
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS
TRANSPOSANTES DE *Arabidopsis thaliana* QUE RESPONDEN A
LA INFECCIÓN CON *Begomovirus* AUTÓCTONOS DE MÉXICO**

**TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

SARITA MARQUEZ MARCIAL

Las Agujas, Zapopan, Jal., Marzo de 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. SARITA MÁRQUEZ MARCIAL
PRESENTE.**

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS TRANSPOSANTES DE *Arabidopsis thaliana* QUE RESPONDEN A LA INFECCIÓN CON *Begomovirus* AUTÓCTONOS DE MÉXICO"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el **DR. RAFAEL RIVERA BUSTAMANTE** y como Asesora del mismo la **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS**.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

**"2002, Año Constanancio Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 16 de Julio del 2002**



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DR. RAFAEL RIVERA BUSTAMANTE**.- Director del Trabajo.

c.c.p. **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS**.- Asesora del Trabajo.

c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

**C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo la pasante: Sarita Marquez Marcial código 193199669 con el título: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LÍNEAS TRANSPÓSANTES DE *Arabidopsis thaliana* QUE RESPONDEN A LA INFECCIÓN CON *Begomovirus* AUTÓCTONOS DE MÉXICO”** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos la atención que se sirva brindar a al presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., 05 de Marzo de 2004

EL DIRECTOR DE TESIS



EL ASESOR DE TESIS

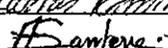

Dr. Rafael Rivera Bustamante

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


Dra. Anne Santerre Lucas

SINODALES

- 1.-Dr. Carlos Alvarez Moya
 - 2.-Dr. Carlos Beas Zarate
 - 3.-Dr. Carlos Ramirez Serrano
- Suplente Anne Santerre Lucas


01/03/04
Carlos Ramirez Serrano 09/03/04


El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. CINVESTAV, Irapuato.

La investigación fue apoyada por el proyecto CONACYT número 36436 B, titulado "*Arabidopsis thaliana* y trampas génicas para el estudio de la interacción geminivirus-planta.

La tesis fue dirigida por el Dr. Rafael Rivera Bustamante y asesorada por la Dra. Anne Santerre Lucas.

DEDICATORIA

A mi padres y hermanos porque en todo momento aún en los mas críticos siempre han estado conmigo. A David y a Margarita por su cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi compañera de trabajo Diana Lilia Trejo por su apoyo e inigualable ayuda para la elaboración de este trabajo, así mismo un agradecimiento muy especial a mi querido compañero de laboratorio Juan Carlos Vaca y a su ahora esposa Karina por todas sus recomendaciones y apoyo brindados.

Agradezco a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio por su apoyo y cariño durante mi estancia en ciudad de Irapuato. Gracias Jimena, Miguel, Rigoberto, Ilenia, Isabel, Adrián, Alicia, Harumi, Edgar, Esmeralda.

Un agradecimiento al laboratorio de transformación en especial a Rosa María Rangel y José Luis Cabrera. Al laboratorio de secuenciación a Bety Jiménez y a mi querido amigo Memo Corona.

Agradezco al laboratorio de Apomixis todo el apoyo brindado en especial a mis amigos Wilson y Gerardo.

Un reconocimiento muy especial a mi director de tesis por su apoyo y confianza brindados así mismo a mi asesora y sinodales por todas sus puntuales observaciones.

Agradezco al CINVESTAV Irapuato la oportunidad brindada para realizar mi trabajo de tesis.

RESUMEN

La familia *Geminiviridae* representa un grupo de virus muy diverso que causa graves trastornos a la producción agrícola. Esta familia integrada por el único grupo de virus de plantas superiores que tiene dos partículas que semejan dos poliedros regulares idénticos unidos por uno de sus lados, es una de las dos familias que presenta un genoma circular de ADN de cadena sencilla, en relación con su genoma los geminivirus se dividen en monopartitas (MPs) y bipartitas (BPs) dependiendo si su genoma lo compone uno o dos moléculas de ADN. Estos virus además están conformados por una sola proteína estructural (proteína de la cápside PC) y todos replican su genoma en asociación a una proteína (proteína de replicación Rep) mediante un mecanismo de círculo rodante (MCR) (Saunders, 1991).

