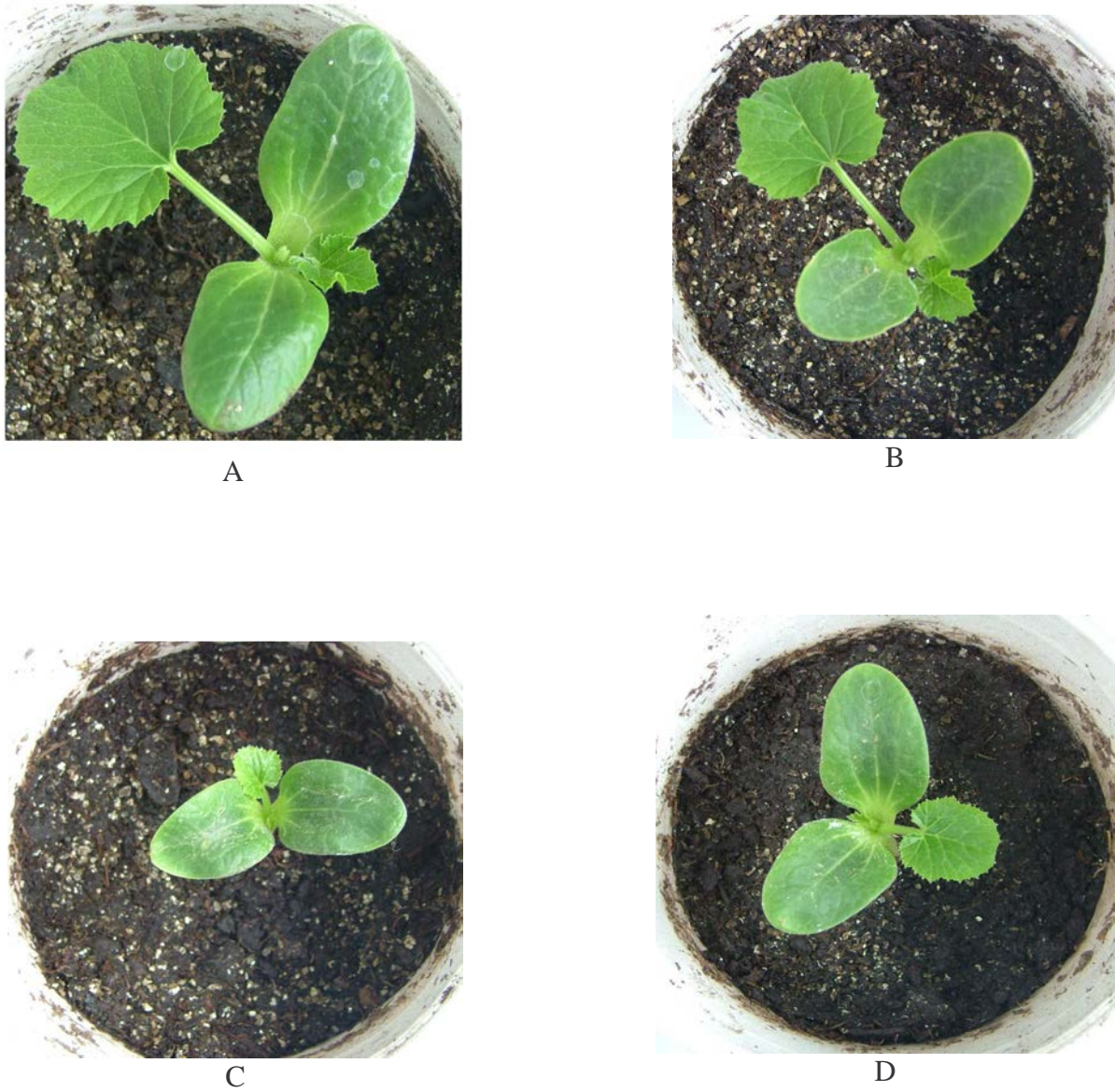
Siete dpi de las plantas de *C. pepo* se extrajo el RNA total de las hojas cotiledonales y siete días después el de las hojas jóvenes, las muestras se sometieron a ensayos de hibridación en punto y tipo Northern Blot (figura 12) para detectar filamentos positivos y negativos del satélite y la CP de CMV. Los resultados muestran niveles elevados de CMV CP (Figura 12B carril 2) en las hojas inoculadas y en las jóvenes de huéspedes inoculados solamente con el virus, esos niveles disminuyen a 1/5 aproximadamente en las hojas inoculadas (Figura 12B, carril 4) cuando el virus se co inocula con el satélite, sin embargo, los niveles de CMV CP se recuperan en las hojas jóvenes en las que no se detecta al satélite (Figura 12A, carril 4). El carril 3 de la figura 12A sugiere la presencia del satélite en las hojas de plantas inoculadas exclusivamente con el transcrito mientras que, en las hojas jóvenes no se observa señal de hibridación en los ensayos de hibridación por punto.



