



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

### CARRERA DE BIOLOGÍA

Caracterización parcial de los virus asociados a *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown en Atlixco, Puebla que inducen amarillamiento y deformación foliar en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

que para obtener el título de Biólogo presenta:

Contreras Paredes Carlos Alberto

Director de tesis: Elías Piedra Ibarra



Los Reyes Iztacala Tlalnepantla , Edo. de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Unidad Zacatenco, a cargo de la Dra. Beatriz Xoconostle Cazares y del Dr. Roberto Riuz Medrano a quienes agradezco por la oportunidad de llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Agradezco también al Dr. Rodolfo de la Torres Almaraz a cargo del laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, por el entrenamiento brindado en la técnica de extracción de RNA de doble cadena.

A Dios por darme la vida y permitirme ver los tesoros que en ella permanecen.

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por la educación y los valores que me han inculcado y que me han permitido llegar hasta aquí.

A mis hermanas por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.

A mi abuelito por su cariño y su ejemplo de seguir siempre adelante.

A mi familia que siempre me apoyó y creyó en mí.

A Elías por su apoyo, amistad y la calidad humana que siempre mostró hacia mí.

Al Dr. Roberto y la Dra. Bety por su amistad y apoyo.

A mis sinodales: Rodolfo de la Torre, Jorge Campos Contreras, Diego Arenas Aranda, por sus observaciones y la orientación que me brindaron.

A Alejandro Monsalvo por las secuencias y su amistad.

A mis amigos y compañeros: Gerardo, Abel, Toño, Carolina, Leo, Edcel, Francisco, Alejandro, Beca, Karen, Alejandra, mi compadre Felipe, Abril, Jorge, con quienes compartí momentos inolvidables.

A amigos del CINVESTAV: Julián, Blanca, Aseneth, Jesús, Estela, mi compadre Cristian, Victorio, José Luís, Héctor, Lidia y Víctor, por su amistad y compañerismo en el trabajo.

## INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Las malezas como reservorios de patógenos	3
Importancia del cultivo de Jitomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) en México	4
Principales agentes biológicos que afectan la producción de Jitomate	6
Estrategias para el control de la diseminación de las enfermedades virales	10
Protocolos diseñados para el diagnóstico de enfermedades virales	11
Plantas indicadoras y diferenciales	11
Observación de partículas virales mediante microscopía electrónica	12
Microscopía electrónica inmunoabsorbente	12
Detección de partículas virales mediante reacciones mediadas por anticuerpos (prueba serológica ELISA)	13
Inmunoarreglos (TIBA)	14
Microbalance con inmunosensores de cristal de cuarzo (QCM)	14
Técnica de doble difusión en gel	14
Análisis del RNA de doble cadena	15
Amplificación del genoma viral mediante reacciones de transcripción reversa acoplada a reacciones en cadena de la polimerasa RT-PCR	15
Inmunocaptura PCR (IC-PCR)	16
Amplificación del genoma viral utilizando iniciadores anidados (Nested PCR)	16
Amplificación ligada a restricción de fragmentos virales (RT-PCR-RFLP)	17
Protocolos basados en la complementariedad de los ácidos nucleicos	17
Hibridación en punto (Dot-blot)	17
Clasificación de los virus	18
Especies virales en los cultivos de jitomate y otras Solanáceas en México	18
Justificación	21
Objetivos	22
Materiales y métodos	23
Obtención, aislamiento y conservación del material biológico	23
Caracterización biológica por medio de plantas indicadoras y diferenciales	23
Extracción de RNA total	24
Extracción de RNA de doble cadena (RNA <sub>dc</sub> )	25
Diseño de oligonucleótidos para amplificar fragmentos virales	26
Amplificación de fragmentos virales por reacciones de reversotranscripción (RT-PCR) acoplada a PCR	26
Purificación de productos de PCR	27

Preparación de células competentes	28
Ligación de fragmentos en vectores bacterianos y transformación de células bacterianas	29
Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de <i>E.coli</i> transformadas	29
Hibridación molecular Dot blot	30
Comparación de las secuencias en las bases de genes (GenBank)	31
Análisis filogenético de los aislamientos virales	32
Análisis de restricción <i>in silico</i>	33
Resultados	34
Caracterización biológica por medio de plantas indicadoras y diferenciales	34
Extracción de RNA total	36
Extracción de RNA de doble cadena	36
Diseño de oligonucleótidos para amplificar fragmentos virales	37
Amplificación de fragmentos virales	39
Detección de TMV en plantas de jitomate e indicadoras mediante hibridación en punto con sonda radiactiva	43
Análisis de las secuencias de los fragmentos virales obtenidos mediante RT-PCR	44
Análisis filogenético de las secuencias de los fragmentos del aislamiento mexicano	50
Análisis de restricción <i>in silico</i> con secuencias de genes de la proteína del movimiento y de la cápside de TMV y ToMV	59
Discusión	61
Conclusiones	66
Literatura citada	67

**RESUMEN**

El jitomate o tomate rojo (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las aportaciones vegetales de México más extendida mundialmente (SIAP de la SAGARPA 2002). En la década de los 1990 en México la producción de este cultivo fue afectada por diferentes patógenos que redujeron su calidad y producción (Urias y Alejandre 1999) provocando pérdidas económicas sumamente cuantiosas. En el Valle de Atlixco, Puebla se colectaron plantas de *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown, que mostraban amarillamiento y deformación foliar, fueron usadas para inocular plántulas de jitomate que desarrollaron un síntoma severo amarillamiento y deformación foliar, debido a la importancia económica y alimenticia de este cultivo, se caracterizó parcialmente el patógeno causante de este síntoma. Con la finalidad de determinar la naturaleza del agente etiológico, se emplearon plantas indicadoras y diferenciales, las pruebas mostradas sugirieron la presencia de algún miembro del género de los tobamovirus. El análisis del perfil electroforético del RNAdc extraído de plantas de jitomate con síntomas, sugirió la presencia de un virus monopartita, las cuales fortalecieron las sospechas con relación a la naturaleza del patógeno, para confirmarlas, se diseñaron oligonucleotidos parcialmente degenerados con la finalidad de amplificar, clonar y secuenciar fragmentos de los genes de la proteína de la cápside y del movimiento de la mayoría de los miembros del género de los tabamovirus. Con las secuencias obtenidas, se efectuó un análisis filogenético mediante modelos de distancia genética y máxima parsimonia para establecer la identidad del patógeno. Los árboles filogenéticos obtenidos ubicaron al aislamiento obtenido en el grupo correspondiente a la especie Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), adicionalmente, mostraron que algunos aislamientos asignados a esta especie se distribuyen entre clados formados por

miembros de otras especies sugiriendo que algunas variantes de las especies han sido erróneamente asignadas. Finalmente, se efectuó un análisis *in silico* con las secuencias nucleotídicas obtenidas a fin de establecer mediante la digestión por nucleasas un patrón que permita diferenciar especies virales muy parecidas o que se encuentren en mezcla.

## INTRODUCCIÓN

### Las malezas como reservorios de patógenos

Las malezas han sido consideradas como importantes reservorios de patógenos de plantas en la naturaleza (Duffus, 1971 en Piedra-Ibarra *et al.*, 2005). Se ha determinado que el hongo *Pythium arrehenomanes* (Drechs), considerado como el agente causal de la pudrición de la raíz de la caña de azúcar, se asocia con algunas especies de las familias Poaceae y Cyperaceae (Hoy y Griffin, 1997), otra parte, el hongo *Sclerotinia minor* Jagger, conocido como el mayor patógeno del cacahuate, se ha reportado en nueve especies de malezas, las cuales funcionarían como hospederos naturales (Shew *et al.*, 2003).

Las malezas brindan hospedaje también a bacterias patógenas como *Pseudomonas viridiflava* Burkholder causante de pérdidas económicas en Georgia, USA en donde se encuentra asociada con malezas de distintas especies que le sirven como hospedero alternativo y que están ampliamente distribuidas en el planeta lo que explicaría la amplia distribución en el mundo de la bacteria (Gitaitis *et al.*, 1998); *Erwinia tracheiphila* Smith es el agente causante del marchitamiento bacteriano de cucurbitáceas, principalmente en pepino y melón, tiene por hospederos alternativos algunas malezas de las familias Cucurbitaceae y Rosaceae (De Mackiewicz *et al.*, 1998); *Xanthomonas campestris* pv. *Vitians* Dye, ha sido asociada con la enfermedad de los puntos en las hojas de lechuga, se le ha reportado en malezas de campos infestados en donde sobrevive en los restos de plantas (Barak *et al.*, 2001).

El papel de las malezas en la diseminación de virus que afectan plantas ha sido investigado en diversas partes del mundo (Bracero *et al.*, 2003; Cerkauskas *et al.*, 1983;

Córdoba *et al.*, 2004; Farzadfar, 2005; Gama *et al.*, 1982; Ligoxigakis *et al.*, 2002; Auki *et al.*, 2000; Piedra-Ibarra *et al.*, 2005); particularmente en la región de Macedonia, Grecia, se determinaron los hospederos que actuaban como reservorios del virus del bronceado del tomate (TSWV), se concluyó que las malezas adyacentes a los cultivos actuaban como reservorios virales y que plagas de thrips actuaban como vectores en la transmisión y diseminación del virus (Chatzivassiliou *et al.*, 2001); en Tanzania, se asoció a *Achyranthes aspera* (L.), *Euphorbia heterophylla* (L.) y *Nicandra physaloides* (Gaertn) como reservorios del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) que afecta gravemente a cultivos de jitomate (Kashina *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha reportado en plantas de *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown, que crecen cerca de campos de cultivo en el Valle agrícola de Atlixco, Puebla, la presencia de los virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del pepino (CMV) y a un RNA satélite del virus del mosaico del pepino (CMV satRNA) causando en esta maleza síntomas de mosaico, deformación foliar y calico (Piedra-Ibarra *et al.*, 2005).

### **Importancia del cultivo de Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en México**

El jitomate o tomate rojo (*Lycopersicon esculentum* Mill.), es de las especies hortícolas la más importantes en México debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera, cerca del 30% de la producción nacional tiene destino en otros países ubicando a este producto como la principal especie hortícola de exportación (Hernández-Martínez *et al.*, 2004), lo que representa el 37% del valor total de las exportaciones de legumbres y hortalizas y el 16% del valor total de las

exportaciones agropecuarias solamente superadas por la exportación de ganado vacuno (SIAP de la SAGARPA 2002).

México ocupaba en el 2002 el décimo lugar a nivel mundial en la producción de jitomate con 2,100,000 toneladas (F.A.O. 2003 en SIAP de la SAGARPA 2002). El jitomate se siembra en prácticamente todos los estados de la República Mexicana siendo los ubicados en la región norte y centro del país los que participan con mayor volumen a la producción nacional (SIAP de la SAGARPA 2002).

De acuerdo con la SIAP de la SAGARPA (2005), la producción nacional mexicana de jitomate en el periodo correspondiente al año 1991 al 2000 fue de 19 millones de toneladas siendo el mayor productor de este cultivo el estado de Sinaloa con el 33% de esta producción seguido de Baja California, San Luís Potosí y Michoacán (Figura 1); tan solo la producción nacional de jitomate en el año del 2000 fue de 2,086,030 toneladas, en el 2001 de 2,149,932 toneladas, en el 2002 de 1,989,979 toneladas, en el 2003 de 2,171,159 toneladas (INEGI 2004), y como datos preliminares del año 2004 hasta marzo del 2005 se estima una producción de 2,334,608 toneladas (SIAP de la SAGARPA 2005).

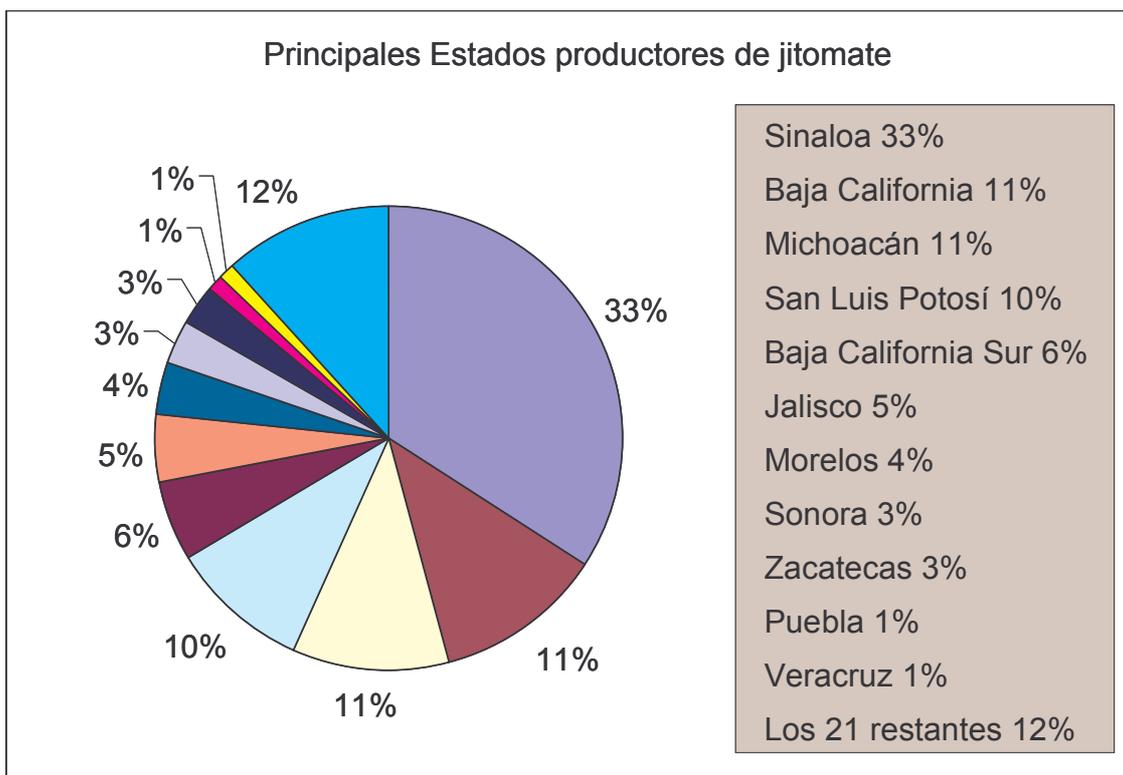


Figura 1. Participación porcentual en la producción nacional de jitomate entre 1991 al 2000 por los principales estados productores (Tomado de SIAP de la SAGARPA 2005).

### Principales agentes biológicos que afectan la producción de Jitomate

Entre los patógenos que causan daños a los cultivos de jitomate generalmente se cita a las araña rojas *Tetranychus urticae* (Koch), *T. turkestanii* (Ugrou y Nikolski) y *T. liden*. La primera especie es la más común, se desarrolla en el envés de las hojas causando decoloraciones, punteaduras o manchas amarillentas que pueden apreciarse en el haz como primeros síntomas. Las temperaturas elevadas y escasa humedad relativa favorecen el desarrollo de la plaga, las infestaciones con poblaciones densas producen desecación o defoliación sobre todo en los primeros estados fenológicos de la planta. Las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius), colonizan las partes jóvenes de las plantas ovopositando en el envés de

las hojas de las cuales emergen las primeras larvas móviles. Tras fijarse en la planta pasan por tres estados larvarios y uno de pupa característicos en cada especie, causando daños al alimentarse absorbiendo la savia de las hojas provocando amarillamientos y debilitamiento de las plantas. Otro daño indirecto es el que se da por la infección de virus transmitidos por el insecto, en este sentido, se ha establecido que *T. vaporariorun* (Westwood) es transmisora del virus del amarillamiento de cucurbitáceas; *B. tabaci* (Gennadius), es potencial transmisora de un número mayor de virus en cultivos hortícolas, de especial interés es su capacidad para transmitir al virus del rizado amarillo de tomate (TYLCV) conocido como virus de la cuchara. Los pulgones *Aphis gossypii* (Glover) y *Myzus persicae* (Sulzer) son comunes y abundantes en los invernaderos donde forman colonias que se dispersan principalmente en primavera y otoño cuando las hembras adultas son aladas. Además de los daños directos estos insectos poseen la capacidad de transmitir una gran cantidad de tipos o especies virales. Las formas adultas de los thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande), colonizan los cultivos realizando las puestas dentro de los tejidos de hojas, frutos y preferentemente flores, donde se localizan las poblaciones más abundantes de adultos y larvas. Los daños producidos por la alimentación de larvas y adultos en el envés de las hojas les producen un aspecto plateado y luego se necrosan, sin embargo, el daño más importante se debe su capacidad de transmisión, entre otros, del virus del bronceado del tomate (TSWV), que afecta a pimiento, tomate, berenjena entre otros. En los casos de los dípteros *Liriomyza trifolii* (Burgués), *L. bryoniae* (Kaltenbach), *L. strigata* (Meigen) y *L. huidobrensis* (Blanchard), las hembras realizan las puestas dentro del tejido de las hojas jóvenes, donde se desarrolla una larva que se alimenta del parénquima. Las larvas salen de las hojas para dar lugar a los adultos y repetir su ciclo