Debido a los serios problemas contraídos por una enfermedad conocida como el "rizado amarillo" se aisló y clonó un geminivirus BP nombrado *virus huasteco del chile* PHV.

El presente trabajo forma parte de un proyecto que tiene como objeto la caracterización molecular de líneas transposantes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Lansberg erecta*; dichas líneas tienen insertados un transposon, un gen reportero *uidA* y un gen de resistencia a kanamicina (*NPTII*). Con ello se pretende conocer aquellos genes endógenos que son expresados o en su caso reprimidos por algún gen viral. Los genes virales subclonados en el presente trabajo están involucrados en la replicación viral de PHV. Sin duda alguna el conocimiento y la experiencia abordados aquí sentarán las bases para los sucesivos estudios de expresión.

INDICE

CONTENIDO	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- ANTECEDENTES	
II.1.-PROBLEMÁTICA, IMPACTO ECONOMICO Y PRINCIPALES HOSPEDANTES.	2
II.2.-GENERALIDADES SOBRE VIRUS	6
II.3.-IMPORTANCIA	6
II.4.-TAXONOMIA	7
II.5.-GEMINIVIRUS	7
II.6.-SINTOMATOLOGÍA	11
II.7.-GENOMA BIPARTITA	12
II.8.-TRANSMISIÓN Y CICLO DE INFECCIÓN	14
II.9.-MOVIMIENTO VIRAL	15
II.1.0.-REPLICACIÓN	16
II.1.1.-TRANSCRIPCIÓN	18
II.1.2.-CLONAS VIRALES USADAS	19
II.1.3.- <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	20
II.1.4.-TRANSPOSONES	21
II.1.5.- MUTAGENESIS EN <i>Arabidopsis</i> ENHACER TRAP Y GENE TRAP	22
III.- JUSTIFICACIÓN	23

IV.- HIPÓTESIS	23
V.- OBJETIVOS	24
VI.- MATERIALES Y METODOS	
VI.1.- Selección de líneas transposantes de <i>Arabidopsis</i>.	25
VI.1.1.-Desinfección de semillas.	25
VI.1.2.-Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis</i> .	25
VI.1.3.-Preparación de partículas de tungsteno.	25
VI.1.4.-Ensayos de biobalística.	26
VI.1.5.-Análisis de la <i>β-glucoronidasa</i> .	26
VI.2.-Aislamiento y clonación de Rep y REN de PHV	
VI.2.1.-Diseño de oligonucleotidos.	27
VI.2.2.-Condiciones de PCR para amplificar Rep y REN de PHV.	28
VI.2.3.-Biotransformación con <i>E. Coli</i> .	29
VI.2.4.-Vectores de clonación.	30
VI.2.5.-Extracción de ADN plasmídico.	30
VI.2.6.-Ligación de Rep a PBI-121.	30
VI.2.7.-Restricción enzimática.	31
VI.2.8.-Secuenciación de construcciones.	31
VI.2.9.- Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	31
VI.3.- Pruebas de infectividad en Tabaco.	
VI.3.1.- Condiciones de bombardeo	31
VII.- RESULTADOS	
VII.1.- Selección de líneas transposantes susceptibles	32
VII.2.- Aislamiento y clonación de Rep y REN de PHV	33
VII.3.- Pruebas de infectividad	35
VIII.- DISCUSIÓN	37
IX.- CONCLUSIONES	39
X.- LITERATURA CITADA	40
XI.- ANEXO	46
XII.- LISTA DE ABREVIATURAS	54

INDICE DE CUADROS

I. Características sintomatológicas de virus.	5
II. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i> .	7
III. Organización genómica de geminivirus.	10
IV. Nomenclatura estándar para genes y proteínas de geminivirus.	13
V. Secuencias de oligonucleótidos para amplificar Rep y REN de PHV.	28
VI. Condiciones de PCR.	28