**Figura 12.-** Detección de CMV satRNA (A) y CMV CP (B) mediante hibridación en punto en hojas inoculadas (parte superior) y jóvenes (parte inferior) de *C. pepo* L. inoculada con el transcrito de CMV satRNA. En la parte derecha de las hibridaciones en punto se muestra la integridad del RNA total de cada muestra. Coordenadas (A y B) 1 control positivo, 2 plantas inoculadas con CMV, 3 plantas inoculadas con el transcrito del satélite, 4 plantas coinoculadas con CMV y el satélite, 5 control negativo.

La figura 13 presenta los síntomas mostrados por esas plantas en el transcurso de los 30 días durante los que se mantuvieron en la cámara de crecimiento. Las plantas de *C. pepo* L. inoculadas con CMV y con la combinación CMV / CMV satRNA Leo (figura 13, panel C y D) mostraron los síntomas asociados típicamente a la infección por el CMV, a su vez en las plantas inoculadas con el transcrito del satélite no se detectaron modificaciones en el fenotipo (Figura 13, panel B).





**Figura 13.-** Plantas de *C. pepo* L. inoculadas con diferentes combinaciones: (A) Control (B) planta inoculada con el transcrito *in vitro* de CMV satRNA leo (C) planta inoculada con el aislamiento de CMV leo y (D) planta inoculada con CMV/CMV satRNA leo, los síntomas se presentaron 10 días después de la inoculación.



### VIII. Discusión

*Leonotis nepetaefolia* (L.) Brown es una planta anual aparentemente de origen sudafricano que crece en las riveras de los sembradíos en las zonas cultivadas de Atlixco, Puebla, en poblaciones densas, entre las cuales se encuentran plantas con síntomas asociados a virosis. Se ha determinado que esta planta puede albergar al menos al Virus del Mosaico del Pepino, al del Mosaico de la Alfafa, al del Mosaico del Tabaco y al del jaspeado de tabaco, además análisis electroforéticos han determinado la presencia de un RNA satélite asociado al Virus Mosaico del Pepino (CMV satRNA), por lo que esta maleza puede desempeñar un papel importante en la diseminación de virus hacia las plantas cultivadas no solamente en México sino en el continente Americano entero dada la amplia distribución de esta planta (Piedra-Ibarra, 2005; Procopio, *et al*, 2003 ). En las poblaciones poblanas de *L. nepetaefolia* (L.) Brown. se localizan plantas que muestran hojas con manchas verde amarillentas distribuidas en mosaico, otras con grandes manchas blancas o amarillas hacia el ápice de la hoja que progresivamente avanza por toda la hoja (cálico) y plantas con hojas modificadas y apiñadas. El análisis por hibridación (figura 1) muestra que el mosaico y la reducción foliar están asociados a infecciones dobles o triples que tienen en común la presencia de CMV, mientras que el cálico puede ser generado por infecciones simples en las que se presenta tanto AMV como CMV, finalmente la reducción y deformación foliar está asociada a infecciones simples y en mezcla en las que el común denominador es el CMV.