de vida. Las orugas *Spodoptera exigua* (Hübner), *S. litoralis* (Boisduval), *Heliothis armigera* (Hübner), *H. peltiger* (Dennis y Schiffermüller), *Chrysodeisis chalcites* (Esper) y *Autographa gamma* (L.) cuyos estados fenológicos suelen ser muy similares, se alimentan de las plantas durante sus estadios larvales causando daños en hojas, frutos y tallos. Los nemátodos del género *Meloidogyne* suelen afectar prácticamente a todos los cultivos hortícolas, las hembras fecundadas se llenan de huevos tomando un aspecto globoso y producen nódulos en las raíces, los cuales junto con la hipertrofia de las plantas, dan lugar a la formación de rosarios que obstruyen vasos e impiden la absorción de agua y nutrientes por las raíces lo cual se traduce en un menor desarrollo, clorosis, enanismo y en marchites. Adicionalmente, los nemátodos como los insectos y hongos facilitan el establecimiento de bacterias y hongos que pueden actuar como vectores de virus. Entre los hongos que afectan al cultivo de jitomate se encuentran *Botryotinia fuckeliana* (Fuckel), causante de la podredumbre gris del jitomate, los síntomas generados en hojas y flores son lesiones pardas mientras que en los frutos tiene lugar una podredumbre blanda en los que se observa el micelio gris del hongo. Por su parte, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) causa la podredumbre blanca; las lesiones son de apariencia blanda acuosa al principio y posteriormente seca, según la succulencia de los tejidos afectados, los cuales se cubren de un abundante micelio algodonoso blanco. Cuando el hongo afecta el tallo, las plantas frecuentemente se colapsan y mueren rápidamente. El hongo *Leveillula taurica* (Arn.) utiliza algunas solanáceas silvestres como hospedero alterno y causa en plantas de jitomate manchas amarillas en el haz de las hojas que progresivamente se necrosan a partir del centro, observándose un fieltro blanquecino por el envés y finalmente las hojas se desprenden. Por otra parte el oomiceto *Phytophthora infestans* (Montagne), ataca a la parte aérea de las plantas de

jitomate en cualquier etapa de desarrollo, al principio aparecen manchas irregulares de aspecto aceitoso en las hojas que rápidamente se necrosan e invaden casi todo el foliolo, en el tallo infectado aparecen manchas pardas que se van agrandando y que suelen circundarlo, en frutos las infecciones suelen producirse a partir del cáliz por lo que los síntomas cubren la mitad superior, cuando el fruto es inmaduro el hongo suele manifestarse como grandes manchas pardas. El hongo *Alternaria solani* (Jones y Grout), afecta diversas solanáceas pero principalmente jitomate y papa en las que las lesiones aparecen en hojas, tallos, frutos y pecíolos, en las hojas se producen manchas pequeñas circulares o angulares, con marcados anillos concéntricos, mientras que en el tallo y pecíolo se producen lesiones negras alargadas en las que a veces se pueden observar anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardas oscuras ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. *Fusarium oxysporum* (Schlecht), puede permanecer en el suelo durante años y penetrar a través de las raíces hasta el sistema vascular, los síntomas comienzan con la caída de las hojas superiores mientras que las inferiores adquieren un color amarillo que avanza hacia el ápice y terminan por morir, alternativamente la parte aérea puede marchitar y morir. En cuanto a bacterias, *Pseudomonas syringae* (Okabe), afecta a todos los órganos aéreos de la planta causando manchas negras, en las hojas las manchas son pequeñas y rodeadas de un halo amarillo, en los tallos, pecíolos y bordes de los sépalos, las manchas tienen borde y contorno irregular mientras que en frutos verdes las manchas son pequeñas y deprimidas (Infoagro, 2003).

A pesar de la gran variedad de patógenos que afectan a los cultivos de jitomate las pérdidas de mayor cuantía han sido atribuidas a los virus (Kashina *et al.*, 2002), los

cuales además son considerados como una de las principales causas de las pérdidas en la producción de hortalizas, (Barba-de la Rosa *et al.*, 2003).

Entre los virus que se han encontrado en cultivos de jitomate se encuentra al virus del mosaico del pepino (CMV) el cual se ha asociado con mosaico intenso, reducción del crecimiento y pérdida de las flores; el virus del bronceado del tomate (TSWV) el cual ocasiona puntos o manchas necróticas que a veces afectan a los pecíolos y tallos además de reducción del crecimiento; el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) causante de la reducción de los folíolos y en ocasiones de amarillamiento, encurvamiento de las hojas y retardo en el crecimiento; el virus del mosaico del tomate (ToMV) cuyos síntomas son mosaico verde claro a verde oscuro, deformación foliar y crecimiento retardado; el virus Y de la papa (PVY) causante de manchas necróticas; el virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) que provoca clorosis y el amarillamiento fuerte en hojas apicales, además de necrosis en hojas, pecíolo y tallos; el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) el cual provoca que los brotes tengan los folíolos enrollados hacia el haz, clorosis marcada en su fase terminal y reducción del área foliar, tomando la forma de una cuchara (infoagro 2003); el virus de la clorosis infecciosa del tomate (TICV) el cual provoca un amarillamiento y clorosis internerval, además de enrollamiento foliar (Hartono *et al.*, 2003).

### **Estrategias para el control de la diseminación de las enfermedades virales**

Considerando que no se conocen tratamientos o compuestos químicos que logren contrarrestar las infecciones virales en las plantas, a la fecha solamente se emplean medidas tendientes a evitar la diseminación o para mitigar los daños ocasionados por los agentes virales tales como: uso de semillas libres de virus, marcaje, aislamiento o

eliminación de individuos afectados, control de hospederos alternos y vectores (insectos, hongos, nematodos etc.) Por lo que se han buscado y diseñado métodos para diagnosticar de manera rápida y eficiente a las enfermedades de origen viral y para establecer la naturaleza de los patógenos asociados. De esta manera se utilizan métodos que con base en la valoración visual de los síntomas ocasionados en especies vegetales específicas permiten establecer la naturaleza del patógeno, sin embargo y dado que síntomas similares pueden ser ocasionados por diferentes tipos virales, otros métodos utilizan pruebas moleculares sofisticadas para el diagnóstico preciso y rápido del tipo o tipos virales (Webster *et al.*, 2004). Utilizando esos métodos, desde hace años en México se realizan trabajos enfocados a caracterizar los virus que causan daños en las plantas de interés agrícola, sin embargo esos trabajos han resultado insuficientes dado que frecuentemente aparecen síntomas en plantas recién ingresadas a los campos mexicanos e inclusive aparecen síndromes novedosos en plantas tradicionalmente cultivadas que probablemente sean generados por aislamientos de reciente evolución o por mezclas virales que incrementan o modifican los síntomas producidos por infecciones simples (Perea-Araujo *et al.*, 2004).

## **Protocolos diseñados para el diagnóstico de enfermedades virales**

### **Plantas indicadoras y diferenciales**

La inoculación de diferentes especies de plantas con tejido infectado puede indicar si en un síndrome particular solamente está involucrado un tipo de virus, si al reinocular al hospedero original se produce el síntoma originalmente descrito, con esa finalidad, el tejido potencialmente infectado, macerado en soluciones amortiguadoras específicas, mezclado con una pequeña cantidad de carborundum u otro polvo que actúe como

abrasivo, es frotado en las hojas de las plantas indicadoras. Las plantas son mantenidas en condiciones controladas y son examinadas hasta la aparición de síntomas. Lesiones en las hojas inoculadas (locales) usualmente aparecen de 2 a 3 días post inoculación (dpi), los síntomas en los órganos no inoculados (sistémicos) generalmente tardan entre 8 y 15 días en aparecer y dependen del estado fenológico, de la variabilidad genética de la planta huésped y de las condiciones ambientales por lo que se ha establecido que la expresión de síntomas en plantas indicadoras constituye una vía precisa para la identificación de virus (Stevens, 1983).

### **Observación de partículas virales mediante microscopía electrónica**

La visualización directa de las partículas virales aporta una idea aproximada del tipo viral causante de los síntomas observados en las plantas, se pueden observar los viriones en extractos de tejido enfermo o en savia colocándolos en una rejilla de cobre cubiertas por una película de plástico y una capa de carbón. Las partículas virales, dado que son transparentes al haz de electrones son bañadas con una mezcla de sales de metales pesados como fosfotungstato de potasio (2%), acetato de uranilo (1%) o materiales similares con lo que se logra teñir las partículas virales (tinción negativa) y observar con detalle su estructura (Stevens, 1983).

### **Microscopía electrónica inmunoadsorbente**

En esta técnica se combinan las ventajas que tiene la microscopía electrónica para proporcionar una imagen estructural de las partículas y la capacidad de los anticuerpos para hibridar selectivamente con las moléculas para las que estos fueron diseñados; Las rejillas del microscopio electrónico son recubierta con carbón, enseguida es

colocada sobre una gota de antisuero en 10mM Tris-HCl, pH 7.4, durante 15min aproximadamente. La rejilla es lavada con 20 gotas de 10mM Tris-HCl, pH 7,4, y colocada sobre una gota de la suspensión viral parcialmente purificada. Cada rejilla es enjuagada con 15 gotas de 10mM Tris-HCl, luego 15 gotas de agua destilada, y por último 15 gotas de 2% fosfotungstato sódico conteniendo 100µg/mL de bacitracina (pH 7) finalmente es examinada al microscopio electrónico (Ahlawat *et al.*, 1996; Lockhart *et al.*, 1992).

#### **Detección de partículas virales mediante reacciones mediadas por anticuerpos (prueba serológica ELISA)**

Estas técnicas utilizan la capacidad de los anticuerpos para reconocer proteínas específicas, usualmente los anticuerpos se dirigen contra las proteínas de la cápside de los virus de interés, para lo cual los anticuerpos se fijan en una placa a la que se agrega un extracto de la planta potencialmente infectada. Si el virus de interés se encuentra en la planta, se ligará a los anticuerpos mientras que los virus que no hubieran sido reconocidos son lavados antes de que un segundo anticuerpo que reconoce y se une al primero sea agregado. El segundo anticuerpo evidencia al virus ya que posee una molécula reportera unida, normalmente una enzima que actúa sobre un sustrato modificando su color, la magnitud del cambio puede ser detectado visualmente o por espectrofotometría. El ensayo ELISA ofrece resultados rápidos, confiables y es muy práctico para diagnosticar la presencia de un virus en varias plantas, o bien para probar la misma muestra de planta utilizando diferentes anticuerpos con los que se detecte la presencia de varios virus además que calibrando de manera cuidadosa puede ser cuantitativo (Clark y Adams., 1977).

**Inmunoarreglos (TIBA)**

Esta técnica es similar a ELISA, la savia de plantas se coloca en una membrana de nitrocelulosa o nylon se adicionan anticuerpos que reconocen proteínas virales, el reconocimiento es detectado por sondas marcadas a menudo con quimioluminiscentes. El proceso es rápido, simple, tiene mayor sensibilidad y es menos laborioso que ELISA (Webster *et al.*, 2004).

**Microbalance con inmunosensores de cristal de cuarzo (QCM)**

En esta técnica, un disco de cristal de cuarzo es cubierto por anticuerpos específicos para un virus, se aplica determinado voltaje a través del disco haciendo que este se pandee ligeramente por un efecto piezoeléctrico. La adsorción de partículas virales a la superficie del cristal se detecta dado que cambia la frecuencia de oscilación de la resonancia de manera dependiente de la concentración (Eun *et al.*, 2002).

**Técnica de doble difusión en gel**

En esta técnica, se coloca agar en cajas petri, se hace un pozo en el centro donde se coloca el antisuero que se desea probar, alrededor de este se hacen más pozos donde se colocan las muestras con el virus. Las cajas son incubadas en una atmósfera húmeda a temperatura constante. Los virus difundirán en un anillo alrededor del pozo donde fueron colocados, mientras que el antisuero difundirá del pozo central hacia los pozos donde se colocaron las muestras con el virus. Si el virus es reconocido por el antisuero, este formará un precipitado en el agar y llegará a ser visible entre los dos pozos (Stevens, 1983). Esta técnica es laboriosa, sin embargo, es sensible y requiere de poca infraestructura para el diagnóstico.

### **Análisis del RNA de doble cadena**

Aproximadamente el 90% de los virus de plantas poseen genoma compuesto por RNA de cadena doble o sencilla, durante su replicación producen un intermediario de doble cadena considerado como una forma replicativa transitoria que puede ser aislado mediante cromatografía en columnas de celulosa CF-11 y utilizado para determinar la identidad del patógeno mediante una amplia gama de procedimientos dado que el RNA de doble cadena es muy resistente a la degradación enzimática. Esta técnica permite identificar a los virus de RNA incluso cuando forman mezclas o cuando están asociados a moléculas de RNA independientes del genoma viral (p.ej. RNA satélites, virus crípticos, etc.), no obstante, se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados (Valverde *et al.*, 1990).

### **Amplificación del genoma viral mediante reacciones de transcripción reversa acoplada a reacciones en cadena de la polimerasa RT-PCR**

La amplificación del genoma (RNA o DNA) son técnicas muy usadas para la detección e identificación de virus de plantas. Los procedimientos son sumamente sensibles aunque requieren de infraestructura material y humana especializada. En los virus de RNA primero se debe sintetizar una cadena de DNA complementaria (cDNA) a la secuencia nucleotídica del genoma del virus mediante una enzima transcriptasa reversa (RT) y oligonucleótidos que flanqueen una región del genoma viral. El cDNA es amplificado mediante PCR en la cual se utilizan los iniciadores específicos y una enzima polimerasa termoestable los cuales aumentan exponencialmente la concentración del fragmento de interés en una serie de pasos de extensión y desnaturalización (Sambrook y Russell, 2001).

Múltiples especies o fragmentos virales pueden ser detectados en una sola reacción utilizando mezclas de oligonucleótidos específicos para diferentes virus (RT-PCR multiplex). En esta alternativa es importante considerar que el tamaño de los fragmentos amplificados sea diferente y que los diferentes pares de oligonucleótidos tengan una temperatura de alineamiento semejante (Ito *et al.* 2002).

### **Inmunocaptura PCR (IC-PCR)**

En esta técnica, en la que se combina la captura de partículas virales por anticuerpos con la amplificación del genoma viral por PCR, el virus es adsorbido por un anticuerpo anclado a una superficie y posteriormente liberado con calor y los ácidos nucleicos son amplificados por RT-PCR. La captura selectiva de las partículas virales hacen a este método especialmente útil cuando la concentración del virus es baja o cuando existen compuestos que inhiben la PCR (Hema *et al.*, 2003).

### **Amplificación del genoma viral utilizando iniciadores anidados (Nested PCR)**

En este método se llevan a cabo dos reacciones de amplificación, la primera incrementa la cantidad de templado que será usado en la segunda reacción, en la cual se utilizan cebadores complementarios a una región interna del fragmento amplificado. Frecuentemente se utilizan oligonucleótidos de baja especificidad o degenerados en la primera reacción mientras que los segundos iniciadores normalmente poseen una secuencia específica. El método es útil cuando la concentración del virus es baja o cuando existen inhibidores de la DNA polimerasa en el extracto de la planta. (Dovas y Katis, 2003).

### **Amplificación ligada a restricción de fragmentos virales (RT-PCR-RFLP)**

Es un proceso que involucra la amplificación del genoma viral por RT-PCR seguido de su restricción para identificar polimorfismos entre virus basados. Para lo cual los fragmentos amplificados son sometidos a digestión enzimática y posteriormente analizados mediante separación electroforética. Este método puede usarse para diferenciar aislamientos sin clonar y secuenciar e incluso para diferenciar tipos virales estrechamente relacionados (Letschert *et al.*, 2002).

### **Protocolos basados en la complementariedad de los ácidos nucleicos**

La técnica de hibridación de los ácidos nucleicos es utilizada para la detección de virus en plantas en extractos de savia infecciosa o en extractos de insectos vectores de virus y se basa en la hibridación de los ácidos nucleicos determinada por la complementariedad entre las bases nitrogenadas. El grado de hibridación entre los ácidos nucleicos problema y la sonda se puede determinar utilizando nucleótidos marcados con radiactividad o por fluorescencia.

### **Hibridación en punto (Dot-blot)**

En esta prueba los ácidos nucleicos virales contenidos en extractos de plantas son colocados por goteo en puntos específicos de una membrana con cargas positivas (frecuentemente de nitrocelulosa) en la que son inmovilizados mediante radiación ultravioleta para posteriormente ser hibridados con sondas marcadas que incluyan todo el genoma viral o fragmentos de este. Comúnmente las sondas empleadas son de DNA aunque se pueden emplear sondas de RNA (Hull, 1986).

### **Clasificación de los virus**

Cerca del 90% de los virus que infectan plantas poseen un genoma de RNA y realizan su ciclo replicativo en el citoplasma; el 10% restante poseen un genoma de DNA y pueden replicarse en el núcleo de la célula hospedera (Mathews, 1991).

Considerando la naturaleza del genoma, las cadenas que lo componen, la polaridad y la capacidad de reverso transcripción, se han caracterizado 240 géneros, de los cuales 211 se encuentran clasificados dentro de 68 familias, los 29 restantes aún no han sido asignados a una categoría taxonómica mayor. Actualmente se han reconocido tres órdenes, los Caudovirales que incluyen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*; el orden de los Mononegavirales en el cual se encuentran incluidas las familias *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*; finalmente el orden de los Nidovirales que incluye a las familias *Coronaviridae* y *Arteriviridae*, al resto de las familias aún no se les ha considerado dentro de un nivel taxonómico superior (Mayo, 2002; Pringle, 1999).

### **Especies virales en los cultivos de jitomate y otras Solanáceas en México**

En 1974, Martínez *et al.* en Garzón (1987), consignan en México al virus del enanismo arbustivo (TBSV), encontrado en plantas de jitomate cultivadas en áreas del estado de Hidalgo, como describe Garzón (1987) en el campo se le asocia al síntoma de los “frutos pintos”, éste se caracteriza por ocasionar anillos de color amarillo de uno a dos centímetros de diámetro en cualquier parte del fruto. En 1995, Hernández *et al.*, mediante el uso de plantas indicadoras, inclusiones celulares, microscopía electrónica y pruebas serológicas (ELISA) diagnosticaron la presencia de los virus TMV, TEV, TRSV y PEV en muestras de jitomate, chile y algunas malezas de las áreas hortícolas

provenientes de nueve localidades del estado de Yucatán. Por otra parte, en cultivares de Sinaloa se han detectado algunos geminivirus, a finales de la década de los 1990 se detectó el virus huasteco del chile (PHV) en la mayoría de las infecciones mixtas en todas las regiones tomateras del estado junto con especies virales que previamente habían sido reportadas en el estado de Sinaloa; por lo que se sugirió que el PHV recién se había adaptado a este cultivo y estaba formando nuevos complejos y generando síndromes no reportados y desplazando especies previamente reportadas (Ruiz-Medrano y Rivera-Bustamante, 1997). Urias y Alejandre, 1999; Torres *et al.*, 1996, en De la Torre *et al.*, en el 2002, asocian a los geminivirus con numerosas enfermedades en cultivos de importancia económica. En los estados de Morelos, Puebla y el Estado de México, Méndez-Lozano *et al.*, (2001); De la Torre *et al.*, (2002) en Barreras-Soto *et al.*, (2004) asocian al cultivo de tomatillo con el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del jaspeado del tomate (TEV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV) y los geminivirus virus del mosaico dorado del chile (PepGMC) y virus huasteco del chile (PHV).