INDICE DE FIGURAS

1) Dibujo esquemático de los geminivirus.	8
2) Micrografía electrónica de un <i>Mastrevirus</i> .	8
3) Dibujo esquemático de la replicación de geminivirus en la célula vegetal.	10
4) Organización genómica de virus bipartitas.	11
5) Transmisión de geminivirus.	15
6) Esquema del sitio de corte en la horquilla del componente A y del componente B.	17
7) Dibujo esquemático de los MLA's del <i>virus huasteco del chile</i> (PHV).	20
8) Influencia del gen <i>activador</i> de la transposasa (Ac) sobre el gen <i>Disociador</i> (Ds).	22
9) Dibujo esquemático de una pistola de baja presión.	26
10) Diagrama del vector pCR [®] 4-TOPO [®]	29
11) Diagrama del vector pBI 121.	30

INDICE DE FOTOS

1.-Análisis histoquímico de plantas infectadas.	32
2.-Plantas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculadas con CabLCV	32
3.-Selección de transposantes en medio MS.	33
4.-Tabacos planta sana y planta infectada con la mezcla PHV- PepGMV.	36
5.-Acercamiento de la planta infectada con la mezcla PHV-PepGMV.	36

INDICE DE GELES

1.- Miniprep, digestión y PCR de REN	34
2.-Restricción enzimática con Eco RI	34
3.-Restricción enzimática con Xba I y Sac I.	34
4.- Restricción enzimática con Xba I y Sac I a pBI 121	35
5.- Purificación de bandas con el sistema GENE CLEAN	35

INDICE DE MAPAS

1.- Distribución de geminivirus en cultivos de tomate en los años 1970's.	3
2.- Distribución de geminivirus en cultivos de tomate en los años 1990's.	4

INDICE DE PROTOCOLOS

1) Protocolo de desinfección de semillas de <i>Arabidopsis</i> .	46
2) Protocolo de preparación de partículas de tungsteno.	46
3) Protocolo de preparación de partículas de tungsteno con el ADN viral.	47
4) Protocolo de establecimiento de células calcio competentes de <i>Escherichia coli</i> .	47
5) Protocolo de biotransformación de <i>E. Coli</i> mediante choque térmico.	48
6) Protocolo de extracción de ADN plasmídico (miniprep birboim)	48
7) Protocolo de extracción de ADN plasmídico (maxiprep de quiagen)	49
8) Protocolo de recuperación y purificación de bandas.	50
9) Protocolo de ligación pBI 121-Rep.	50
10) Protocolo de ligación pMON 969-REn	51
11) Protocolo modificado (DNAzol) para la extracción de ADN genómico.	51

I INTRODUCCIÓN

Los virus que infectan plantas presentan en su mayoría un genoma compuesto de ARN sin embargo existen grupos como los geminivirus, caulimovirus y los nanovirus cuyo genoma esta compuesto por moléculas de ADN.

El primer grupo representa una familia muy diversa de virus patógenos de plantas y constituyen la segunda familia más grande de virus de plantas. Capaces de infectar una amplia variedad de plantas de interés agro-económico (maíz, tabaco, tomate, frijol, yuca, chile, papa, papaya), causando graves pérdidas en cultivos de zonas tropicales y subtropicales del mundo.

Los geminivirus se caracterizan por presentar una morfología vista al microscopio electrónico de dos poliedros regulares idénticos unidos por uno de sus lados y por presentar un genoma compuesto de ADN de cadena sencilla que depende de la maquinaria biosintética de su hospedante por lo tanto estos patógenos son altamente dependientes de su hospedante para poder replicar y expresar sus genes mediante una cadena doble de ADN, por un mecanismo de círculo rodante (MCR). Las moléculas de doble cadena son consideradas intermedias para la replicación viral llamadas formas replicativas (FRs), esto sugiere que la replicación sigue un mecanismo de círculo rodante (Fontes *et al.*, 1994; Orozco *et al.*, 2000) similar a la del fago ϕ x 174, estudios de microscopia así lo confirman (Jeske *et al.*, 2001).

Los geminivirus requieren de pocos factores para su replicación y encapsidación, estos virus son dependientes del ADN nuclear y de las ARN polimerasas de la planta hospedante (Hanley-Bowdoin, *et al.*, 1999).