En otros estudios se han obtenido aislamientos del satélite con la capacidad de generar alternativamente, necrosis o clorosis en plantas de jitomate y de tabaco (Roossinck y Palukaitis, 1992: Sleat y Palukaitis, 1992), así como otras variantes que atenúan el mosaico inducido generalmente por las variantes I y II de CMV (Palukaitis, *et al*, 1992). En las plantas de *L. nepetaefolia* provenientes de Atlixco Puebla, CMV satRNA (como indica la figura 1) fue detectado formando un complejo con CMV en plantas con mosaico,

---

mientras que en plantas con reducción foliar el satélite estuvo acompañado por AMV y por CMV, de tal manera que el análisis de los síntomas generados por las distintas combinaciones virales no permiten inferir si el satélite incrementa o atenúa los síntomas generados en *L. nepetaefolia* por infecciones simples.

Los análisis filogenéticos con la secuencia del satélite de CMV, utilizando modelos de distancia y de máxima parsimonia, producen árboles consenso que conservan prácticamente la misma topología. En ambos casos, CMV satRNA leo se agrupó en una politomia, sin embargo cuando se usa el modelo de dos parámetros (Kimura, 1980) la politomía está formada por 14 aislamientos (Politomia 1, figura 3) mientras que utilizando máxima parsimonia el número de integrantes de la politomia disminuyó a 5. En ambos casos, las secuencias con las que se agrupa el aislamiento mexicano corresponden a satélites no necrogénicos cortos (300 a 340 nt) aislados y caracterizados en distintas regiones del mundo. Las secuencias más estrechamente relacionadas con CMV satRNA leo, según éste análisis, fueron aisladas en Israel (acceso al GenBank, U43889), España (Z75879, Z75878) y Japón (D00699), el primero fue aislado de cultivos de plátano y se estableció que atenúa los síntomas del virus nodriza provocando un mosaico ligero en esa planta (Gafny *et al*, 1996). Por otro lado, el análisis de las regiones vinculadas con la inducción de la clorosis de los aislamientos en el grupo que se encuentra el satélite mexicano muestra una diversidad nucleotídica de aproximadamente 0.17% respecto a la región homóloga en el aislamiento B1 sat el cual induce clorosis en tomate (Sleat y Palukaitis, 1992). Específicamente las sustituciones se concentran en los determinantes A127, G148, U149 y U153, las cuales en las secuencias del clado CMV satRNA leo son sustituidos por G, A, C respectivamente, mientras que el residuo 153 ha sido eliminado. Variaciones como las presentadas por el grupo mexicano en esta región de su secuencia, son característicamente presentadas por los aislamientos que atenúan los síntomas del virus nodriza, los detalles a nivel molecular del mecanismo que determinan este fenotipo

aún permanecen desconocidos (Sleat y Palukaitis, 1992, Roossinck, 2004). De manera que las evidencias biológicas obtenidas en este trabajo y la ausencia de la secuencia asociada con la inducción de la necrosis (Hidaka y Hanada, 1994), permiten establecer que CMV satRNA leo corresponde con las variantes que atenúan los síntomas de CMV, las cuales han sido utilizadas en proyectos para la obtención de plantas transformadas resistentes a la infección de variantes de CMV agresivas (Stommel *et al*, 1998).

El uso de satélites con fines de evadir los efectos que genera el CMV en las plantas cultivadas ha merecido una serie de recomendaciones, una de ellas hace referencia a que los CMV satRNA pueden modular los síntomas inducidos por el virus nodriza de manera diferencial dependiendo del aislamiento con el que se encuentren asociados (Roossinck, *et al*, 1992; Sleat and Palukaitis, 1990; Wang y Simon, 1999), por ejemplo, aislamientos que generan clorosis sistémica (B2 y WL3) en plantas de tabaco cuando se inoculan con aislamientos de CMV del subgrupo II, no tienen el mismo efecto cuando se coinocula con aislamientos del subgrupo I, mientras que algunos aislamientos (por ejemplo B1) al parecer no muestran dependencia del aislamiento viral (Sleat and Palukaitis, 1990). De esta manera y dado que disponemos de un aislamiento de CMV de origen brasileño (donado por el Dr. Gilbertson de la Univ. de Davis en California) que genera síntomas cualitativamente más severos (Cuadro 2) que el aislamiento obtenido de *L. nepetaefolia*, se procedió a establecer el grupo al que pertenece este aislamiento mediante el análisis filogenético de la secuencia parcial del gen de la cápside (No. Acceso AF172841) para posteriormente, comparar los efectos de ambos aislamientos virales en compañía con el satélite. Los resultados del análisis filogenético sugirieron que este aislamiento corresponde al grupo II de CMV (Figura 6), éstos se distribuyen en regiones templadas del planeta y usualmente se asocian con síntomas ligeros en la mayoría de los huéspedes susceptibles (Palukaitis, *et al*, 1992), análisis similares establecieron que el aislamiento de CMV leo pertenece al grupo IA que se distribuye en las regiones tropicales y que