En el 2004 Martínez-Ramírez *et al.*, usando la prueba serológica DAS-ELISA con 70 antisueros para virus que afectan solanáceas identificaron 12 virus en cultivos de jitomate en los estados de Michoacán y Jalisco, así determinaron a los virus PRSV, TMV, PVY, ToRSV TRSV, PMMoV, CMV, PLRV, ToMV, WMV2 Y TAV. Por otro lado, Barreras-Soto *et al.*, (2004), reportaron la susceptibilidad de los cultivares de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) a los virus CMV, TSWV, TEV, PVY, AMV y geminivirus en el estado de Sinaloa, mientras que Perea-Araujo *et al.*, (2004) identificaron en ese mismo estado y en cultivos de jitomate, a los virus TMV, CMV,

TSWV, PVY y al TEV, con la prueba serológica DAS-ELISA, así mismo, por hibridación tipo dot blot y amplificación por PCR, detectaron la presencia de geminivirus tanto en jitomate como en malezas que se encontraban cercanas a este cultivo, estableciendo que frecuentemente las plantas infectadas existían asociaciones o complejos virales.

## **JUSTIFICACIÓN**

Dados los daños ocasionados por las enfermedades de origen viral en la producción de jitomate, y la importancia alimenticia y comercial de este cultivo, en este trabajo se realizó la caracterización biológica y molecular parcial de los virus asociados a plantas de *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown colectadas en Atlixco, Puebla que inducen un síntoma severo de amarillamiento y deformación foliar en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar y caracterizar parcialmente a los virus asociados a *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown causantes de síntomas severos de amarillamiento y deformación foliar de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Aislar y determinar a los virus presentes en plantas de jitomate con amarillamiento y deformación foliar mediante la inoculación mecánica de plantas indicadoras y diferenciales.

Amplificar fragmentos virales utilizando oligonucleótidos parcialmente degenerados y RNA total o de doble cadena extraído de plantas con síntomas de virosis.

Recombinar y clonar los fragmentos amplificados en plásmidos bacterianos comerciales.

Analizar las secuencias nucleotídicas de los fragmentos clonados.

Hacer inferencia de las relaciones filogenéticas con las secuencias virales obtenidas de plantas con amarillamiento y deformación foliar de jitomate.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención, aislamiento y conservación del material biológico**

Se colectaron muestras de plantas de *Leonotis neoetaefolia* (L.) R. Brown, en el Valle agrícola de Atlixco, Puebla con síntomas severos de amarillamiento y deformación foliar, se trasladaron al laboratorio y fueron usadas para la inoculación mecánica de plántulas de jitomate y otras especies, las cuales fueron mantenidas en condiciones de invernadero durante un periodo aproximado de un mes. Para mantenimiento del inóculo fresco, se inocularon mecánicamente plantas de jitomate jóvenes frotando las hojas cotiledonales con un macerado de hojas de plantas con síntomas.

### **Caracterización biológica por medio de plantas indicadoras y diferenciales**

Se maceraron hojas de plantas de jitomate con síntomas en una solución amortiguadora de fosfatos DIECA 0.025 M. pH 7.2, las hojas cotiledonales y las primeras hojas verdaderas de las plantas indicadoras fueron espolvoreadas con tierra de diatomita y frotadas con el macerado mediante un hisopo. Las especies vegetales utilizadas para el aislamiento y determinación fueron agrupadas en conjuntos con al menos 5 plantas de las siguientes especies: *Lycopersicon esculentum* Mill. variedades Río grande (RG) y Floradade (FD), *Physalis ixocarpa* Brot., *Capsicum annum* L., *Datura stramonium* L., *Cucumis sativus* L., *Cucúrbita pepo* L., *Leonotis nepetaefolia* (L.) R. Brown., *Nicotiana tabacum* L. var. xhanti, *N. tabacum* L. var. rustica, *N. tabacum* L. var. occidentalis, *Chenopodium amaranticolor* L., *C. quinoa* L. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta la aparición de síntomas virales o durante aproximadamente 30 días (Matthews, 1991).

**Extracción de RNA total**

El RNA total de plantas fue extraído siguiendo el método de Logemann *et al.*, (1987). Un gramo de tejido vegetal fue molido utilizando nitrógeno líquido en morteros estériles hasta obtener un polvo fino, se agregaron 2 mL de buffer de extracción (Cloruro de Guanidina 8M, MOPS, 50 mM), la mezcla se homogenizó y fue transferida a tubos eppendorf (0.7 mL de la mezcla por tubo), se les agregó 750  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitaron vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea la cual fue centrifugada a 13000 rpm (8000 x g) a 4° C durante 45 min. El sobrenadante fue transferido a un tubos eppendoff estériles, se agregó 750  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 13000 rpm a 4° C durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado, se le agregó 0.7 volúmenes de etanol absoluto y 0.2 volúmenes de ácido acético 1M y la suspensión se mezcló y almacenó a -70°C toda la noche. Posteriormente la mezcla se descongeló en hielo, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 min, se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 1 mL de acetato de sodio (3M pH 5.2), posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4° C durante 5 min. La pastilla fue lavada dos veces agregándole 500  $\mu$ l de etanol 70% y centrifugándola a 13000 rpm durante 5 min, posteriormente el RNA fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 100  $\mu$ l de agua con DEPC estéril, almacenándolo a -70°C hasta su uso.

Las muestras de RNA total fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.6% con formaldehído 2.2 M y corridas con buffer (MOPS 0.02 M, pH 7.0, Acetato de Sodio 8 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0) a temperatura ambiente. Previamente, se mezcló de 1 a 4  $\mu$ l de la suspensión de RNA con un buffer desnaturalizante (MOPS 5X:

formaldehído: formamida en proporción 2.0:3.5:10  $\mu$ l respectivamente), se incubaron a 65°C durante 10 min y se enfriaron rápidamente en hielo, se agregó 2  $\mu$ l de buffer de carga (Glicerol 50%, EDTA pH 8.0, Azul de bromofenol 0.25%, Xilen-cianol FF 0.25%) y se homogenizó la mezcla que fue separada por electroforesis a 50-60 V en los geles desnaturalizantes antes descritos (Sambrook y Russell, 2001).

### **Extracción de RNA de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>)**

La extracción se realizó a partir de 3.5 gr de tejido vegetal macerado con nitrógeno líquido en mortero estéril, el polvo fue transferido a un tubo de centrifuga de 50 mL, se agregó 8.0 mL de buffer STE 1X (NaCl 0.1 M, Tris 0.05 M., EDTA 0.001 M a pH 8.0), 0.5 mL de bentonita al 2% p/v, 1 mL de SDS 10% y 9 mL de fenol preequilibrado con STE 1X, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. De la fase acuosa se recuperaron 10 mL, se adicionaron 2.1 mL de etanol al 95% para ser posteriormente almacenada a 4°C durante 12 h. Al cabo, se realizaron dos ciclos de separación por cromatografía en columnas de celulosa CF-11 (Sigma Aldrich, St. Louis MO) con la finalidad de eliminar RNA de cadena sencilla, polisacáridos y proteínas contaminantes. Para lo que se mezcló 1 g de celulosa en 25 mL de STE 1X con 16% de etanol (v/v), se vertió en una columna de plástico y se permitió que todo el líquido drenara para añadir posteriormente la muestra lavándola al menos 2 veces con 40 mL de STE 1X con 16% de etanol. Una vez lavada la columna, se añadió 2.5 mL de STE 1X, se desechó el líquido drenado y se agregaron 10 mL del mismo buffer, esta vez el líquido drenado fue colectado en un tubo de centrifuga de 50 mL y se le agregó 2.1 mL de etanol inmediatamente después se realizó un segundo

ciclo de separación cromatográfica idéntico al descrito anteriormente, descontando que, al final sólo se colectaron 6 mL del STE 1X, a los que se añadió 0.5 mL de acetato de sodio 3M, 20 mL de etanol 96% y se almacenaron durante 12 h a  $-20^{\circ}$  C. Esa mezcla fue centrifugada a 10000 rpm ( $6000 \times g$ ) durante 25 min, el precipitado se secó a temperatura ambiente para ser posteriormente resuspendido en 200  $\mu$ l de agua bidestilada y estéril y almacenado a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso (Valverde *et al.*, 1990). El RNAdc fue analizado por separación electroforética en geles de agarosa al 1% a 80 V durante 1.5 h.

### **Diseño de oligonucleótidos para amplificar fragmentos virales**

Se diseñaron oligonucleótidos parcialmente degenerados para amplificar fragmentos de los genes de las proteínas del movimiento y de la cápside de diferentes aislamientos virales distribuidas en distintas partes del mundo y depositadas en el GenBank, las cuales fueron sometidas a un alineamiento múltiple con el software ClustalX 1.83 para Windows (Thompson *et al.*, 1997), mediante inspección visual, se seleccionaron sitios conservados en las secuencias para poder sintetizar los distintos iniciadores u oligonucleótidos.

### **Amplificación de fragmentos virales por reacciones de reversotranscripción (RT-PCR) acoplada a PCR**

Se utilizó el RNAdc y RNA total extraído de plantas de jitomate con síntomas en reacciones de Reverso Transcripción seguidas de reacciones de PCR con oligonucleotidos parcialmente degenerados, las condiciones óptimas fueron establecidas mediante reacciones de PCR utilizando un gradiente de temperaturas. El

DNA complementario fue sintetizado utilizando la enzima Reverso Transcriptasa Super Script II RNAsa H<sup>-</sup> (Gibco BRL), 1 a 5µg de RNA total y se les adicionó 1 µl de oligonucleótido directo (10 µM) y 1 µl del reverso (10 µM), la mezcla se incubó durante 10 min a 65°C, al cabo, se transfirió rápidamente a hielo y se incubó durante 5 min, posteriormente se agregó 4 µl de Buffer de primera cadena (5X: Tris HCl 250 mM pH8.3, KCl 375 mM, MnCl<sub>2</sub> 15 mM) y 2 µl de DTT 0.1 M esta mezcla se homogenizó suavemente y se incubó a 42°C durante 90 min.

Para la amplificación del cDNA por PCR se utilizó una Taq polimerasa comercial (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 1 µl del producto de la reacción de reverso transcripción, 5 µl de buffer de PCR (Tris HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), 1.5 µl de MnCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, y 41.5 µl de agua bidestilada estéril. Las reacciones se incubaron en un Termociclador Biometra (Goettingen, Alemania) con programas que incluyeron un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95° C y 25 ciclos con las temperaturas de alineamiento y extensión que se indican en el apartado de resultados.

### **Purificación de productos de PCR**

Los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando un sistema comercial de Qiagen (Qiagen), se escindió el fragmento del gel con la banda deseada, se adicionaron 5 volúmenes de buffer de solubilización, se agitó vigorosamente hasta que el gel se licuara, la mezcla homogenizada se depositó en una columna plástica con membrana de sílica gel la cual a su vez se colocó en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 6500 rpm (4000 x g) durante 60 seg. La columna fue lavada dos veces

depositando 0.75 mL de Buffer PE o solución de lavado y centrifugándola durante 60 seg a 6500 rpm, enseguida se eliminó el buffer PE residual centrifugado durante 2 min a 13000 rpm; una vez seca la membrana, se le depositó 40  $\mu$ l de agua bidestilada estéril, se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad y el fluido se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Preparación de células competentes**

Colonias aisladas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  fueron cultivadas en 10 mL de medio Luria en agitación constante a 37°C durante toda la noche, con 5 mL de ese cultivo se inocularon 30 mL del mismo medio y se incubó a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.3 a 600 nm. Posteriormente, con 5 mL de este segundo cultivo se inocularon 200 mL del mismo medio e incubadas en las mismas condiciones hasta que alcanzó una D.O. de 0.3 a 600 nm, se transfirió a tubos estériles de 50 mL para centrifuga, se centrifugó a 4000 rpm (2500 x g) durante 10 min, la pastilla fue resuspendida en 16 mL de buffer (RbCl 100mM, MnCl<sub>2</sub> 50mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y Glicerol 15% w/v) y se incubó en hielo durante 45 min. Al cabo, las células fueron nuevamente compactadas centrifugándolas a 4000 rpm a 4°C durante 5 min, el botón celular fue resuspendido en 5 mL de Buffer 2 (RbCl 10mM, MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75mM, Glicerol 15% w/v, pH 6.8) e incubado en hielo por 10 min, finalmente, se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ l en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

### **Ligación de fragmentos en vectores bacterianos y transformación de células bacterianas**

Los fragmentos obtenidos por RT-PCR fueron ligados a los vectores bacterianos pDRIVE (Quiagen) y pCR 4-TOPO (In vitrogen) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, se transformaron células competentes (cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ ): los viales con células fueron descongeladas en hielo y se les adicionó la suspensión de plásmidos recombinantes (20 ng de DNA aproximadamente), se agitó suavemente y se mantuvieron en hielo durante 30 min, posteriormente se sometieron a un choque térmico incubándolas a 42°C durante 90 seg, inmediatamente después, se trasladaron nuevamente al hielo donde se les mantuvo durante 2 min, transcurridos se adicionó 800  $\mu$ l de medio Luria y fueron incubadas durante 1.5 h a 37°C. Después, las células se compactaron mediante 1 min de centrifugación a 4000 rpm, se desechó dos tercios del sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en el medio remanente. La suspensión fue distribuida y esparcida uniformemente en medio Luria sólido suplementado con Ampicilina o Kanamicina (50  $\mu$ g/mL), IPTG (100  $\mu$ g/mL) y Xgal (1.6 mg/mL). Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 16 h, posteriormente se seleccionaron las colonias candidatas a contener plásmidos recombinantes (Sambrook y Russell, 2001).

### **Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de *E.coli* transformadas**

Las colonias candidatas positivas fueron cultivadas en 3 mL de medio TB con 50  $\mu$ g/mL de ampicilina en agitación constante durante 12 h a 37°C; las células fueron compactadas por centrifugación a 6000 rpm durante 60 seg, la pastilla fue resuspendida

en 100  $\mu$ l de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8.0), a esa suspensión se añadió 200  $\mu$ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 0.1%), la mezcla se incubó en hielo durante 10 min mientras se lisaban las células, al cabo, la mezcla fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante en un tubo estéril y se agregó 1  $\mu$ l de RNAsa A, esta suspensión fue incubada durante 1 h a 37°C, se adicionaron 450  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente y se centrífugo durante 10 min a 13000 rpm, la fase superior fue recuperada y transferida a otro tubo estéril, adicionándole 350  $\mu$ l de isopropanol e incubándola a -20° C durante 10 min. Después se centrífugo la suspensión a 13000 rpm durante 10 min y la pastilla fue lavada con etanol al 70% tres veces (Sambrook y Russell, 2001). La presencia del inserto fue verificada mediante la digestión del plasmido candidato con enzimas de restricción (ECO RI), el producto de la digestión fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los plásmidos con el inserto fueron secuenciados, en un secuenciador modelo 3100 Genetic analyzer de 16 capilares ubicado en el Laboratorio de análisis y química del DNA de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala UNAM.

### **Hibridación molecular Dot blot**

La integridad y concentración del RNA total fue determinada mediante separación electroforética en geles desnaturizantes de agarosa, una vez normalizadas las concentraciones de RNA fue desnaturizado mediante incubación a 65°C durante cinco minutos en una solución desnaturizante (MOPS 5X: formaldehído: formamida en proporción 2.0:3.5:10  $\mu$ l respectivamente), enfriado en hielo y depositado por goteo en

una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham, Biosciences) y entrecruzado mediante radiación U.V. (260nm) durante 4 min (Sambrook y Russell, 2001).

Antes de hibridar el RNA con sondas radiactivas, las membranas fueron bloqueadas con solución de hibridación (Albúmina de suero de bovino 1%, EDTA 1 mM, Buffer de fosfatos 0.5 M, SDS 7% w/v) por lo menos durante 2 h a 65°C, posteriormente se añadió la sonda desnaturalizada marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP. Las sondas con marcaje radiactivo fueron sintetizadas mediante reacciones de PCR utilizando como molde los plásmidos recombinantes, los iniciadores utilizados para amplificar el fragmento de 250 pb y el programa para este. A esta reacción se adicionaron dATP, dTTP, dGTP y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP a una concentración final de 10 mM, el producto de la reacción fue desnaturalizado mediante calentamiento a 95°C durante 5 min, se enfrió inmediatamente en hielo y se añadió a las membranas; la incubación continuó durante 12 h. Al cabo, se retiró la solución con la marca radiactiva, se realizaron cuatro ciclos de lavado: dos con SSC 2X y dos con SSC 0.1X durante 30 min a 65°C, finalmente, la membrana fue cubierta con papel celofán, colocada en un cartucho de exposición sobre película fotográfica y mantenida a -80°C hasta su revelado.

### **Comparación de las secuencias en las bases de genes (GenBank)**

Los plásmidos recombinantes fueron sometidos a reacciones de secuenciación al menos en dos ocasiones, los sitios ambiguos fueron editados manualmente mediante la revisión de los electroferogramas y la secuencia resultante fue traducida mediante el software DNAMAN para Windows versión 3.0 (Lynnon Corporation, 1997) a fin de establecer su homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos

mediante los programas Blastn y Blastp disponibles en National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.org>) hasta el mes de marzo del 2005. Las secuencias potencialmente homólogas con los números de expectativa menores fueron descargadas y usadas para establecer las relaciones filogenéticas del aislamiento viral mexicano.