En este sentido el presente trabajo consistió en el aislamiento de genes de expresión temprana; involucrados en la replicación y acumulación de ADN viral así como la expresión génica de plantas de *Arabidopsis*.

II ANTECEDENTES

II.1.-PROBLEMÁTICA, IMPACTO ECONOMICO Y PRINCIPALES HOSPEDANTES

Las plantas en su entorno natural se ven influenciadas por factores abióticos como las sequías, inundaciones y heladas así como factores bióticos tales como plagas y enfermedades provocadas por diversos patógenos pertenecientes a distintos reinos, tanto bacterias, hongos e insectos han propiciado pérdidas parciales o totales en los cultivos. Sin embargo las enfermedades que son ocasionadas por virus han despertado un mayor interés en las distintas áreas de investigación debido a que en términos prácticos las enfermedades provocadas por virus no son reversibles.

Los geminivirus pertenecen a un grupo de virus que ocasionan enfermedades severas particularmente en yuca, maíz y otros cereales. Son fitopatógenos versátiles que infectan monocotiledóneas como el maíz hasta dicotiledóneas como el tomate. Aproximadamente son al menos 39 naciones las que se ven afectadas por serias enfermedades en cultivos de tomate, algodón y yuca. Tan solo a principios de los 90's las pérdidas en cultivos de tomate eran del 95% en la Republica Dominicana (Simón, 1999). En Florida ascendieron a 140 millones de dólares las pérdidas en cultivos de tomate ocasionadas por el *virus moteado del tomate* ToMoV. La industria del tomate se vio seriamente afectada desde la década de los 80's en Florida, el Caribe, México, América Central, Venezuela y Brasil. El *virus del enrollamiento amarillo del tomate* TYLCV ha provocado pérdidas de hasta el 100% en cultivos de tomate en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Polston y Anderson, 1997) (mapa II).

Desde 1970 han sido reportadas enfermedades producidas por el *virus chino del tomate* CdTV en el Noroeste de México (mapa I), tanto en cultivos de tomate como de chile. En años siguientes se han detectado y caracterizado otros virus como PHV y PepGMV lo que ha complicado no solo la detección y diagnóstico sino también el manejo de las enfermedades. En los últimos años la detección de CdTV ha disminuido lo que sugiere un desplazamiento por otros geminivirus (Polston y Anderson, 1997).

México es considerado uno de los tres productores de chile más importantes en el mundo, sin embargo sufre pérdidas entre el 20 % y 100 % debido a varias enfermedades que son provocadas principalmente por geminivirus (Garzón-Tiznado *et al.*, 1989 citados por Anaya-López *et al.*, 2003; Godínez-Hernández *et al.*, 2001). En nuestro país los geminivirus afectan cultivos de importancia económica como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* M.), chile (*Capsicum annum* L.) y calabaza (*Cucúrbita pepo*) (Torres *et al.*, 1996

citado por De la Torre-Almaraz 2002). Los virus identificados en cultivos de tomate son: *virus chino del tomate CdTV*, *virus de la hoja enrollada del tomate Sinaloa STLCV*, y el *virus de la hoja arrugada del tomate TLCV*, en Chile el *virus del mosaico dorado del chile PepGMV* antes nombrado TPV y el *virus huasteco del chile PHV* (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993 citados por De la Torre Almaraz 2002). Las regiones productoras de chile y tomate en México presentan frecuentemente infecciones individuales de estos virus así como la mezcla natural de PHV-PepGMV siendo esta la productora de síntomas más severos.

En Jalisco, Guanajuato y San Luis Potosí se han detectado la presencia de estos geminivirus bipartitas (PHV y PepGMV) siendo *Solanum rostratum* el hospedante más importante en términos epidemiológicos (Garzón-Tiznado, 2002).