usualmente genera síntomas severos en los huéspedes susceptibles (Piedra-Ibarra, 2005). Los análisis biológicos, destinados a determinar el comportamiento del satélite con los aislamientos de CMV a través del análisis del fenotipo de huéspedes experimentales y de la capacidad del satélite y de los componentes genómicos virales para acumularse y moverse en la planta huésped, mostraron que la inoculación de CMV leo provoca un mosaico ligero en las especies susceptibles mientras que el aislamiento brasileño genera un síntoma más drástico, por otro lado, la co inoculación de esos aislamientos con el satélite parece no modificar ostensiblemente la expresión a nivel fenotípico de los síntomas en estas especies. Estos resultados podrían explicarse considerando que la interacción molecular del satélite con los aislamientos no conducen a una modificación a nivel fenotípico o bien que el satélite probablemente quede restringido a las hojas inoculadas. Así, es necesario establecer si el satélite posee la capacidad de replicarse y/o moverse, los resultados en los ensayos de hibridación sugieren que los niveles de la concentración del satélite cuando es co inoculado con CMV leo es menor que los niveles que pueden ser detectados por éste método, de tal manera que no es posible su detección en las hojas inoculadas mientras que es posible detectarlo en las hojas jóvenes de plantas de pepino. Por otra parte, el rango de especies susceptibles, determinado a través de la modificación fenotípica, es mayor para el aislamiento brasileño, y en las especies que pueden ser infectadas por ambos aislamientos, el aislamiento brasileño se acumula en concentraciones superiores. La presencia del satélite parece modificar las concentraciones y el movimiento del genoma de los virus (del componente 4 específicamente), adicionalmente es necesario determinar si existe alguna interferencia en la presencia, acumulación y movimiento con el RNA1 y 2 del virus.

Los ensayos biológicos mostraron que la inoculación mecánica de *Ch. amaranticolor* L. con los diferentes aislamientos virales generó anillos necróticos en las hojas inoculadas, esto sea posiblemente resultado de un mecanismo de defensa de ésta planta como el

---

despertado en plantas de jitomate, donde Xu determinó que el satélite induce la muerte celular programada de las células infectadas (Xu, *et al*, 2003). Por su parte las plantas de *C. sativus* L. y *P. ixocarpa* Brot. mostraron una coloración verde amarillenta en mosaico acompañada de deformación foliar posiblemente como resultado de la interrupción en la síntesis de clorofila mediada por el satélite como lo sugiere Masuta en sus ensayos realizados en plantas de tabaco (Masuta, 1993).