### **Análisis filogenético de los aislamientos virales**

Se obtuvieron del GenBank las secuencias del gene de la proteína del movimiento y de la capsida de las diferentes variantes de las especies de tobamovirus *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* (cgmm), *Frangipani mosaic tobamovirus* (fm), *Kyuri green mottle mosaic tobamovirus* (kgmm), *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (or), *Paprika mild mottle tobamovirus* (pmm), *Pepper mild mottle tobamovirus* (pemmm), *Ribgrass mosaic tobamovirus* (rm), *Tobacco mild green mosaic tobamovirus* (tmgm), *Tobacco mosaic tobamovirus* (tm), *Tomato mosaic tobamovirus* (tom), los alineamientos múltiples base para el análisis filogenético fueron realizados con el programa ClustalX 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) utilizando la matriz IUB tanto para los alineamientos pareados como para los múltiples, la penalización por la apertura y extensión de los gaps se mantuvo con los valores asignados por default, los alineamientos óptimos fueron seleccionados con base en la suma de pares obtenida con el programa GeneDoc (ver 2.6.002) para Windows (Karl, B. N. y Hugh B. Jr. 1997).

Los árboles filogenéticos construidos con base en distancia genética fueron procesados mediante los modelos de sustitución nucleotídica sugeridos por Modeltest 3.6 (Posada y Crandall, 1998) con base en el valor mínimo del criterio de información de Akaike (AIC). Los agrupamientos fueron realizados mediante el método del vecino más

cercano, sometidos a una prueba estadística de bootstrap con un mínimo de 1000 repeticiones, finalmente, las relaciones apoyadas por valores de bootstrap menores al 50% fueron colapsadas.

Los árboles construidos con el método de máxima parsimonia fueron procesados con el programa PAUP 4.10b for 32 bit Microsoft Windows (D.L.S. Swofford, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA) utilizando una búsqueda heurística con la adición 100 réplicas al azar y un máximo de 1000 árboles por replica. La aproximación al árbol subóptimo se realizó con base en el índice de consistencia obtenido a partir del análisis de los árboles más parsimonosos. En este análisis se consideró una prueba estadística basada en bootstrap con 1000 repeticiones, el árbol consenso se obtuvo mediante la regla de la mayoría en el cual las ramas con un apoyo de bootstrap menor al 50% fueron colapsadas.

### **Análisis de restricción *in silico***

Con las secuencias de los genes de las proteínas del movimiento y de la cápside del aislamiento Mx y de secuencias consenso de virus obtenidas a partir de diferentes aislamientos depositados en el GenBank, fueron sometidos a un análisis de restricción *in silico* utilizando el software DNAMAN para Windows versión 3.0 (Lynnon Corporation, 1997).

## RESULTADOS

### Caracterización biológica por medio de plantas indicadoras y diferenciales

Las plantas de jitomate con síntomas severos de amarillamiento y deformación foliar, fueron utilizadas para inocular conjuntos de plantas de diversas especies las cuales fueron mantenidas en invernadero bajo observación por un periodo de aproximadamente 30 días. Los síntomas en las plantas indicadoras y diferenciales (Figura 1) fueron en *L. esculentum* variedades Floradade, Río Grande y *C. annuum* amarillamiento y deformación foliar, en plantas de *P. ixocarpa* se observó deformación, clorosis y amarillamiento foliar y en otras un mosaico verde amarillo ligero, en plantas de *N. tabacum* var. rústica, el síntoma fue deformación foliar con clorosis, mientras que en las variedades occidentalis y xanthi apareció moteado foliar amarillo y abultamientos en las hojas, en plantas de *C. amaranticolor* se indujeron puntos cloróticos, mientras que las plantas de *C. quinoa*, *D. stramonium*, *C. pepo*, *C. sativus* y *L. nepetaefolia* no mostraron síntomas evidentes de virosis después de 30 dpi (cuadro 1).

Cuadro 1. Síntomas de plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con savia de jitomate con síntomas.

Especie	Síntoma
<i>L. esculentum</i> var. Río grande	Amarillamiento y deformación foliar
<i>L. esculentum</i> var. Floradade	Amarillamiento y deformación foliar
<i>Physalis ixocarpa</i>	Amarillamiento, clorosis y deformación foliar / Ligero mosaico verde amarillo
<i>Capsicum annuum</i>	Amarillamiento y deformación foliar
<i>Datura stramonium</i>	No mostró síntomas
<i>Cucúrbita pepo</i>	No mostró síntomas
<i>Cucumis sativus</i>	No mostró síntomas
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	No mostró síntomas
<i>N. tabacum</i> var. xanthi	Moteado amarillo foliar
<i>N. tabacum</i> var. rustica	Deformación y puntos cloróticos
<i>N. tabacum</i> var. occidentalis	Ligero moteado amarillo foliar
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Puntos cloróticos
<i>C. quinoa</i>	Puntos cloróticos

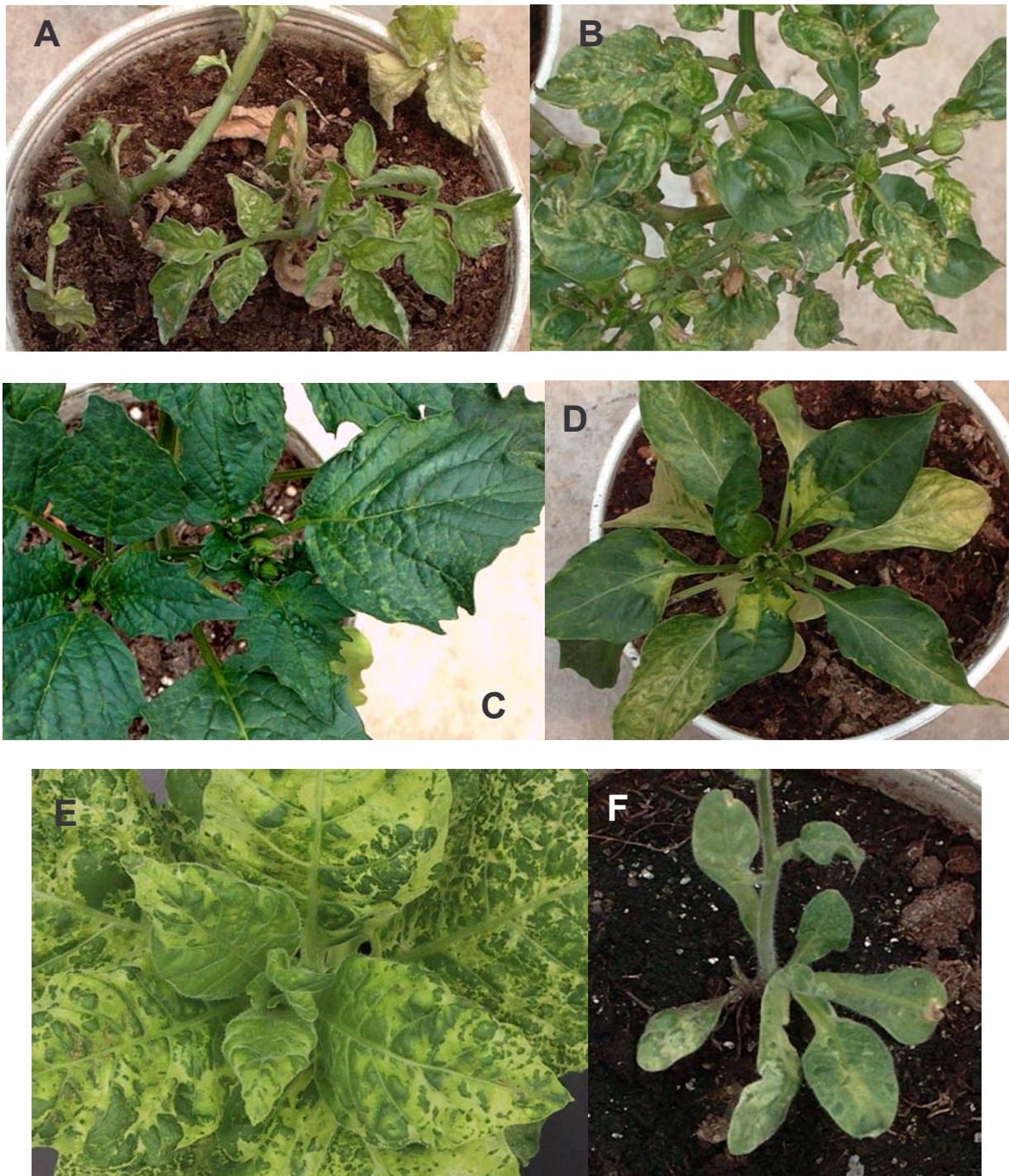


Figura 2

Síntomas inducidos en plantas indicadoras inoculadas con savia infectiva de plantas de jitomate. A) y B) Deformación y amarillamiento foliar en *L. esculentum* var. Río Grande y *P. ixocarpa* respectivamente, C) Mosaico verde amarillo en *P. ixocarpa*, D) Amarillamiento foliar en *C. annuum*, E) Moteado amarillo en *N. tabacum* var. xanthi, F) Moteado amarillo ligero en *N. tabacum* var. occidentalis.

### Extracción de RNA total

Se obtuvo el RNA total de las plantas de jitomate con síntomas de amarillamiento y deformación foliar colectadas en el campo así como de las plantas indicadoras y diferenciales inoculadas y mantenidas en invernadero, la integridad y concentración fue verificada mediante separación electroforética en geles desnaturizantes de agarosa (Figura 3).

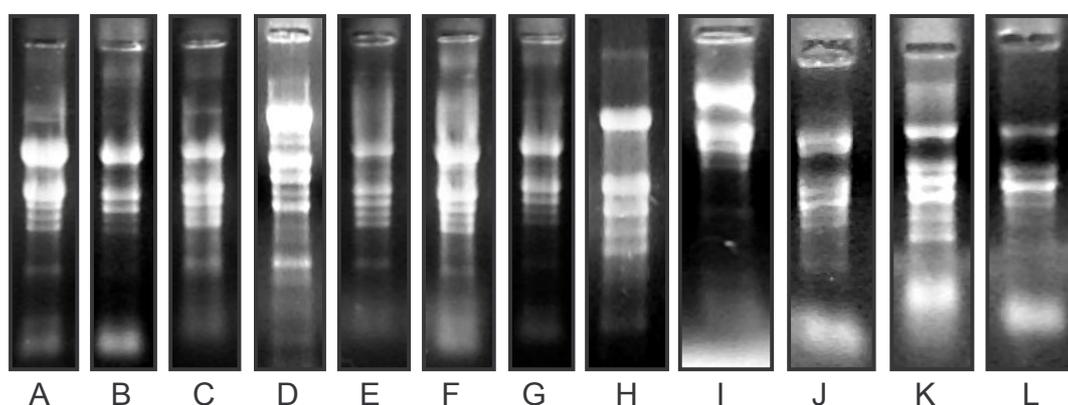


Figura 3  
RNA total de plantas de jitomate con síntomas y plantas indicadoras separado por electroforesis en geles de agarosa (1%). Panel A y B RNA total de plantas de jitomate variedad Río Grande y Floradade con síntomas; C, *P. ixocarpa* síntomas severos; D, *P. ixocarpa* síntomas ligeros; E, *C. anuum*; F, *D. stramonium*; G, *N. tabacum* variedad rustica; H, *N. tabacum* var. xanthi; I, *C. amaranticolor*; J, *C. quinoa*; K, *L. nepetaefolia* y L, *C. sativus*

### Extracción de RNA de doble cadena

A partir de las plantas enfermas colectadas en el campo, se extrajo el RNA de doble cadena y se separó mediante corrimiento electroforético, el perfil de corrimiento reveló una banda abundante de RNA de aproximadamente 5000 pares de bases y otras bandas menos abundantes de menor tamaño (1500, 650 y 500 pb) (Figura 4).

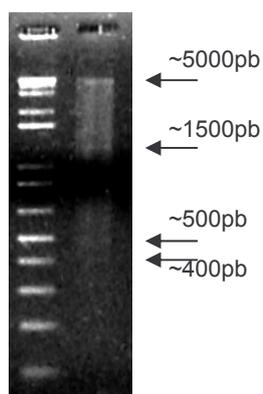


Figura 4  
Patrón de corrimiento electroforético del RNA de doble cadena extraído de plantas de jitomate con síntomas asociados a virosis.

### Diseño de oligonucleótidos para amplificar fragmentos virales

Con base en alineamientos múltiples de secuencias de Tobamovirus obtenidas del banco de genes se diseñaron oligonucleótidos parcialmente degenerados. En el cuadro 2 se indican las secuencias nucleotídicas, se incluye la secuencia del iniciador diseñado por Letschert *et al.*, 2002 para diferenciar a ToMV y utilizado en este trabajo así como el reverso. En la Figura 5 se representa parte del genoma de un virus del género Tobamovirus y se indican los sitios blanco y la dirección en que amplificaría cada oligonucleótido.

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar por RT-PCR fragmentos virales.

Nombre	5'	Secuencia	3'	TM
TMV CP 5'		GCNYTNGGNAAYCARTTYCARACNCARCAR		52 °C
TMV CP 3'		NGCRTCNRNAGTYTCNGCNGTNGTNGGRTT		52 °C
ToMTM MP 5'		ATGGCTCTAGTTGTTAAAGGWAARGTRAATAT		53 °C
ToMTM CP 3'		TCTAAWACYGCATTGTACCTRTACACCTTA		53 °C
TTToM CP 3'		AGWTGCAGGWSCAGAGGTCCAWACCAAMCCAG		53 °C
Letschert 5'		CGGAAGGCCTAAACCAAAAAG		53 °C
Letschert 3'		CTTTTTGGTTTAGGCCTTCCG		53 °C

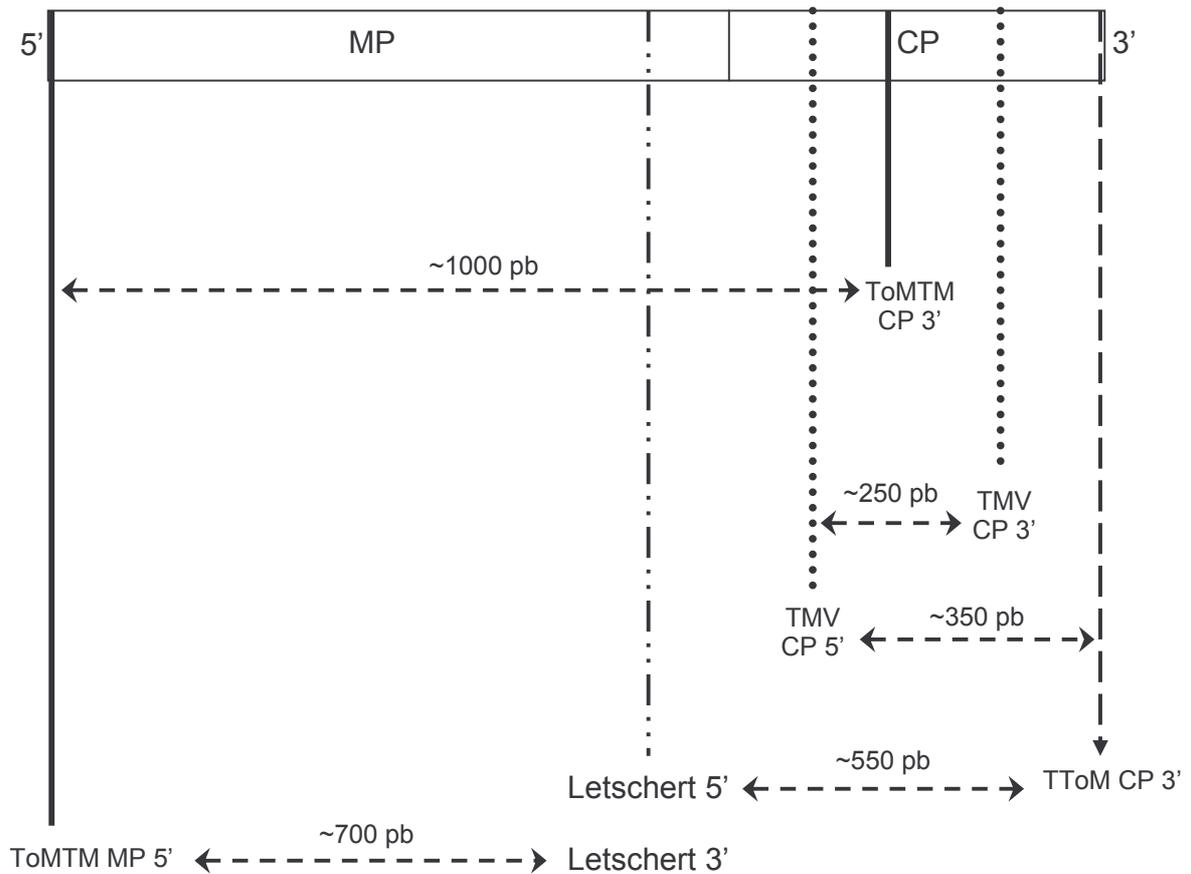


Figura 5  
 Fragmento del genoma de un Tobamovirus correspondiente a los genes de las proteínas del movimiento y de la cápside. Se indican los sitios blanco para los oligonucleótidos y el tamaño del fragmento esperado.

### Amplificación de fragmentos virales

A partir del RNA de doble cadena se amplificó por RT-PCR un fragmento de aproximadamente 250 pb utilizando los oligonucleótidos TMV CP 5' y TMV CP 3' (Figura 6).