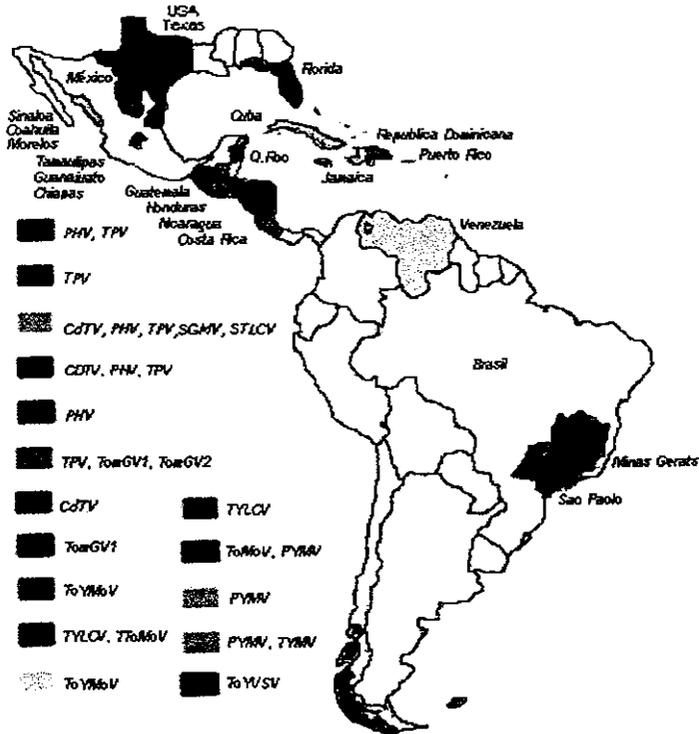


Mapa I.- Distribución en el continente americano de geminivirus en cultivos de tomate en los años 1970's

El virus huasteco del chile (PHV) ha sido también detectado en los EU al igual que el virus del mosaico dorado de chile (PepGMV). En el hemisferio occidental los geminivirus significaron el principal problema en la producción de leguminosas (Polston y Anderson, 1997).

PepGMV provocó una severa malformación de hoja y un mosaico amarillo en chile tabasco (*Capsicum frutescens*) y chile habanero (*C. chinense*) en 1997 al occidente de Costa Rica (Pongtharin *et al.*, 2000)

El virus del enrollamiento de hoja de tomate TYLCV fue primero descrito en 1964 en una región de Israel y después introducido accidentalmente a la República Dominicana subsecuentemente reconocido en Cuba y Jamaica (Nakhia *et al.*, 1994 citado por Polston y Anderson, 1997); este es un ejemplo de un virus del viejo mundo introducido al nuevo mundo (mapa II).



Mapa II.-Distribución de geminivirus en cultivos de tomate en el continente americano en los años 1990s. Designaciones temporales identificadas en Guatemala (TomGV1, TomGV2), Honduras (TomGV1) y Nicaragua (TomGV1). Datos tomados de Polston y Anderson, 1997.

El virus del mosaico amarillo de la papa PYMV fue descrito por primera vez en 1986 en cultivos de papa en Venezuela. Este virus al igual que el TPV, PHV, CdTV han sido detectados en cultivos de chile en México (cuadro I)

Cuadro I

Características sintomatológicas de virus que infectan cultivos de tomate en el hemisferio oeste (Datos tomados de Polston y Anderson, 1997).

VIRUS	DISTRIBUCIÓN CONOCIDA	SÍNTOMAS EN TOMATE
CdTV	México (Sinaloa)	Mosaico amarillo, enchinamiento severo de la hoja y reducción en el fruto
PHV	México (Guanajuato Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas), U.S. (Texas) Prácticamente en todo el país	Aclaración de venas, ligera distorsión de hojas, clorosis.
PYMV	Venezuela, Puerto Rico, Trinidad Tobago.	Moteado clorótico, enrollamiento de la hoja.
STLCV	México (Sinaloa)	Clorosis foliar, encurvamiento de la hoja, acortamiento de los internodos
TTMoV	Cuba	Rugosidad, deformación y enrollamiento de la hoja.
TPV, PJV	México (Coahuila, Sinaloa, Tamaulipas), Guatemala, U.S. (Arizona, Texas) Prácticamente en todo el país.	Mosaico, enrollamiento de la hoja.