Los resultados en los análisis de hibridación radiactiva parecen confirmar que las concentraciones del satélite y del virus nodriza se relacionan inversamente: cuando no se encuentra al satélite los niveles del genoma viral aumentan considerablemente (figura12, carril 2 panel B), inclusive en los controles es evidente que una alta concentración del satélite provoca la disminución del segmento 4 del virus, probablemente debido a la competencia por las replicasas de origen vegetal o viral o bien por otros factores limitantes (Wu, *et al*, 1991). Al parecer el genoma del satélite puede ser replicado por las RNA polimerasas de la planta y puede acumularse en las hojas inoculadas hasta alcanzar niveles detectables, sin embargo ese material es incapaz de acumularse en las hojas jóvenes, lo cual permitiría sugerir que la dependencia del satélite por el virus podría estar determinado a nivel de la diseminación de una célula a otra o bien en su traslado a larga distancia. De esta manera la competencia por factores limitantes, distintos a las polimerasas, explicarían los bajos niveles de ambos elementos en las hojas inoculadas, es más, esta interpretación permitiría proponer que los niveles del segmento viral aumentan en las hojas jóvenes de esas plantas debido a la ausencia o al decremento en la concentración del genoma del satélite hasta niveles que no permiten su detección. Por otro lado, en el análisis Northern blot (figura10 B y D) de los ensayos donde se combinó al satélite con el aislamiento brasileño de CMV, se determinó concentraciones elevadas del satélite y no se detectó señal de CMV CP quizás debido a baja concentración de este componente, sin embargo también cabe la posibilidad de que el CMV satRNA no requiera

de componentes del virus para su replicación y movimiento, sino que estos componentes virales aún en niveles mínimos induzcan factores endógenos del huésped necesarios para suplir los procesos de replicación y movimiento; esto explicaría la concentración elevada del RNA satélite en relación a la de CMV en algunas combinaciones de huéspedes experimentales. En estas mismas figuras (10 B y D) se pueden apreciar hibridaciones de RNAs de bajo peso molecular (menores de 100 nt), es posible, que esto sea resultado del mecanismo de defensa en respuesta a patógenos conocido como silenciamiento génico postrascriptcional donde los componentes virales son degradados por enzimas del huésped, para comprobar esto sería necesario llevar a cabo ensayos que permitan detectar los RNAs de bajo peso molecular (23-25nt) o la inducción de complejos enzimáticos (Baulcombe, 2004) típicos de este mecanismo de defensa utilizado por plantas. Por otro lado, la posibilidad de la replicación del satélite por polimerasas de origen vegetal sigue siendo digna de analizarse, pero parece necesario que el RNA del satélite y que los componentes virales sean sintetizados *in vitro* de manera que se descarte la posibilidad de que otro material (virus, viroide u otro) interfiera en el proceso. Con esta finalidad se hace necesario amplificar y clonar los componentes completos de las variantes de CMV y para hacer inoculaciones con distintas combinaciones de su genoma y establecer si la proteína del movimiento sería capaz de favorecer la diseminación de las copias del satélite aparentemente sintetizadas en ausencia del nodriza.

## IX. Conclusiones

- 1.- La caracterización molecular y biológica del satélite sugieren que el CMV satRNA Leo pertenece al grupo de los satélites que atenúan los síntomas provocados por CMV.
- 2.- Los aislamientos de CMV del grupo IA y II apoyan la replicación, acumulación y movimiento de CMV satRNA Leo en algunos huéspedes.
- 3.- Las inoculaciones mixtas muestran que CMV satRNA Leo puede replicarse y moverse a larga distancia en algunos huéspedes experimentales disminuyendo los niveles del gen que codifica la proteína de la cápside del virus nodriza.
- 4.- Las plantas de *C. pepo* apoyan la replicación del satélite aún en ausencia del virus nodriza, sugiriendo que se requieren factores virales para permitir el movimiento a larga distancia.

---

**X. Referencias**

- 1.- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature*. 431: 356-363.
- 2.- Béclin C. Berthomé R., Palauqui J. C., Tepfer M. and Vaucheret H. 1998. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans) genes. *Virology*. 252, 313-317.
- 3.- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20<sup>th</sup> August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- 4.- Bustamante P.I. and Hull. R. 1998. Plant virus gene expression. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.1, No. 2.
- 5.- Canto T., Prior D. A. M., Hellwald K. H., Oparca K. J. and Palukaitis P. 1997. Characterization of cucumber mosaic virus IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell to cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology*. 237, 237-248.
- 6.- Carrington. J. C., Kasschau. K. D., Mahajan. S. K. and Schaad. M. C. 1996. Cell to cell and long distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*. 8: 1669-1681.
- 7.- Diener TO. 2001. The Viroid: Biological oddity or evolutionary fossil?. *Adv. Virus Res.* 57: 137-184.
- 8.- Escriu F., Fraile A. and García A. F. 2000. Evolution of virulence in natural populations of the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology*. 90, 5: 480-485.
- 9.- Gafny, R., Wexler, A., Mawassi, M., Israeli, Y. And Bar-Joseph. 1996. Natural infection of banana by a satellite-containing strain of cucumber mosaic virus: nucleotide sequence of the coat protein gene and satellite RNA. *Phytoparasitica*. 24, 1: 49-56.
- 10- Galtier, N., Gouy M. and Gautier C. 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*. 12: 543-548.