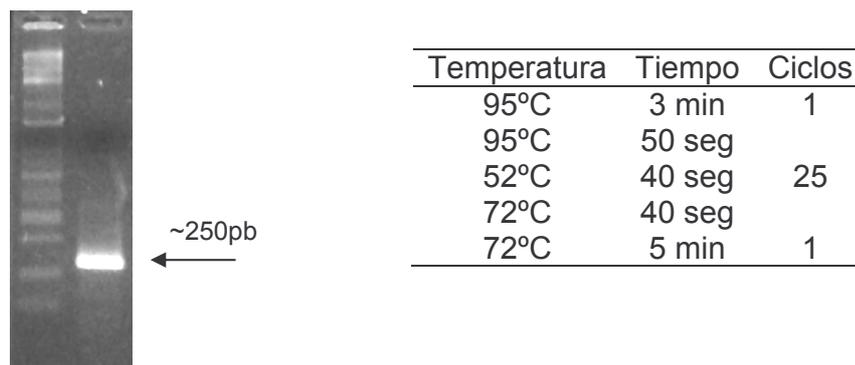
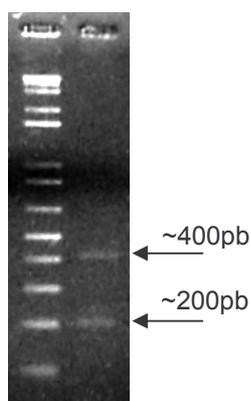


Figura 6  
Perfil electroforético de producto de RT-PCR de aproximadamente 250 pb, fragmento TMV CP. Se muestran también las condiciones de amplificación empleadas.

Esperando amplificar algún fragmento viral, se utilizó el RNA de doble cadena, con el que se realizaron reacciones de RT-PCR empleando oligonucleótidos al azar (5'NNNNNNNN), el perfil electroforético del producto de PCR muestra por lo menos dos bandas, una con un peso de aproximadamente 200 pb y otra con aproximadamente 400 pb (Figura 7).



Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	40 seg	
37°C	40 seg	30
72°C	90 seg	
72°C	5 min	1

Figura 7

Patrón electroforético de producto de RT-PCR a partir de RNAdc con oligonucleótidos al azar. En el recuadro adjunto se indican las condiciones de amplificación empleadas.

Como resultado de las reacciones de secuenciación de los plásmidos portadores del fragmento de aproximadamente 400 pb amplificado a partir de RNAdc con oligonucleótidos al azar se obtuvo una secuencia de 464 nucleótidos, los cuales al predecir la secuencia aminoacídica a partir de tres diferentes marcos de lectura, presenta codones de paro, al llevar a cabo la comparación heurística de esta secuencia, se encontraron los mayores valores de identidad (97%) y de expectativa (0.0) con una secuencia del genoma del cloroplasto de *Nicotiana tabacum* y con valores de identidad y expectativa menores con secuencias del genoma de cloroplasto de otras especies.

Por otro lado, a partir del RNA total de plantas de jitomate enfermas se amplificó un fragmento de aproximadamente 1000 pb utilizando los oligonucleótidos ToMTM MP 5' y ToMTM CP3', las condiciones óptimas de amplificación fueron determinadas utilizando inicialmente un gradiente de temperatura (Figura 8).

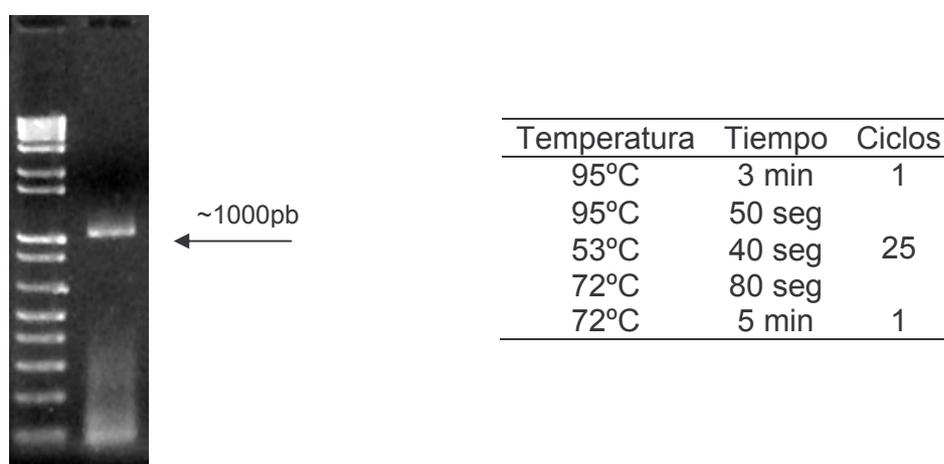


Figura 8  
 Producto de RT-PCR utilizando RNA total de plantas de jitomate enfermas y los iniciadores ToMTM MP 5' y ToMTM CP 3'. Se indican también las condiciones empleadas en la reacción de amplificación.

Adicionalmente, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 350 pb a partir de RNA total de plantas de jitomate con síntomas empleando los oligonucleótidos TMV CP 5' y TToM CP 3' con el cual se completó la secuencia correspondiente al gen CP, el producto final y las condiciones de amplificación, se muestran en la Figura 9.

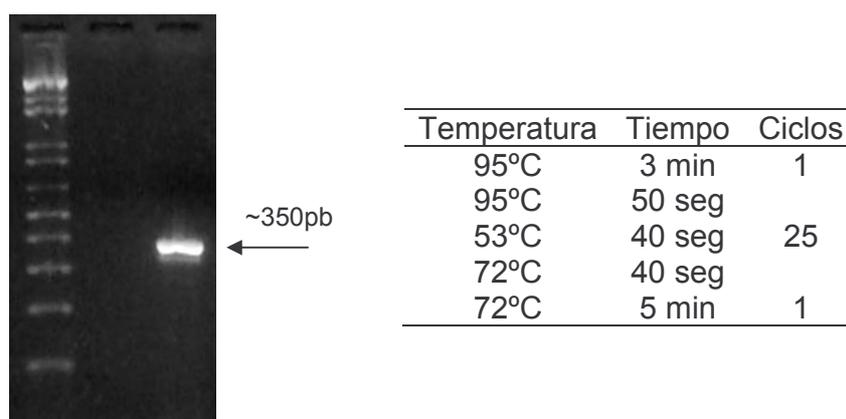


Figura 9  
 Producto de RT-PCR a partir de RNA total de plantas de jitomate con síntomas utilizando los oligos TMV CP 5' y TToM CP3'. Fragmento TToM CP. Se muestran en el recuadro de la derecha las condiciones de amplificación.

Dado que las evidencias biológicas dejaban abierta la posibilidad de la presencia de más de un tipo viral en las plantas de jitomate con síntomas, se realizaron reacciones de amplificación utilizando los oligonucleótido diseñado por Letschert *et al.*, 2002 y el TToM CP 3' diseñado en este trabajo, el perfil electroforético del producto de esta reacción se muestra en los carriles 1 y 2 de la Figura 10, se observan bandas de aproximadamente 550 pb, otra con una concentración menor de aproximadamente 350 pb, así mismo se observan bandas probablemente no específicas con pesos moleculares mayores y concentraciones menores; empleando el oligonucleótido "Letschert *et al.*, 2002 reverso" en combinación con el ToMTM MP 5', se logró amplificar

un fragmento de aproximadamente 850 pares de bases, así como otros cuyas concentraciones son menores y probablemente correspondan a fragmentos no específicos (Figura 9 carriles 3 y 4).

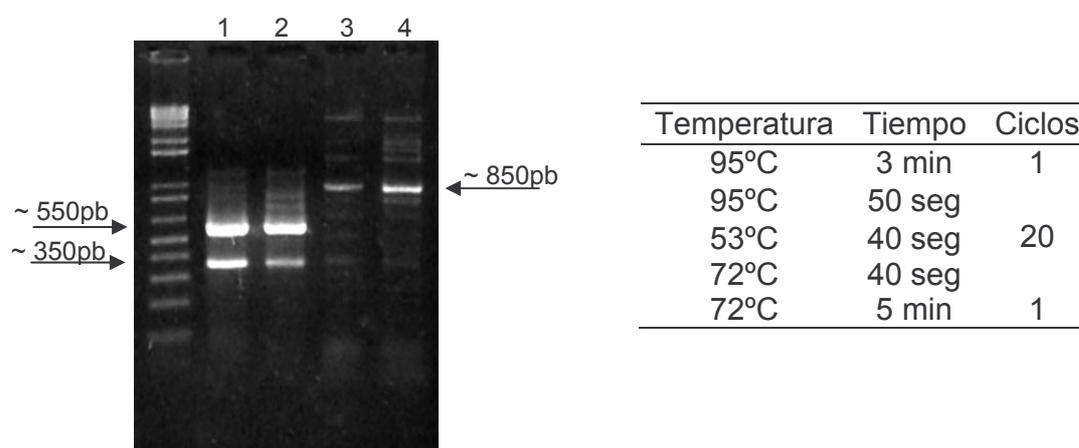


Figura 10  
 Producto de RT-PCR a partir de RNA total de plantas de jitomate con síntomas empleando oligonucleotidos específicos para ToMV. Carriles 1 y 2 producto sintetizado con Letschert 5' y TToM CP 3', carriles 3 y 4 producto sintetizado con Letschert 3' y ToMTM MP 5'. En el cuadro de la derecha se indican las condiciones de amplificación empleadas.

**Detección de TMV en plantas de jitomate e indicadores mediante hibridación en punto con sonda radiactiva**

Utilizando el RNA total de plantas de jitomate con síntomas así como el de las plantas indicadoras se realizaron ensayos de hibridación tipo Dot-blot empleando como sonda el fragmento TMV CP de aproximadamente 250 pares de bases, se detectó la infección viral por en las plantas de *L. esculentum* var. Floradade y Río Grande, *N. tabacum* var. rustica y xanthi, *C. annuum*, *P. ixocarpa*, las que además mostraron síntomas 15 dpi

con savia infecciosa de jitomate, en el caso de las plantas de *C. amaranticolor* y *L. nepetaefolia*, no se detectó al agente viral (Figura 11).

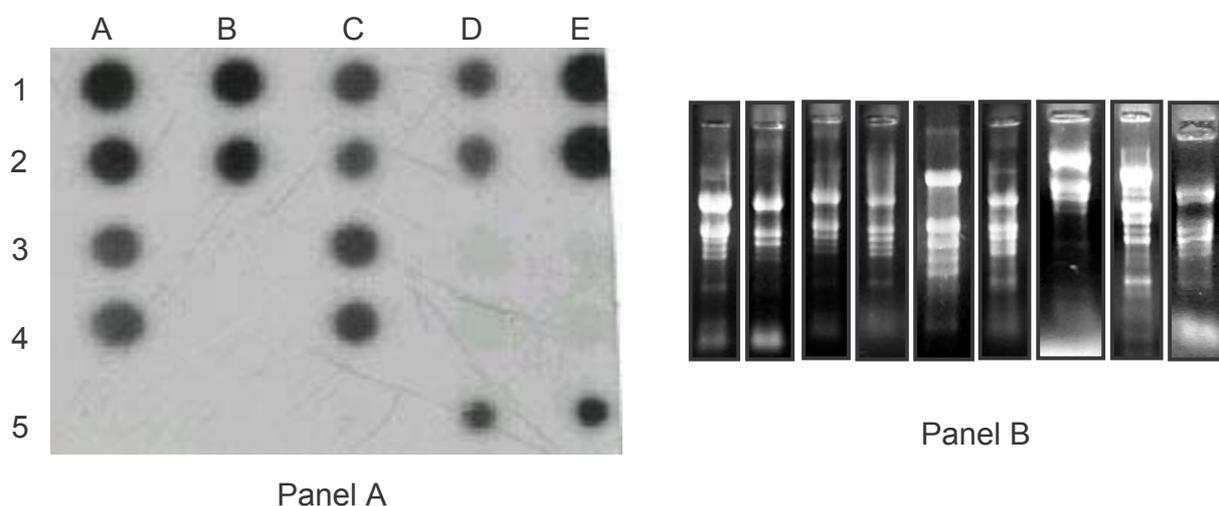


Figura 11

En el panel A se muestra la detección de Tobamovirus en plantas de jitomate e indicadoras mediante hibridación radiactiva. Coordenadas 1 y 2A *L. esculentum* (RG), 3 y 4A *L. esculentum* (FD), 1 y 2B *N. tabacum* var. rústica, 1 y 2C *C. annuum*, 3 y 4C *N. tabacum* var. xanthi, 1 y 2D *Ph. ixocarpa* con síntomas severos, 3 y 4D *C. amaranticolor*, 1 y 2E *Ph. ixocarpa* con síntomas ligeros, 3 y 4E *L. nepetaefolia*, 5B y 5C controles negativos, 5D y 5E controles positivos productos de PCR TMV CP. En el panel B se muestran los RNA utilizados en este ensayo en el orden previamente descrito.

### Análisis de las secuencias de los fragmentos virales obtenidos mediante RT-PCR

Los fragmentos obtenidos mediante amplificación por RT-PCR fueron purificados y ligados a vectores comerciales (pDRIVE de Quiagen y pCR 4-TOPO de In vitrogen), con los que se transformaron células competentes para ser clonados; se obtuvo el DNA plasmídico de cepas seleccionadas y se comprobó la presencia de los insertos mediante electroforesis de los productos de la digestión con ECO RI de los plásmidos

seleccionados. Los plásmidos recombinantes fueron sometidos al menos a dos reacciones de secuenciación utilizando los iniciadores universales directo y reverso de los vectores. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en los bancos de genes mediante el programa BLASTn. La secuenciación del fragmento TMV CP está constituido por 232 nucleótidos cuya secuencia aminoacídica predicha está constituida por 77 residuos (Figura 12); la comparación de estas secuencias con las depositadas en las bases de datos mediante los programas BLASTn y BLASTp indica que este fragmento corresponde a un fragmento del gen de la proteína de la cápside de algún miembro del género de los Tobamovirus, la secuencia presenta identidad de 98% y una expectativa de  $4e-113$  con el aislamiento de TMV AY796190, sin embargo, los programas reportan también identidad superiores al 80% con aislamientos de la especie ToMV (cuadro 3).

---

```

CAATTCAGACGCAGCAGGCTCGGACTGTCGTTCAACGACAGTTCAGTGAGGTGTGGAAA
 Q F Q T Q Q A R T V V Q R Q F S E V W K

CCGTCACCCCAAGCCACTGTCAGGTTTCTGCAAGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAAC
 P S P Q A T V R F P A S D F K V Y R Y N

GCAGTACTAGATCCTCTAGTTACTGCTTTGTTAGGAGCTTTCGATACTCGAAATAGAATA
 A V L D P L V T A L L G A F D T R N R I

ATAGAAGTCGAAAATCAGGCGAATCCCACCACCGCCGAAACACTCGATGCCA
 I E V E N Q A N P T T A E T L D A

```

---

Figura 12  
 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento TMV CP, se obtuvo la secuencia correspondiente a los seis marcos de lectura posibles, sólo se presenta la que no presenta codones de paro.

Cuadro 3. Reporte de la comparación heurística (BLASTn) de la secuencia de TMV CP Mx, se indican los valores de expectativa e identidad con aislamientos virales depositados en los Bancos de Genes.

Número de acceso	Descripción del aislamiento	Identidad	Valor E
AY796190	Tobacco mosaic virus capsid protein mRNA	98%	4e-113
AJ429098	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein strain Ohio V	94%	3e-86
V01409	Tobacco mosaic virus genome (variant 2)	86%	1e-42
AY555269	Tobacco mosaic virus coat protein mRNA, complete cds	87%	1e-42
AY360447	Tobacco mosaic virus isolate Africa movement protein	86%	1e-42
AF395127	Tobacco mosaic virus isolate Fujian	86%	1e-42
AF493053	Tobacco mosaic virus from China nonfunctional coat protein	85%	2e-41
AJ429082	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein	85%	3e-40
AF318218	Tobacco mosaic virus isolate Potato4	85%	3e-40
D63809	Tobacco mosaic virus genomic RNA	86%	4e-39
AJ429081	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein	85%	7e-38
AF318216	Tobacco mosaic virus isolate Potato3-3 coat protein mRNA	85%	7e-38
V01406	TMV 3' end	84%	2e-35
AY686725	Tobacco mosaic virus strain Egypt nonfunctional coat protein	84%	4e-33
AF411922	Tomato mosaic virus coat protein (CP) mRNA	82%	5e-17
AF332868	Tomato mosaic virus isolate Queensland	87%	3e-15
AF103779	Tobacco mosaic virus strain TOM coat protein mRNA	87%	3e-15
Z98201	Tomato mosaic virus encoding coat protein	86%	8e-13
X02144	Tobacco mosaic virus tomato strain (L) genome	86%	8e-13
AJ132845	tomato mosaic virus	86%	8e-13
AJ011934	Tomato mosaic virus	86%	8e-13
AY313136	Tomato mosaic virus coat protein (CP) mRNA	86%	8e-13
AY383730	Tomato mosaic virus Lisianthus coat protein gene	86%	8e-13
AJ429083	Tomato mosaic virus cp gene for capsid protein	86%	8e-13
AF067239	Tomato mosaic virus strain IV724-2B1097	86%	8e-13
AF067236	Tomato mosaic virus strain TOMV-M coat protein	86%	8e-13
AF012917	Tobacco mosaic virus coat protein	86%	8e-13
AJ417701	Tomato mosaic virus camellia strain	84%	2e-10
AJ429086	Tomato mosaic virus cp gene for capsid protein	85%	3e-09
AJ429085	Tomato mosaic virus cp gene for capsid protein	85%	3e-09
AY956381	Tropical soda apple mosaic virus coat protein	83%	0.003

Para establecer con precisión la naturaleza del patógeno, se diseñaron iniciadores que delimitan una región mayor del genoma del posible Tobamovirus, el fragmento (MP) obtenido fue clonado, la secuencia consta de 804 nucleótidos correspondiendo a 267 aminoácidos (Figura 13), en el cuadro 4 presenta los resultados de la comparación realizada con el programa BLASTn, este análisis indica que la secuencia MP del aislamiento Tobamovirus Mx corresponde al gen de la proteína del movimiento de TMV

con una identidad del 83% y una expectativa de  $3e-148$  a la variante de TMV con número de acceso X68110 aislado y caracterizado en Corea por Koh *et al.*, (1992). En este reporte se incluyen aislamientos del ToMV los cuales presentan una identidad de alrededor del 80 al 82% y una expectativa de  $4e-39$  a  $2e-22$ .