Se han reportado diecisiete geminivirus en el hemisferio occidental y cinco de ellos se han detectado en México (Polston y Anderson 1997).

La severidad de síntomas varía de acuerdo a la cepa viral que se trate, a la genética del hospedante, a la época de infección, a la fisiología de la planta y al estado de desarrollo debido que plantas infectadas en etapas tempranas frecuentemente son infrutecentes por lo que la reducción en la producción y calidad de frutos es muy común. Las pérdidas son particularmente más severas cuando la infección se da antes de la floración (Pico *et al.*, 1996). Además la incidencia, severidad y propagación de la enfermedad tiene variaciones estacionales significativamente correlacionadas con fluctuaciones en la población del insecto vector (Cohen, 1988).

En regiones del Mediterráneo la incidencia de virosis es particularmente importante en verano y otoño después de periodos de temperatura alta y baja humedad favorables para el desarrollo del vector. Bajo adecuadas condiciones de propagación de la enfermedad, las proporciones epidémicas conllevan al abandono de cultivos en muchas regiones (Pico *et al.*, 1996).

Los principales factores de propagación de nuevos geminivirus son las variantes evolutivas de los virus además de la aparición del biotipo B de mosca blanca así como el incremento en las poblaciones del vector. La recombinación genómica no solo entre variantes del mismo virus sino también entre especies y géneros ha propiciado una rápida diversificación (Varma, 2003).

Las especies a las que estos fitopatógenos producen serias enfermedades pertenecen a distintas familias como son Solanaceae, Leguminosae, Cucurbitaceae, Caprifolaceae y Compositae principalmente. Particularmente los *Begomovirus* son el subgrupo que posee un amplio espectro de hospedantes, pues infectan cultivos agrícolas como: el maíz, caña de azúcar, tabaco, remolacha, tomate, frijol, yuca, algodón, melón, chile, papa, sandía, calabaza, papaya, camote y soya. Hoy día se continúa investigando la posible infección en nuevos hospedantes.

II.2.-GENERALIDADES SOBRE VIRUS

Los virus (considerados como el paquete de una o más moléculas de ARN (ácido ribonucleico) o ADN (ácido desoxiribonucleico) de cadena sencilla o doble que normalmente se encuentra encapsidada por cubiertas de proteínas o lipoproteínas) son endoparásitos intracelulares obligados, pues requieren de una célula hospedante susceptible para poder llevar a cabo su ciclo de vida (Vega y Rivera 2001). Existe una gran diversidad de virus vegetales, de los cuales han sido reconocidas aproximadamente 45 familias entre las cuales el 85% contiene ARN en su genoma mientras que el 15% restante contiene ADN.

Desde un enfoque económico el grupo de los geminivirus y los potyvirus se han convertido en los dos grupos más importantes debido a las pérdidas ocasionadas en los cultivos. Estos dos grupos presentan una diferente composición genómica, mientras que los potyvirus presentan un genoma constituido por ARN, los geminivirus están constituidos por una o dos moléculas de ADN de cadena sencilla.

II.3.-IMPORTANCIA

El análisis de virus de ADN en animales ha contribuido significativamente para entender la replicación de ADN, transcripción y regulación del ciclo celular en mamíferos. Los geminivirus por otra parte, han resultado ser excelentes modelos de estudio para comprender los procesos celulares en plantas. La importancia del estudio de los geminivirus en el ámbito biológico radica en que ha permitido profundizar en los estudios de la interacción planta-patógeno, en eventos bioquímicos de la célula vegetal así como en procesos involucrados en el ciclo celular e incluso han aportado información en procesos de apoptosis (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Reportes recientes proveen importantes conocimientos acerca de la estructura y función del origen de replicación de estos virus.

Las pocas proteínas necesarias para su replicación y encapsidación, su pequeño tamaño y su relativa sencillez en la organización de su genoma convierten a lo geminivirus en el marco conceptual para estudios de biología molecular de plantas y en excelentes modelos de estudio de procesos bioquímicos.