- 11.- Gilbertson. R. L., Ruiz-Medrano., M. R. Sudarshana. M. R., Lucas. W. J. 2001. Virus movement. Encyclopedia of Plant Pathology. Edit. Otis C. Maloy and Timothy D. Murray Vol. 2, 1116-1124.
- 12.- Góra-Sochaca A, 2004. Viroids: unusual small pathogenic RNAs. Acta Biochimica Polonica. 51,587-607.
- 13.- Haywood, V; Kragler, F, and Lucas, W. 2002. Plasmodesmata: Pathways for Protein and Ribonucleoprotein Signaling. Plant Cell. S303-S325.
- 14.- Heinlein, M. 2002. The spread of *Tobacco mosaic virus* infection: Insights into the cellular mechanism of RNA transport. CMLS. 59: 58-82.
- 15.- Hidaka, S; and Hanada, K. 1994. Structural features unique a new 405-nucleotide satellite RNA of cucumber mosaic virus inducing tomato necrosis. Virology. 200, 2: 806-8.
- 16.- Ishima A. and Barbier P. 1994. Molecular anatomy of viral RNA directed RNA polymerases. Arch. Virol. 134, 235-258.
- 17.- Kadaré G. and Haenni A. L. 1997. Virus encoded RNA helicases. J. Virol. 71, 2583-2590.
- 18.- Kaper J. M and Waterworth H. E. 1977. Cucumber mosaic virus associated RNA5: causal agent for tomato necrosis. Science. 196:429:431.
- 19- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- 20.- Logemann J. Schell U. Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. Analytical Biochemistry. 163:16-20.
- 21.- Lough, J. T; and Lucas W. J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 203-232.

- 
- 22.- Lucas. W. J. and Lee J.Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature reviews*. 5: 712-726.
- 23.- Lucas J. W. 2006. Plant viral movement proteins : agents for cell to cell trafficking of viral genomes. *Virology*. 344: 169-184.
- 24.- Maniatis T; Sambrook J; Russell D. 2001. *Molecular cloning*. Tercera edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A.
- 25.- Maciel-Zambolim E., Carvalho, M. G. and Gilbertson, R. L. 1999. Biological and molecular characterization of tomato-infecting cucumber mosaic virus isolates from California, and studies on the role of the capsid protein on cell-to-cell movement of the virus. Thesis Univ. Fed. de Vicosa, Vicosa, MG, Brazil.
- 26.- Masuta, C., Suzuki, M., Matsukari, T., Honda, I., Kuwata, S., Takanami, Y. and Koiwai, A. 1993. Bright yellow chlorosis by cucumber mosaic virus Y satellite RNA is specifically induced without severe chloroplast damage. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42: 267-278.
- 27.- Mathews R. E. F. 1991. *Plant Virology*. Academia Press, USA.
- 28.- Mayo. M. A. 2002. *Virus Taxonomy 2002*. *Arch. Virol*. 147, 5: 1072-1076.
- 29.- Melcher, U. 2000. The “30K” superfamily of viral movement proteins. *J. of General Virology*. 81, 257-266.
- 30.- Nicholas, K. B: and Nicholas, H. B. 1997. GeneDoc A tool for editing and annotating multiple sequence alignments: Multiple sequence alignment editor and shading utility version 2.6.002. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
- 31.- O' Really E. K. and Kao C. C. 1998. Analysis of RNA dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology*. 252: 287-303.