---

```

ATGGCTCTAGTCGTTAAAGGTAAGGTGAATATCAATGAGTTTATTGATTTGACCAAACG
M A L V V K G K V N I N E F I D L T K T

GAGAACTTTTACCGTCGATGTTTACTCCGGTCAAAAGTGTAATGTGTTCAAAGGTCGAC
E K L L P S M F T P V K S V M C S K V D

AAGATAATGGTGCATGAAAATGAATCATTGTCTGAAGTCAACCTTCTTAAAGGTGTAAAG
K I M V H E N E S L S E V N L L K G V K

CTCATTGAAGGTGGATATGTTTGTCTAGCTGGTCTGGTAGTTACTGGTGAGTGAATCTG
L I E G G Y V C L A G L V V T G E W N L

CCCACAATTGCAGAGGCGGTGTGAGCGTCTGTTTGGTGGATAAGAGGATGGAAAGGGCT
P D N C R G G V S V C L V D K R M E R A

GATGAAGCAACACTTGGATCCTACTATACTGCAGCAGCAAAGAAGAGATTCCAATTCAAG
D E A T L G S Y Y T A A A K K R F Q F K

GTTGTCCCTAACTATGCGATTACCACCCAGGACGCTATGAAGAATGTCTGGCAGGTCTTA
V V P N Y A I T T Q D A M K N V W Q V L

GTCAATATCAGAAATGTTAGGATGTCTGCGGGTTTTTGTCCGCTTTCTTTGGAGTTTGTG
V N I R N V R M S A G F C P L S L E F V

TCTGTATGTATAGTTTATAAGAATAACATAAAAATTAGGTTTGAGAGAGAAAATCACAAGT
S V C I V Y K N N I K L G L R E K I T S

GTGAGAGACGGAGGGCCCATGGAACCTTCTGAAGAAGTTGTAGATGAGTTCATGGAAGAT
V R D G G P M E L S E E V V D E F M E D

GTACCTATGTCAATCAGACTTGCTAAGTTCAGATCTCGAAACGGGAAAAAGAGTGATGCC
V P M S I R L A K F R S R N G K K S D A

CAAAAGGGAAAAGGTAATAATAATACTCGGTCCGGTGCCGAACAGGAACCATAGAAATGGC
Q K G K G N N N T R S V P N R N H R N G

AGAAATTTTGAAGAGGTGGTTGAAAAGAATAATTTAATCGGAGATGATTCGGAGACTTCA
R N F E E V V E K N N L I G D D S E T S

GTCGCCGAGTCGGATTTCGTTTTAA
V A E S D S F *

```

---

Figura 13  
 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del fragmento de MP del probable Tobamovirus Mx.

Cuadro 4. Reporte de la comparación heurística (BLASTn) de la secuencia de TMV MP Mx, se indican los valores de expectativa e identidad con aislamientos virales depositados en los Bancos de Genes.

Número de acceso	Descripción del aislamiento	Identidad	Valor E
X68110	Tobacco mosaic virus, complete genome	83%	3e-148
D63809	Tabacco mosaic virus genomic RNA	85%	4e-147
V01407	Two tobacco mosaic virus genes	84%	4e-144
J02412	tobacco mosaic virus 30k protein gene	84%	4e-144
AF395127	Tobacco mosaic virus isolate Fujian	84%	6e-137
V01409	Tobacco mosaic virus genome (variant 2)	83%	3e-135
AJ308683	Tobacco mosaic virus MP gene for movement protein	83%	2e-130
AF273221	Tobacco mosaic virus	83%	2e-130
AJ011933	Tobacco mosaic virus	83%	5e-128
AJ509082	Tobacco mosaic virus MP pseudogene	84%	2e-127
AJ429098	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein strain Ohio V	94%	8e-93
AY360447	Tobacco mosaic virus isolate Africa movement protein	84%	4e-82
DQ173945	Tobacco mosaic virus isolate Sapopema movement protein gene	83%	4e-67
V01406	TMV 3' end	87%	1e-51
AJ132845	tomato mosaic virus	81%	4e-39
AF062519	Tobacco mosaic virus movement protein	81%	4e-39
AJ417701	Tomato mosaic virus camellia strain	82%	6e-38
AF332868	Tomato mosaic virus isolate Queensland	81%	2e-34
AB083196	Tomato mosaic virus genomic RNA	81%	2e-34
AF155507	Tobacco mosaic virus	81%	2e-34
D17458	Tobacco mosaic virus (TMV) RNA	81%	2e-34
AF042032	Tomato mosaic virus movement protein gene	80%	2e-22
AJ429081	Tobacco mosaic virus cp	92%	8e-19
AJ429082	Tobacco mosaic virus cp	90%	1e-17
AJ429079	Tobacco mosaic virus cp	83%	1e-17
AJ429078	Tobacco mosaic virus cp	84%	1e-14
AJ308228	Pepper Mild Mottle Virus	86%	3e-12
AB113117	Pepper mild mottle virus	85%	1e-11

Dado que las evidencias obtenidas hasta aquí no permiten discernir la especie a la cual pertenece nuestro aislamiento, se procedió a la amplificación, secuenciación y análisis del fragmento que codifica para la proteína de la cápside. De esta manera se obtuvo el fragmento TToM CP el cual consta de 479 nucleótidos los cuales codifican 159 residuos (Figura 14). El análisis con el software BLASTn de este fragmento reportó que presenta identidad de 96% y una expectativa de 0.0 con la secuencia del aislamiento AJ429098 de TMV reportada por Letschert *et al.*, (2002), indicando que este fragmento corresponde al gen de la proteína de la cápside del TMV, sin embargo, en este análisis

el aislamiento Mx presenta también identidad con aislamientos de la especie ToMV (cuadro 5).

```

ATGTCTTACACAATTACGACTCCATCTCAATTCGTGTTCTTGTCATCAGCATGGGCCGAT
M S Y T I T T P S Q F V F L S S A W A D

CCAATAGAATTAATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGTAACCAGTTCCAAACGCAACAA
P I E L I N L C T N A L G N Q F Q T Q Q

GCTCGGACTGTCGTTCAACGACAGTTCAGTGAGGTGTGGAAACCGTCACCCCAAGCCACT
A R T V V Q R Q F S E V W K P S P Q A T

GTCAGGTTTCTGCAAGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAACGCAGTACTAGATCCTCTA
V R F P A S D F K V Y R Y N A V L D P L

GTTACTGCTTTGTTAGGAGCTTTTCGATACTCGAAAATAGAATAATAGAAGTCGAAAATCAG
V T A L L G A F D T R N R I I E V E N Q

GCGAACCCAGCAACCGCTGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGATGACGCAACAGTG
A N P A T A E T L D A T R R V D D A T V

GCAATAAGGAGCGCAATAAATAATTTAGTAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGTTTCATAC
A I R S A I N N L V V E L I R G T G S Y

AATCAGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTGCTCCTGCATCTAA
N Q S S F E S S S G L V W T S A P A S *
    
```

Figura 14  
Secuencia nucleotídica de aminoácidos del fragmento CP del Tobamovirus Mx.

Cuadro 5. Reporte de la comparación heurística (BLASTn) de la secuencia de TMV CP Mx, se indican los valores de expectativa e identidad con aislamientos virales depositados en los Bancos de Genes.

Número de acceso	Descripción del aislamiento	Identidad	Valor E
AJ429098	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein strain Ohio V	96%	0.0
AJ429080	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein	89%	4e-149
V01408	Tobacco mosaic virus genome	89%	9e-147
X68110	Tobacco mosaic virus, complete genome	89%	9e-147
AJ429078	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein	89%	9e-147
AF516913	Tobacco mosaic virus coat protein mRNA	88%	2e-144
AJ429082	Tobacco mosaic virus cp gene for capsid protein	88%	5e-142
AF546184	Tobacco mosaic virus strain Flavum	88%	5e-142
X70882	Tobacco mosaic virus PM2 mRNA	89%	9e-141
AF318218	Tobacco mosaic virus isolate Potato4	88%	1e-139
AF493053	Tobacco mosaic virus from China nonfunctional	88%	8e-135

V01406	TMV 3' end	87%	1e-127
X70885	Tobacco mosaic virus DT1G mRNA for capsid protein	86%	4e-121
AY140898	Tobacco mosaic virus coat protein gene	86%	7e-120
AF126505	Tobacco mosaic virus coat protein mRNA	87%	2e-116
Z81328	N.tabacum TVM viroid mRNA for viral envelope protein	91%	5e-59
AF411922	Tomato mosaic virus coat protein (CP) mRNA	82%	6e-43
AJ006991	Tobacco mosaic virus strain B RNA	90%	1e-41
AB083196	Tomato mosaic virus genomic RNA	79%	8e-27
AY383730	Tomato mosaic virus Lisianthus coat protein gene	78%	2e-24
AF332868	Tomato mosaic virus isolate Queensland	78%	2e-24
AF260730	Tomato mosaic virus potato1 coat protein mRNA	78%	2e-24
AF103777	Pepper mild mottle virus strain P1 coat protein mRNA	78%	2e-24
AJ417701	Tomato mosaic virus camellia strain	79%	5e-22
AJ132845	tomato mosaic virus	78%	5e-22
AY063743	Tomato mosaic virus coat protein mRNA	82%	3e-20
AF042031	Tomato mosaic virus coat protein gene	81%	7e-18
AJ429086	Tomato mosaic virus cp gene for capsid protein	80%	4e-13
AJ429084	Tomato mosaic virus cp gene for capsid protein	77%	2e-12

### **Análisis filogenético de las secuencias de los fragmentos del aislamiento mexicano**

Dado que la comparación heurística de los fragmentos no permite establecer la identidad del virus asociado con el amarillamiento y deformación foliar de las plantas de jitomate se procedió a realizar un análisis filogenético utilizando modelos de distancia genética y de máxima parsimonia. Las Figuras 15 y 16 presentan los árboles consenso elaborados con el fragmento de 232 nucleótidos de la CP, en el análisis se incluyeron además del Tobamovirus Mx 101 secuencias de diferentes especies del género. La topología de ambos árboles es básicamente la misma, los aislamientos son agrupados en 8 clados, en el árbol elaborado con distancia y 9 en el de máxima parsimonia, en los clados se agrupa a los representantes de cada especie, sin embargo es notorio que en 6 clados se agrupan aislamientos de distinta especie y resulta interesante que aislamientos de TMV son los que con mayor frecuencia se intercalan en otros grupos (Kgmm, Rm, Tom, Pemm y Pmm). El Tobamovirus Mx se agrupa en el clado Tm con 9

secuencias de TMV (bootstrap de 99%) y con un aislamiento asignado como ToMV. Este fragmento CP sugiere que de un ancestro de este grupo se deriva el clado Tom (bootstrap de 97%) en el cual se incluyen además aislamientos asignados a TMV y a Pemm.

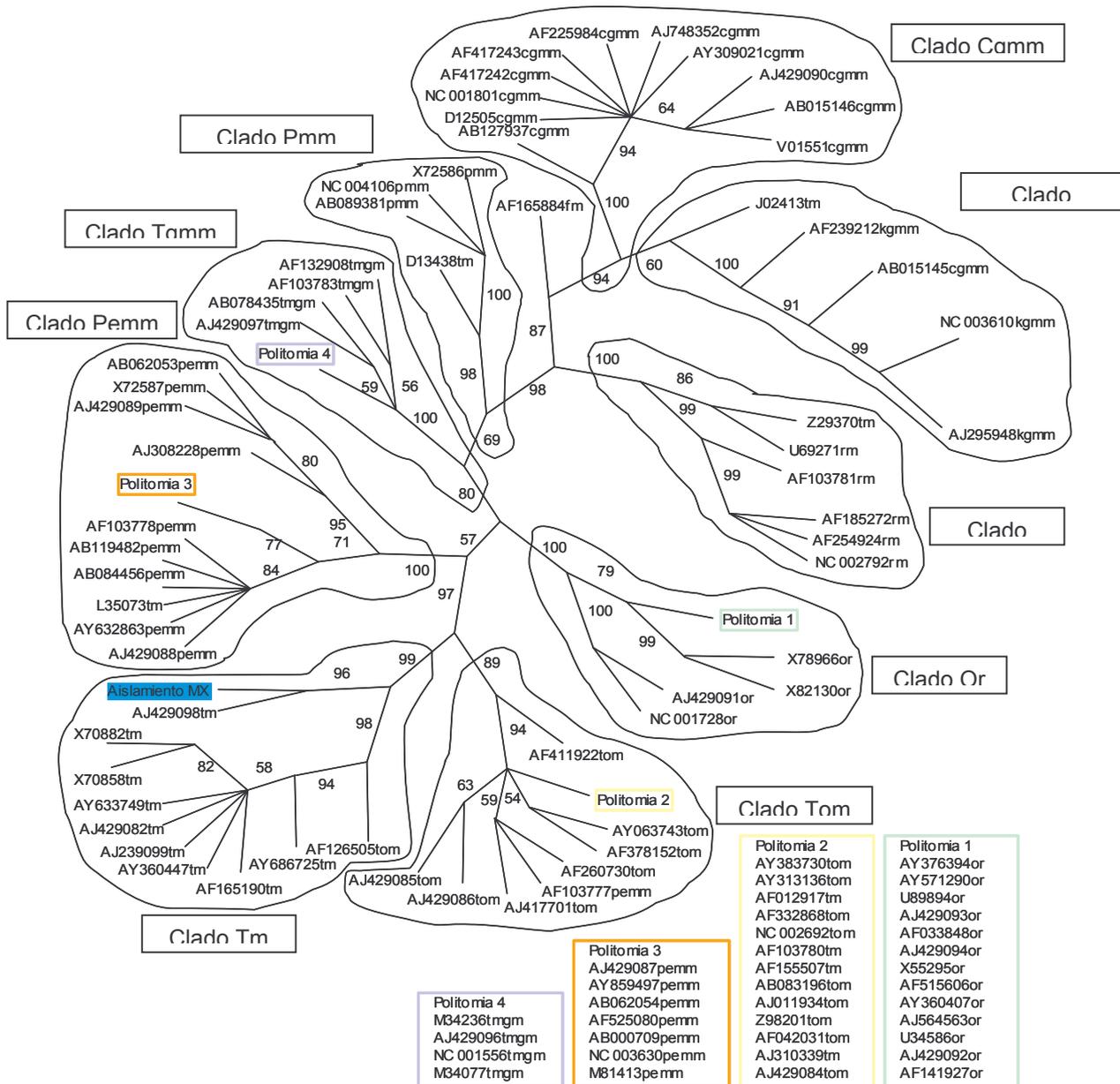


Figura 15  
 Árbol filogenético elaborado con máxima parsimonia con el fragmento de 232 pb del gen CP de Tobamovirus incluyendo la correspondiente al aislamiento Tobamovirus Mx y prueba estadística de bootstrap con 1000 repeticiones.



En las Figuras 17 y 18 se presentan los árboles filogenéticos consenso elaborados mediante modelos de máxima parsimonia y distancia genética con el fragmento MP (804 nt), en este análisis se incluyeron, además del aislamiento Mx, secuencias de diferentes especies del género Tobamovirus. La topología que muestran ambos árboles es esencialmente la misma, los aislamientos se agrupan en 9 clados los cuales incluyen a los representantes de cada especie, sin embargo, en el árbol construido con máxima parsimonia 5 clados agrupan aislamientos de distinta especie, mientras que el árbol elaborado con distancia genética 4 clados incluyen aislamientos extraños. Los aislamientos de TMV son los que con mayor frecuencia se intercalan en esos clados (Spp, Rm, Tom, Cgmm y Kgmm), en ambos árboles consenso se distingue el clado (Spp) que está conformado por tres miembros de distintas especies. Por otro lado, ambos árboles agrupan al Tobamovirus Mx, con un valor de bootstrap de 100%, en el clado de la especie TMV. El análisis filogenéticos con este fragmento sugiere que de un ancestro de este grupo se ha derivado el clado Tom (con miembros de la especie ToMV) (bootstrap de 100%), en el cual interesantemente se incluyen aislamientos asignados a TMV.