II.4.-TAXONOMIA

La clasificación en un inicio fue de acuerdo a la sintomatología desarrollada pero debido a las variantes en la sintomatología relacionada con distintos factores resulto ser muy imprecisa y poco confiable razón por la cual se opto por clasificarlos sobre la base de otras características; la familia Geminiviridae esta conformada hasta el momento por cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* y *Topocuvirus* (cuadro II)

Cuadro II.

Clasificación de la familia Geminiviridae, los virus tipo son reconocidos por sus iniciales en ingles.

GENEROS	ORGANIZACIÓN GENOMICA	RANGO DE HOSPEDANTES	INSECTO VECTOR	VIRUS TIPO
Mastrevirus	Monopartita	Monocotiledóneas	Chicharritas	Virus del estriado del maíz (MSV)
Curtovirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Chicharritas	Virus del encrespado de betabel (BTCV)
Begomovirus	Monopartita o bipartita	Dicotiledóneas	Mosca blanca	Virus del mosaico de frijol (BGMV)
Topocuvirus	Monopartita	Dicotiledóneas	Saltamontes	Virus del pseudo enrollamiento del tomate (TPCTV)

Son de particular interés para los Taxónomos la región común, la región intergénica, la región que codifica para la proteína de la cápside y la proteína asociada a la replicación.

II.5.-GEMINIVIRUS

El nombre deriva de la morfología de su partícula, pues vista al microscopio electrónico se aprecia una partícula asemejando dos poliedros gemelos o geminados unidos por uno de sus lados (Rivera *et al.*, 1997). Los geminivirus se caracterizan también por presentar un pequeño genoma de aproximadamente 2.5 a 3 kiloparesbases (kpb).

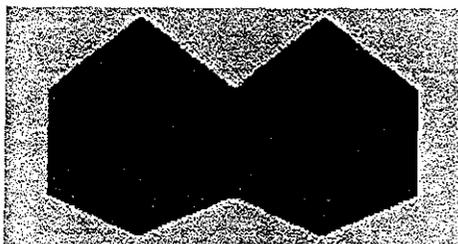


Fig. 1

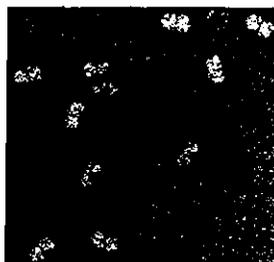


Fig. 2

Figura 1.-Dibujo esquemático de los geminivirus, la estructura de la partícula consiste de dos poliedros geminados unidos por uno de sus lados. Figura 2.- Micrográfca electrónica de un *Mastrevirus*, *Virus del mosaico estriado de chloris* (CSMV) infectando una gramínea (tomada de Francki RIB, Milne RG, Hatta T. 1985. *Atlas of Plant Viruses*. CRC Press).

Respecto a su diversidad la familia Geminiviridae esta conformada hasta el momento por cuatro géneros que difieren en el insecto vector, la clase a la que pertenece la planta hospedante y a la estructura genómica del virus (Fauquet, 2003; Rybicki, 1994 citado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

Mastrevirus

El primer género llamado *Mastrevirus* lo integran virus transmitidos por chicharritas, los cuales infectan principalmente a miembros de la clase *Liliopsida* o plantas monocotiledóneas, con excepción de *virus del enanismo amarillo de tomate* (TYDV) y el *virus del enanismo amarillo de frijol* (BeYDV) que infecta especies de la clase *Magnoliopsida* o plantas dicotiledóneas; su genoma lo compone un solo elemento que lo caracteriza como monopartita (MP). La especie tipo es el *virus del estriado de maíz* (MSV), este virus de 2687 nucleótidos presenta cuatro regiones codificantes y dos regiones inter-génicas, una región intergénica larga y otra región intergénica pequeña (RIL y RIP) (Cuadro III).