- 32.- Palukaitis, P; Roossinck, M. J; Dietzgen, R. G; and Francki, R. I. B. 1992. Cucumber Mosaic Virus. *Adv. Virus Res.* 41:281-348.
- 33.- Piedra-Ibarra E. 2000. Tesis de maestría. UNAM. México.
- 34.- Piedra-Ibarra E; De la Torre-Almaraz R; Zúñiga G; Xoconostle-Cazares B; Ruiz-Medrano R. 2005. *Leonotis nepetaefolia*: An important Plant Virus reservoir in central Mexico. *Phytoparasitica.* 33, 5: 480-494
- 35.- Prados-Alonso J. L., Aranda M. A., Malpica J. M., Gracia-Arenal F. and Fraile A. 1998. Satellite RNA of Cucumber Mosaic Cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology.* 88, 6: 520-524.
- 36.- Pringle C. R. 1999. Virus taxonomy 1999. *Arch. Virol.* 144,2:422-429.
- 37.- Procópio, S. O.; Ferreira, E. A.; Silva, E. A. M.; Silva, A. A.; Rufino, R. J. N. 2003. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. V - *Leonurus sibiricus*, *Leonotis nepetaefolia*, *Plantago tomentosa* e *Sida glaziovii*. *Planta daninha.* 21, 3: 403-411.
- 38.- Razanov M. N., Koonin E. V. and Gorbalenya A. E. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: A hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73, 2129-2134.
- 39.- Roossinck M. J Sleat D. and Palukaitis P. 1992. Satellite RNAs of plant viruses: Structures and biological effects. *Microbiological Reviews* 56, 2: 265-279.
- 40.- Roossinck M. J., Zhang. L. and Hellwald. K. H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology.* 73, 8: 6752-6758.
- 41.- Roossinck M. 2001. *Cucumber Mosaic Virus*, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology* 2, 2: 59-63.

- 42.- Roossinck M. J and Havelda, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New Paradigms for a New Century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 415–37.
- 43.- Rzedowski J; y Rzedowski C. G. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Primera edición. Vol. 2. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. Mex. D.F. Pag. 295.
- 44.- Sacristán S., Fraile A. and García-Arenal F. 2004. Population dynamics of *Cucumber Mosaic Virus* in melon crops and in weed in central Spain. *Phytopathology.* 94, 9: 992-998.
- 45.- Sleat, D. E. and Palukaitis, P. 1990. Induction of tobacco chlorosis by certain cucumber mosaic virus satellite RNAs is specific to subgroup II helper strain. *Virology.* 176, 292-295.
- 46.- Sleat D. E. and Palukaitis P. 1992. A single nucleotide change within a plant virus satellite RNA alters the host specificity of disease induction. *Plant Journal.* 2, 1: 43-49.
- 47.- Stommel, J. R., Tousignant, M. E., Wai, T., Pasini, R. and Kaper, J. M. 1998. Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to cucumber mosaic virus. *Plant Disease.* 82, 4: 391-396.
- 48.- Swofford, D. L. 2000. PAUP: Phylogenetic analysis Using parsimony and other methods (software). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 49.- Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F. Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The clustal X-Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25: 4876-4882.
- 50.- Wang, J; and Simon. A. E. 1999. Symptom attenuation by satellite RNA *in vivo* is dependent on reduced levels of virus coat protein. *Virology.* 259, 234-245.
- 51.- Wu G., Kaper J. M. and Jaspars E. M. J. 1991. Replication of cucumber mosaic virus satellite RNA *in vitro* by an RNA-dependent RNA polymerase from virus-infected tobacco. *Virology.* 292, 2: 213-216.

52.- Xu, P. and Roossinck, M. J. 2000. Cucumber Mosaic Virus D satellite RNA-Induced programmed cell death in tomato. Plant cell. 12, 1079-1092.

53.- Xu P., Blancafor E. B; and Roossinck M. J. 2003. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. MPMI. 16, 6:467-476.

**Direcciones electrónicas.**

[www.ncbi.nlm.nih.gov/2005](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/2005)

<http://www.biolinux.org/clustalx.html/2005>

[www.psc.edu/biomed/genedoc/2005](http://www.psc.edu/biomed/genedoc/2005)