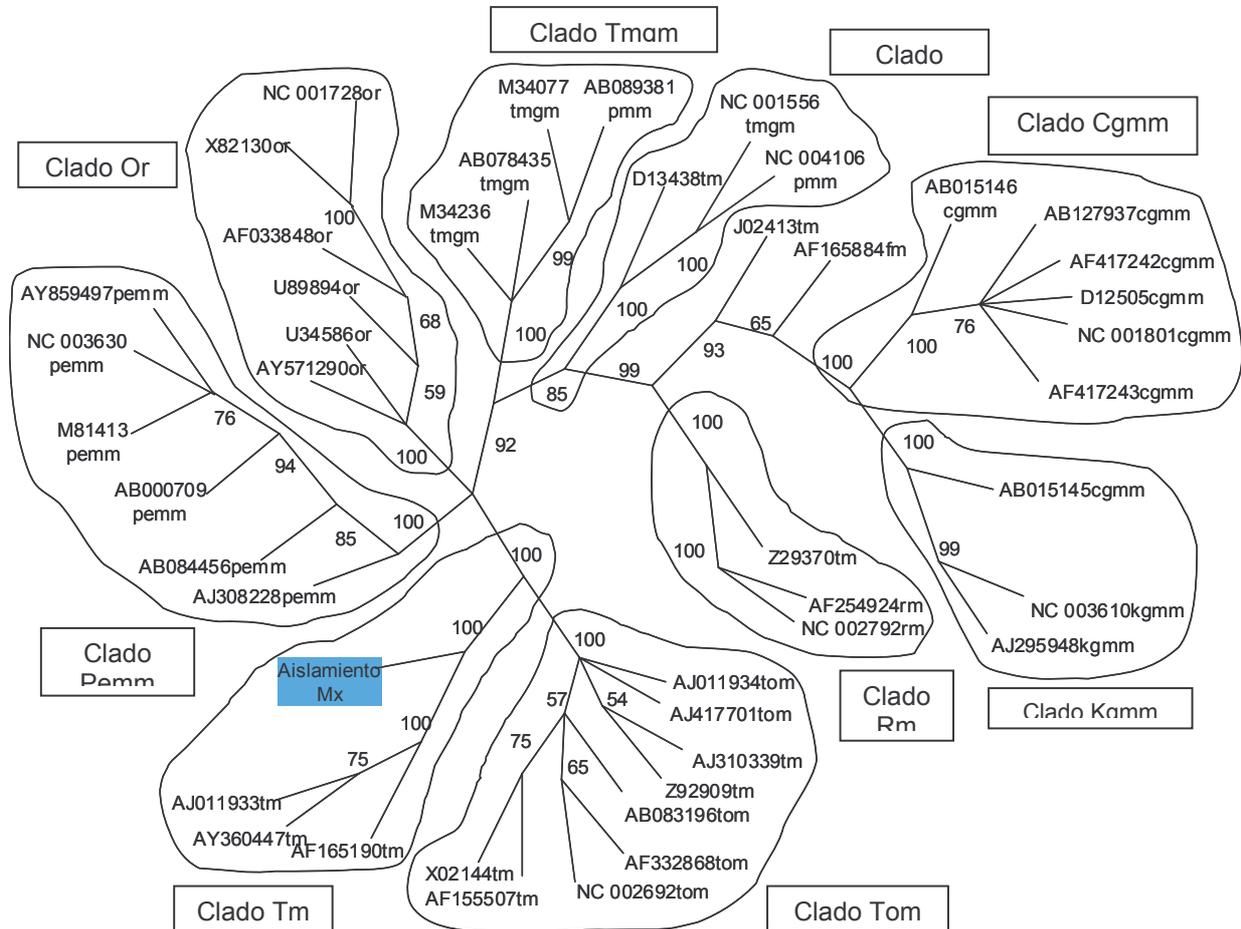


Figura 18  
 Árbol filogenético elaborado con el gen de la proteína del movimiento de distintos aislamientos de tobamovirus y el fragmento MP de 804 pb del Tobamovirus Mx con el modelo Hasegawa, Kishino, y Yano (1985) con corrección Gamma, prueba de proporción de sitios invariables y bootstrap con 1000 repeticiones.

Las Figuras 19 y 20 presentan los árboles consenso elaborados mediante modelos de distancia genética y máxima parsimonia con el fragmento de 479 nt que pertenece al gen que codifica para CP, de acuerdo con la comparación heurística, de algunos miembros del grupo Tobamovirus, en este análisis se incluyeron secuencias de diferentes especies del género que han sido caracterizados en distintas partes del mundo y depositadas en el GenBank con el número de acceso que se muestra en los nodos terminales. En ambos árboles la topología es similar, los aislamientos son agrupados en 9 clados, en los que se agrupan representantes de cada especie, no obstante, es notorio que en el árbol construido con distancia genética 7 clados agrupan aislamientos de distinta especie mientras que en el árbol con máxima parsimonia solo 6 clados agrupan aislamientos de diferente especie. Interesantemente, en ambos árboles son aislamientos de TMV los que con mayor frecuencia se alternan en clados distintos (Tom, Pmm, Rm, Pemm, Cgmm y Kgmm). Particularmente, el Tobamovirus Mx fue agrupado en ambos árboles (clado TMV con valores bootstrap superiores al 90%) junto con 9 aislamientos designados como TMV e incluyen a un aislamiento designado como ToMV. Como en los casos anteriores, los árboles filogenéticos sugieren que el clado Tom (miembros de la especie ToMV), se pudo haber derivado de un ancestro común con el grupo TMV en el cual se incluyen los aislamientos asignados a TMV.

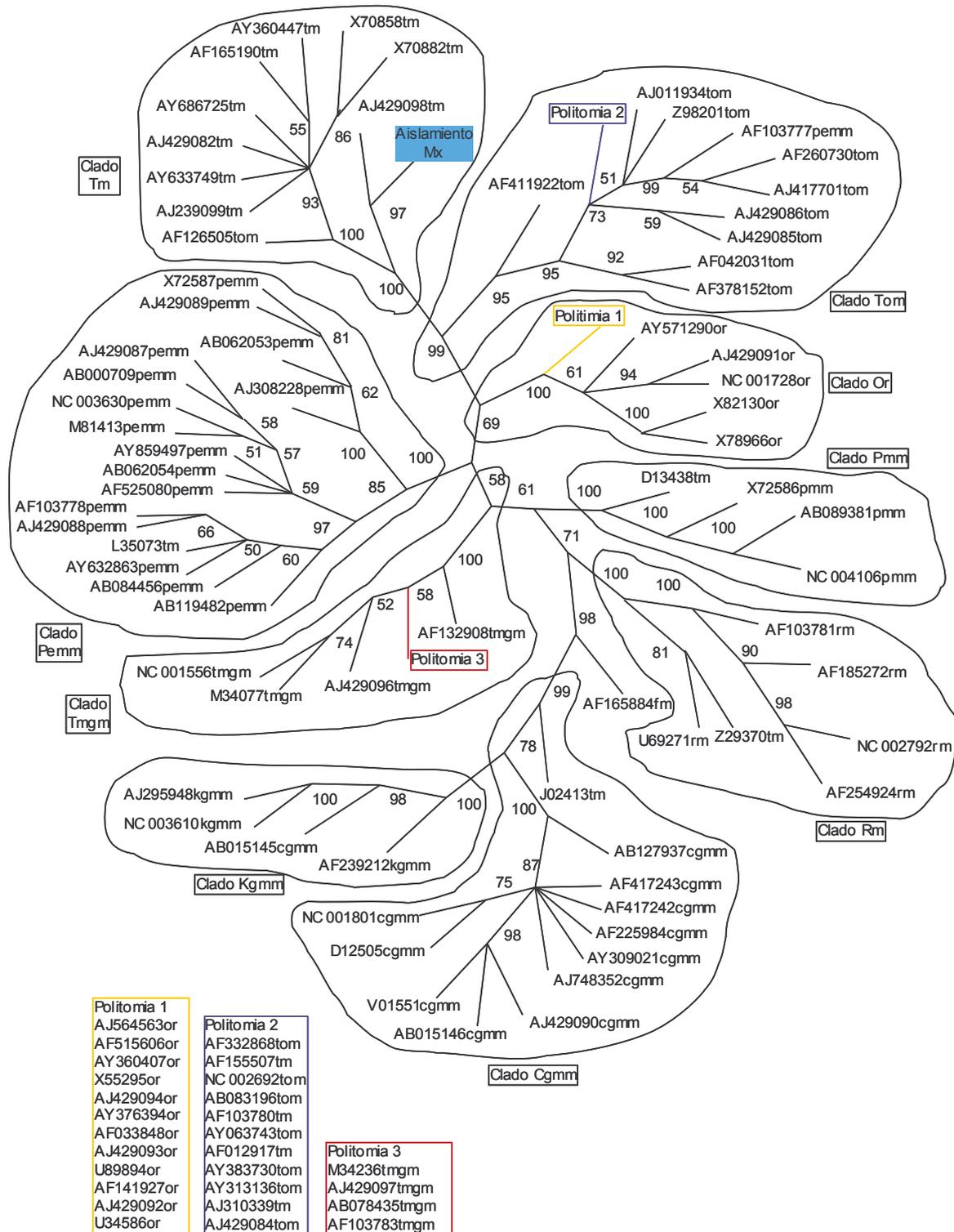


Figura 19  
 Árbol filogenético elaborado con el fragmento CP de 479 nt del Tobamovirus Mx y el gen de la proteína cápside de diferentes aislamientos de tobamovirus con el modelo Hasegawa, Kishino, y Yano (1985) con corrección gamma y prueba de bootstrap con 1000 repeticiones.

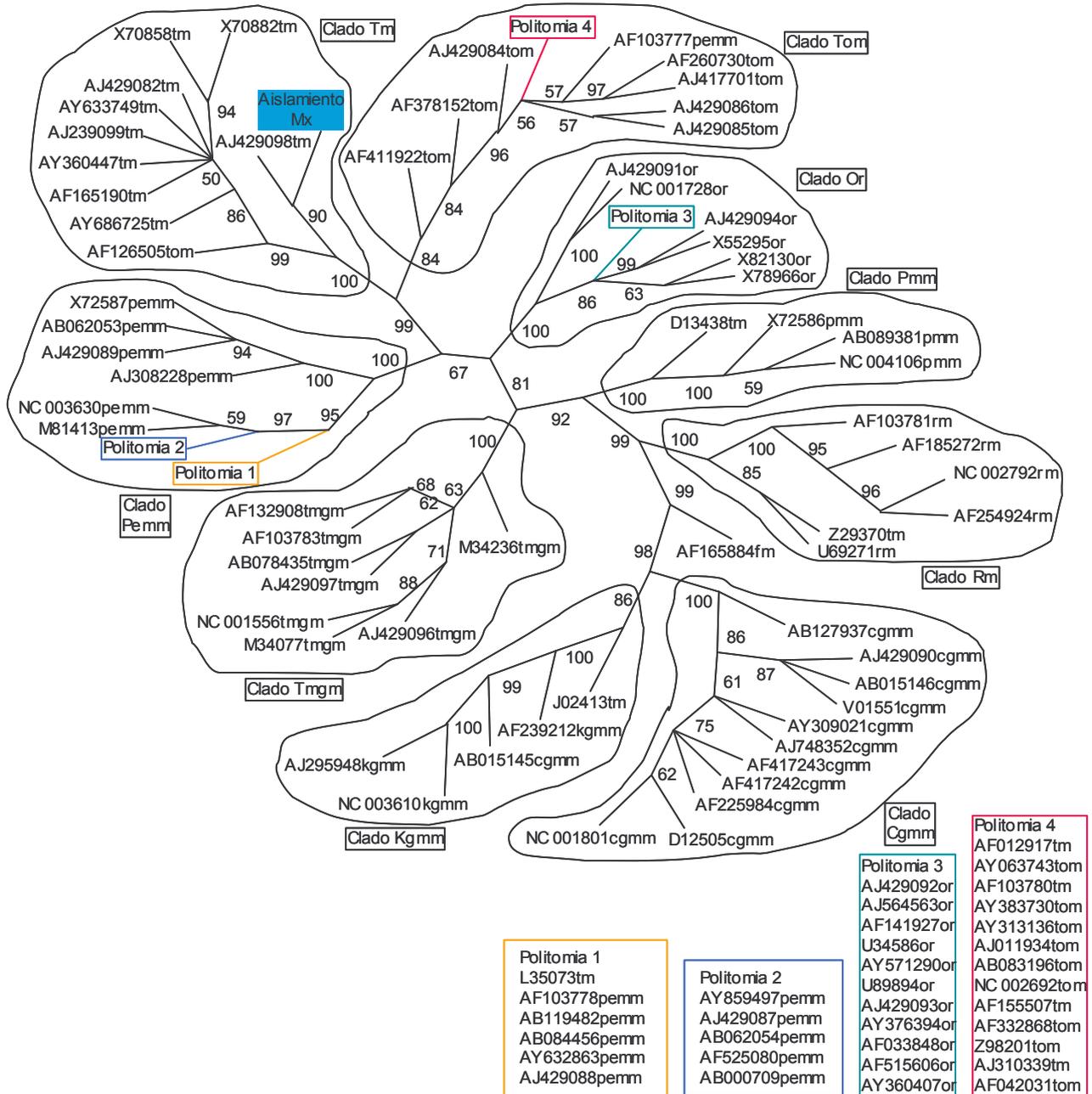


Figura 20  
 Árbol filogenético sin raíz construido con la secuencia de 479 nt del Tobamovirus Mx y el gen de la proteína cápside de distintos aislamientos de tobamovirus mediante máxima parsimonia y prueba estadística bootstrap con 1000 repeticiones.

---

### **Análisis de restricción *in silico* con secuencias de genes de la proteína del movimiento y de la cápside de TMV y ToMV**

A partir de alineamientos múltiples (ClustalX) se obtuvo la secuencia consenso de los genes de la proteína del movimiento y de la cápside de TMV y ToMV, además las correspondientes del aislamiento Mx, estas secuencias se sometieron a un análisis de restricción *in silico* utilizando el software DNAMAN ([www.lynnon.com/pc/framepc.html](http://www.lynnon.com/pc/framepc.html)), se probaron 117 enzimas, el cuadro 6 presenta los resultados donde se consideraron solo fragmentos con tamaños mayores a 120 nt y las enzimas diferenciales para cada secuencia. En el caso de TMV, 20 enzimas cortan la secuencia, mientras que en el caso de ToMV 15. En el caso del Tobamovirus Mx se han encontrado sitios para 20 enzimas, una de ellas (Eco57 I) con tres sitios de corte y que según los patrones de restricción el primero de estos sitios también está presente en ToMV mientras que los dos sitios restantes son específicos para este aislamiento. Interesantemente este análisis muestra una serie de enzimas para las que hay secuencias blanco tanto en el aislamiento ToMV y el Tobamovirus Mx, generando fragmentos de tamaño menor a 120 pb por lo que esos sitios no se presentan en los mapas de restricción.

Cuadro 6. Análisis de restricción de los genes MP y CP de TMV, ToMV y el Tobamovirus Mx, solamente se muestran datos relativos a las enzimas que permitirían diferenciar a los virus y que producirían fragmentos mayores de 120 pb.

	ToMV	Aislamiento Mx	TMV
AatII	502 / 767	-N P-	-N P-
AclI	398 / 871	-N P-	-N P-
AhaIII	355 / 914	483 / 802	484 / 744 / 805
AlwNI	-N P-	-N P-	334 / 955
ApaI	-N P-	557 / 728	557 / 732
AsuII	628 / 641	-N P-	-N P-
BamHI	-N P-	316 / 969	-N P-
BglI	-N P-	-N P-	304 / 985
BglIII	-N P-	631 / 654	-N P-
BsmI	-N P-	-N P-	203 / 1068
BspHI	-N P-	-N P-	132 / 1157
Bsp1407I	393 / 876	-N P-	-N P-
BspMI	400 / 869	402 / 883	-N P-
BstD102I	296 / 973	-N P-	-N P-
BstEII	378 / 891	382 / 903	-N P-
BstXI	-N P-	570 / 715	-N P-
Bsu36I	-N P-	396 / 889	387 / 902
ClaI	-N P-	-N P-	528 / 761
Csp45I	628 / 641	-N P-	-N P-
CvnI	-N P-	396 / 889	387 / 902
DraI	355 / 914	483 / 802	744 / 805 / 484
DrdI	-N P-	-N P-	242 / 1047
Eco57I	172 / 1097	173 / 524 / 590 / 761	-N P-
HindIII	-N P-	-N P-	178 / 1111
MfeI	-N P-	246 / 1039	246 / 1043
NdeI	404 / 865	-N P-	-N P-
PacI	-N P-	405 / 880	406 / 883
PstI	-N P-	333 / 952	-N P-
PvuII	164 / 1105	-N P-	-N P-
ScaI	-N P-	249 / 1033	-N P-
SauI	-N P-	396 / 889	387 / 902
StuI	572 / 697	-N P-	-N P-
VspI	-N P-	409 / 876	406 / 883
XmnI	312 / 957	346 / 939	-N P-

## DISCUSIÓN

El análisis biológico sugiere que el agente causal de la deformación y amarillamiento foliar del jitomate corresponde con algún miembro del género Tobamovirus según las descripciones de los síntomas generados por este grupo en diversas especies vegetales (Brunt *et al.*, 1996), no obstante, los daños causados en plantas de jitomate por el aislamiento Mx son cualitativamente de mayor magnitud y severidad, lo cual podría ser explicado a través de las variaciones genéticas del aislamiento mexicano, a las condiciones ambientales o bien a las variaciones genéticas de los huéspedes utilizados en el ensayo (Mathews, 1991; Chen *et al.*, 1996); se han reportado mutantes de TMV que presentan sustituciones en la posición 19 de la CP (ácido aspártico a valina) y generan síntomas severos (mosaico amarillo) en plantas de tabaco, por otro lado mutantes en la posición 138 (serina a fenilalanina) de la misma proteína atenúan los síntomas comunes y provocan mosaico verde ligero (Banerjee *et al.*, 1995; García-Arenal *et al.*, 1984). El aislamiento Mx genera síntomas severos en *N. tabacum* por lo que sería probable portador de la sustitución 19, sin embargo la secuencia de aminoácidos deducida indica que el marco de lectura, aparentemente, se ha desplazado una posición por lo que en la posición 20 el Tobamovirus Mx presenta ácido aspártico, además en la posición 139 (correspondiente a la 138 del mutante reportado por Banerjee *et al.*, 1995), el Tobamovirus Mx presenta serina tal como los aislamientos no virulentos. Los residuos 20 y 139 del Tobamovirus Mx son comunes en la mayoría de los aislamientos reportados y depositados en los bancos de genes. De tal manera que es probable que los síntomas severos inducidos por Tobamovirus Mx sea ocasionado por una mezcla de virus más que por alteraciones en su genoma, así podría explicarse los síntomas alternos inducidos en las plantas de *Physalis ixocarpa*.

El análisis electroforético de las formas replicativas virales, dado el patrón de corrimiento que presentó el RNAdc extraído de plantas de jitomate enfermas, permitieron determinar que este aislamiento o la mezcla viral corresponde con uno o varios virus monopartita (probablemente uno o varios miembros del género Tobamovirus) y que las bandas de menor longitud pueden corresponder a fragmentos subgenómicos virales (p.e. CP), o a material genético derivado del huésped que probablemente está interviniendo en procesos celulares, esta posibilidad parece ser apoyada por la secuenciación del fragmento de 400pb obtenido mediante reacciones de RT-PCR con el RNAdc de las plantas de jitomate enfermas y oligonucleótidos al azar ya que como han mostrado los resultados de la comparación heurística, presenta valores de identidad y de expectativa con secuencias del genoma de cloroplasto de *N. tabacum*. Como se mencionó, las diferencias en la sintomatología de *P. ixocarpa* nos conducen a considerar la posibilidad de la presencia de más de un virus, por otro lado, el análisis de las formas replicativas por sí mismas tampoco permiten distinguir si estamos tratando con infecciones simples o con complejos virales, para discernir esta posibilidad se utilizó una sonda genética correspondiente a un fragmento de 230 pb del gen CP de TMV obtenida a partir de infecciones virales en malezas de México (Piedra-Ibarra *et al.*, 2005). Los resultados de los ensayos de hibridación en punto sugirieron la presencia del mismo aislamiento viral en todas las plantas (inclusive *P. ixocarpa* con mosaico verde amarillo ligero y *P. ixocarpa* con amarillamiento clorosis y deformación foliar severa), sin embargo, la comparación heurística de la secuencia del fragmento 230 pb indica que presenta identidad con secuencias de aislamientos de TMV y ToMV de tal manera que no podríamos distinguir, al menos, entre estas dos especies.

La incapacidad de resolver la presencia de uno o varios tipos virales por estos medios planteó la necesidad de establecer si el fragmento de 232 pb permite agrupar de manera contundente la especie de los aislamientos agrupados en el género Tobamovirus, con esa intención se realizó el análisis filogenético con ese fragmento, los resultados, como se ha mostrado, indican que los aislamientos constituyen clados en los que se agrupa preferentemente a miembros de una especie, no obstante, existen clados que agrupan aislamientos de diferente especies, lo que indicaría que este fragmento no permite establecer la identidad del virus, que es necesario ampliar el fragmento del marcador o que existen aislamientos que han sido asignados específicamente de manera errónea. Estas consideraciones condujeron a diseñar iniciadores que permitieran amplificar otras regiones del genoma del Tobamovirus y así aumentar secuencialmente los sitios informativos hasta lograr un fragmento que a través del análisis filogenético, esclareciera las relaciones entre las diversas variantes de las especies. De esa manera, se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias de los genes de las proteínas del movimiento y de la cápside utilizando modelos de distancia genética y máxima parsimonia, los resultados sugieren en ambos casos, relaciones evolutivas semejantes; resultados equivalentes aunque con distintos aislamientos virales han sido obtenidos por otros autores (Lartey *et al.*, 1996; Arriaga-Canon, 2005). Los diferentes análisis filogenéticos basados en MP y CP ubican al Tobamovirus Mx en el clado TM, por otro lado, aislamientos asignados a esta especie se ubican frecuentemente en el clado ToM e inclusive en clados formados por especies más alejados filogenéticamente de la especie de TMV, otros autores basados en resultados semejantes consideran que esos aislamientos pudieran representar a los ancestros de estas especies que han adquirido historias evolutivas separadas y ocupan

diferentes nichos ecológicos (Gibbs, 1999), sin embargo pudieran consistir de aislamientos cuya asignación específica se realizó sin un análisis detallado de la secuencia nucleotídica. Este análisis confirma que el amarillamiento y deformación foliar del jitomate esta asociado a infecciones en las que participa el Virus del Mosaico del Tabaco; por otro lado, el análisis molecular en el que se utilizan iniciadores específicos (Letschert *et al.*, 2002) sugieren, la presencia de una variante de ToMV, especie que está estrechamente relacionado con el TMV (Gibbs *et al.*, 2004). La especie ToMV es miembro del género Tobamovirus, la información genética está contenida en un segmento cromosómico de tamaño similar al de TMV, además el rango de huéspedes de ambas especies es semejante (Brunt *et al.*, 1996). Estas similitudes dificultan su aislamiento mediante huéspedes artificiales y su caracterización por métodos moleculares convencionales, por lo cual algunos autores han sugerido la utilización de inmunodetección con anticuerpos monoclonales o bien mediante iniciadores diferenciales específicos (Letschert *et al.*, 2002). La dificultad para distinguir entre estas especies genera asignaciones equivocadas y ha provocado que síndromes en plantas cultivadas sean asociadas a TMV y ToMV, esta mezcla viral explicaría los resultados de los ensayos de inoculación mecánica, puesto que ambos aislamientos generan síntomas semejantes en las especies analizadas, también explica los síntomas obtenidos en *P. ixocarpa*, adicionalmente la sonda 230 pb hibrida con ambos aislamientos y la forma replicativa posee una longitud semejante.

Los resultados de este trabajo evidencian la necesidad de utilizar diversas estrategias para establecer con claridad la identidad de los virus, particularmente cuando son miembros de especies filogenéticamente emparentadas y muestra que es necesario

evaluar la capacidad de ciertos marcadores moleculares así como de distintos modelos para informar de sus relaciones evolutivas.

Finalmente, se analizó el patrón de restricción in silico con la finalidad de aportar una alternativa para discernir entre miembros de TMV y ToMV, los resultados sugieren Stu I y Eco 57I, entre otras enzimas, puede generar patrones de corrimiento electroforético diferenciales, sin embargo la secuencia de TMV Mx sugiere que la variación genética entre los miembros de esta especie puede provocar asignaciones erróneas incluso con este análisis.

## **CONCLUSIONES**

Las evidencias de este estudio permiten asociar a un aislamiento de TMV con el síntoma de deformación y amarillamiento foliar de jitomate actuando en mezcla con otro Tobamovirus (ToMV).

Por otro lado este trabajo refleja la necesidad de utilizar diversas estrategias metodológicas a fin de establecer con claridad la identidad de los virus que actúan en mezclas, sobre todo cuando estos son miembros de especies estrechamente relacionadas.

En análisis filogenético se ha establecido como una herramienta importante para discernir la naturaleza de los virus y las relaciones evolutivas, sin embargo en este trabajo se establece que es necesario evaluar la capacidad informativa de los marcadores moleculares así como la de distintos modelos para realizar inferencias evolutivas.

**LITERATURA CITADA**

- Ahlawat, Y. S., Pant, R. P., Lockhart, B. E. L., Srivastana. M., Chakraborty. N. K., y Varma, A. 1996. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. *Plant Dis.* 80: 590-592.

- Arriaga-Canon, C. G. O. 2005. Replicación, movimiento y acumulación de satélite RNA de CMV en huéspedes experimentales. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala UNAM.

- Banerjee, N., Wang, J. Y., y Zaintlin, M. 1995. A single nucleotide change in the coat protein gene of Tobacco Mosaic Virus is involved in the induction of severe chlorosis. *Virology.* 207: 234 - 239.

- Barak, J. D., Koike, S. T., y Gilbertson, R. L. 2001. The role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. *Plant Dis.* 85:169-178.

- Barba-de la Rosa. A. P., Ng, J., Day, J. y McPherson, A. 2003. Caracterización estructural del RNA del virus satélite del mosaico del tabaco. *Agrociencia.* 37: 503 - 510.

- Barreras-Soto, M. A. Barbosa-Jasso, M. del P. Fierro-Coronado, J. A., Perea-Araujo, L. L., Leyva-López, N. E. y Méndez-Lozano, J. 2004. Susceptibilidad de cultivares de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) al complejo viral predominante en Sinaloa México. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología, VI Congreso Internacional de Fitopatología. L-86.

- Bracero, V., Rivera, L. I. y Beaver, J.S. 2003. DNA analysis confirms *Microptilium lathyroides* has alternative host of *Bean golden mosaic virus*. *Plant Dis.* 87: 1022 - 1025.
  
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. y Zurcher, E. J. 1996. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20<sup>th</sup>. (<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>). Activo Agosto 1996.
  
- Cerkaskas, R. F., Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. y Asmus, G. 1983. *Amaranthus spinosus*, *Leonotis nepetaefolia*, and *Leonorus sibiricus*: New host of *Phomopsis spp.* in Brazil. *Plant Dis.* 67: 821 - 824.
  
- Clark, M. F. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 - 483.
  
- Chatzivassiliou, E. K., Boubourakas, I., Drossos, E., Eleftherohorinos, I., Jenser, G., Peters, D., y Katis, N. I. 2001. Weeds in greenhouses and tobacco fields are differentially infected by *Tomato spotted wilt virus* and infested by its vector species. *Plant Dis.* 85:40-46.
  
- Chen, J., Watanabe, Y., Sako, N., Oshima, K., y Okada, Y. 1996. Mapping of host range restriction of rakkyo strain of tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum* cv. Bright yellow. *Virology.* 226 : 198 - 204.

- Córdoba, M. C., Martínez-Priego, L. I. y Jordá, C. 2004. New natural host of *Pepino mosaic virus* in Spain. *Plant Dis.* 88: 906.
  
- De la Torre, A. R., Valverde, R., Méndez L. J., Ascencio I. J. T. y Rivera B. R. F. 2002. Caracterización preliminar de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región centro de México. *Agrociencia.* 36 : 471 - 481.
  
- De Mackiewicz, D., Gildow, F. E., Blua, M., Fleischer, S. J., y Lukezic, F. L. 1998. Herbaceous weeds are not ecologically important reservoirs of *Erwinia tracheiphila*. *Plant Dis.* 82: 521-529.
  
- Dovas, C. I. y Katis, N. I. 2003. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. *J. Virol. Methods.* 107 : 99 -106.
  
- Eun, A. J., Huang, L., Chew, F. Li, S. F. y Wong S. 2002. Detection of two orchid viruses used quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. *J. Virol. Methods.* 99: 71 - 79.
  
- Gama, M. I. C. S., Kitajima, E. W. y Lin, M. T. 1982. Properties of *Tobacco necrosis virus* isolate from *Pogostemum patchuli* in Brazil. *Phytopathology.* 72: 529 - 532.
  
- García-Arenal, F., Palukaitis, P. y Zaitlin, M. 1984 Strains and mutants of Tobacco Mosaic Virus derived from single-lesion-passaged inoculum. *Virology.* 132: 131 - 137.

- Garzón, T. J. A. 1987. Presencia de virus en los cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) en México. en Alvizo, V. H. y Lozoya, S. H. Temas en virología II. Ed. Soc. Mex. de Fitopatología. México. Pp156 – 181.
  
- Gibbs, A. 1999. Evolution and origins of tobamoviruses. Phil. Trans. R. Lond. B. 354 : 593 – 602.
  
- Gibbs, A. J., Armstrong, J. S. y Gibbs, M. J. 2004. A type of nucleotide motif that distinguishes tobamovirus species more efficiently than nucleotide signatures. Archives of Virology. 149 : 1941 - 1954.
  
- Gitaitis, R., MacDonald, G., Torrance, R., Hartley, R., Sumner, D. R., Gay, J. D., y Johnson, W. C., III. 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: II. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. Plant Dis. 82:935-938.
  
- Hartono, S., Natsuaki, T., Sayama, H., Atarashi, H. y Okuda, S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by Tomato infectious chlorosis virus newly recognized in Japan. J. Gen. Plant. Pathol. 69 :61 - 64.
  
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. A. 1985. Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. Journal of Molecular Evolution. 22 (2): 160 - 174.

- Hema, M., Kirthi, N., Sreenivasulu, P. y Savithri, H. S. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-PT-PCR for detection and discrimination of Sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern India. Arch. Virol. 148 : 1185 - 1193.
  
- Hernández, E. C., Pinto, C. B., y Cárdenas, S. E. 1995. Virosis en chile, jitomate y maleza en nueve localidades de Yucatán y evaluación de tolerancia de *Lycopersicon* spp. Memorias del XXII Congreso Nacional de Fitopatología, Guadalajara México.
  
- Hernández-Martínez, J., García-Mata, R., Valdivia-Alcalá, R. y Omaña-Silvestre, J. M. 2004. Evolución de la coimpetividad y rentabilidad del cultivo del tomate rojo (*Lycopersicon esculentum* L.) en Sinaloa, México. Agrociencia. 38 (4): 431 - 438.
  
- Hull, R., The potential for using dot-blot hibridisation in the detection of plant viruses. en Jones, R. A. C. y Torrance, L. 1986. Developments and applications in virus testing. Editorial Association of Applied Biologists. Great Britain. pp. 3 - 12.
  
- INEGI. 2004. El sector alimentario en México. Serie de estadísticas sectoriales. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).
  
- Infoagro. 2003. El cultivo del tomate. [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com) Activo junio del 2003.

- Ito, T., Ieki, H. y Ozaki, K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 106 : 235 - 239.
  
- Karl, B. N., y Hugh, B. Jr. 1997. Gene Doc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
  
- Kashina, B. D., Mabagala, R. B. y Mpunami, A. A. 2002. Reservoir weed hosts of tomato yellow leaf curl begomovirus from Tanzania. *Archiv. Phytopath. Pflanz.* 35 : 269 - 278.
  
- Koh, H. K., Song, E. K., Lee, S. Y., Park, Y. I. y Park, W. M. 1992. Nucleotide sequence of cDNA of the tobacco mosaic virus RNA isolated in Korea. *Nucleic Acids Res.* 20 (20): 54 - 74.
  
- Lartey, T. T., Voss, T. C. y Melcger, U. 1996. Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination and taxonomic implications. *Molecular Biology and Evolution.* 13 (10) : 1327 – 1338.
  
- Letschert, B., Adam, G., Dietrich-Eckhardt, L., Willingmann, P. y Heinze, C. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR-RFLP. *J. Vir. Methods.* 106 : 1 - 10.

- Ligoxigakis, E. K., Vakalounakis, D. J. y Thanassouloupoulos, C. C. 2002. Leed host of *Verticillium dahliae* in Crete: Susceptibility, symptomatology and significance. *Phytoparasitica* 30: 511 - 518.
  
- Lockhart, B. E. L., Autrey, L. J. C. y Comstock, J. C. 1992. Partial purification and serology of sugarcane mild mosaic virus, a mealybug-transmitted closterolike virus. *Phytopathology*. 82: 691 - 695.
  
- Logemann, J., Schill, U. y Willmitzzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 163 : 16 - 20.
  
- Lynnon Corporation. 1997. DNAMAN (ver 3.0) para Windows.
  
- Mayo M. A. 2002. Virus taxonomy – Houston 2002. *Arch. Virol.* 147 : 1071 - 1076.
  
- Martínez, A. J., Galindo, A. J. y Rodríguez, M. R. 1974. Estudio sobre la enfermedad del “pinto del jitomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en la región de Actopan, Hgo. *Agrociencia*. 18: 71 - 78.
  
- Martínez-Ramírez, J. L., Alatorre-Oñate, A. A., Alvarado-Hernández, F., Aljibe-Aguilar R., Fueikovsky-Zak, L. Posos-Ponce, P. y Pérez-González A. 2004. Identification of viruses on tomato *Lycopersicon esculentum* grown in the western part of México. *Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología, VI Congreso Internacional de Fitopatología*. C-30

- Matthews, R. E. F., 1991. Plant Virology, Academic Press, USA.
  
- Méndez-Lozano, J., Rivera-Bustamante, R. E., Fanquet, C. y De la Torre-Almaraz, R. 2001. *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus* are geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) crops in Mexico. Plant Disease. 12: 129.
  
- National Center for Biotechnology Information. (<http://www.ncbi.nih.org>)
  
- Perea-Araujo, L. L., Vega A. L. R., Valenzuela V. A., Fierro C. J. A., Leyva L. N. E. y Méndez L. J. 2004. Caracterización de virus en tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.) y malezas asociadas a este cultivo en el estado de Sinaloa, México. Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología, VI Congreso Internacional de Fitopatología. L-86
  
- Piedra-Ibarra, E., De la Torre-Almaraz, R., Zuñiga, G., Xoconostle-Cázares, B. y Ruíz-Medrano, R. 2005. PROOF *Leonotis nepetaefolia*: an important plant virus reservoir in central Mexico. Phytoparasitica. 33 (5): 1 - 15.
  
- Posada D. y Crandall K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14 (9): 817 - 818.
  
- Pringle C. R. 1999. Virus taxonomy – 1999. Arch. Virol. 144 : 422 - 429.

- Ruíz-Medrano R. y Rivera-Bustamante R. 1997. Los Geminivirus: Patógenos de plantas como Modelos en Perspectivas de la Microbiología en México 310 – 324.
  
- Sambrook J., y Russell D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3<sup>rd</sup> ed. USA.
  
- SIAP de la SAGARPA. 2002. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/>. Activo a partir de enero del 2002.
  
- SIAP de la SAGARPA. 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. [http://www.siea.sagarpa.gob.mx/ar\\_comfichedos.html](http://www.siea.sagarpa.gob.mx/ar_comfichedos.html). Activo a partir del 2003.
  
- Stevens, W. A. 1983. Virology of flowering plants. Edit. Chapman and Hall. USA.
  
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., y Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25 : 4876 - 4882.
  
- Torres, P. I., Garzón, T. J. A., Brown, J. K., Becerra, F. A. y Rivera, B. R. F. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. Phytopathology. 86: 1186 - 1192.

- Urias, M. C. y Alejandre, A. T. 1999. Los virus y su impacto en la producción agrícola. en: Hortalizas, plagas y enfermedades. Anaya, R. S. Y Romero, N. J. Edit. Trillas. pp. 99 - 109.
  
- Valverde, R. A., Nameth, S. T. y Jordan, R. L. 1990. Analisis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. Plant Disease 74 (3) : 255 - 258.
  
- Webster, C. G., Wylie, S. J. y Jones, M. G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. Current science. 86 (12): 1604 - 1607.
  
- Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Kitajima, E. W., Barroso, P. A. V., Kuniyuki, H. y Groppo, G. A. 2002. Occurrence, distribution and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of Sao Paulo, Brazil. Plant Dis. 84: 516 - 520.