Curtovirus

Los *Curtovirus* integran el segundo género y es también transmitido por chicharritas y su genoma es MP, pero la clase a la que pertenece la planta hospedante es *Magnoliopsida* o plantas dicotiledóneas. El virus tipo es el *virus del enrollamiento apical de la remolacha* (BCTV) con 2993 nucleótidos; este virus presenta tres marcos de lectura abierta (MLA) en sentido del virión, V1 que codifica para la proteína de la cápside, V2 que regula los niveles de la doble y la cadena sencilla de ADN y V3 que facilita el movimiento viral de célula a célula. BCTV presenta otros cuatro MLAs en sentido complementario, C1 que codifica para la proteína de replicación Rep, C3 que aumenta la tasa de replicación, C4 que puede iniciar la división celular. De C2 se desconoce la función de su producto.

Begomovirus

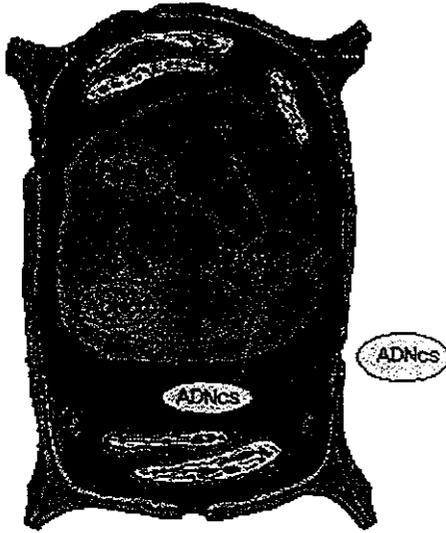
Los *Begomovirus*, son el tercer género y es el más grande de la familia, incluye virus transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), los cuales infectan dicotiledóneas cuyo genoma es generalmente bipartita (BP) aunque también existen monopartitas como el *virus del enrollamiento amarillo de tomate* (TYLCV). La secuencia nucleotídica de los dos componentes es diferente con excepción de una región no codificante llamada región común, la cual es idéntica para los dos componentes pero difiere entre especies. La especie tipo es el *virus del mosaico dorado del frijol* (BGMV).

Topocuvirus

Existe muy poca información referente al cuarto género conocido como *Topocuvirus*, en cuanto a la organización de su genoma se refiere este subgrupo presenta una gran similitud a los *Curtovirus* por lo que se cree que surgieron de estos. Los *Topocuvirus* infectan dicotiledóneas y presentan un genoma MP pero a diferencia de los *Curtovirus* el agente transmisor es un ortóptero *Micrutalis malleifera*. La especie tipo es *virus del pseudo-enrollamiento de tomate* (TPCTV) (Matthew's y Hull, 2000).

Los geminivirus en general contienen marcos de lectura abierta (MLA) dispuestos y transcritos de manera divergente con respecto a una región intergénica no codificante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1989). La organización genómica de los geminivirus BPs es muy similar. Los genes son denotados según la posición que ocupan en el genoma A o B, además de una V si esta en sentido del virión ó C si esta en sentido de la cadena complementaria y finalmente se numeran en forma secuencial. Los componentes genómicos son transcritos bidireccionalmente, uno o dos en sentido de la cadena positiva o del virión (v), y tres o cuatro en sentido de la cadena negativa o complementaria (c). Ambos componentes son requeridos para una infección sistémica (Rogers *et al.*, 1986) y se encuentran encapsidados por separado en partículas icosaedras incompletas conformadas con un total de 22 capsómeros pentaméricos (Hamilton *et al.*, 1983); en el componente A se encuentran las secuencias codificantes para proteínas involucradas en la replicación y encapsidación del ADN viral y en el componente B están las secuencias necesarias para el movimiento de partículas virales intra y extracelular (Rogers *et al.*, 1986).

Los geminivirus consisten en un 80% de proteína de un solo tipo de aproximadamente 30 KD. La doble estructura icosaedra esta compuesta de subunidades con un total de 22 capsómeros por partícula (Pico *et al.*, 1996). Estos patógenos son capaces de inducir la maquinaria de replicación de ADN en células de plantas maduras (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). Una vez dentro de la célula hospedante el ADN viral se desencapsida y entra al núcleo celular e inicia la síntesis de la cadena complementaria por lo que se genera la forma replicativa (FR) (fig. 3).



Primero la cadena sencilla de ADN es convertida a doble cadena con participación de los factores celulares. Luego la cadena doble sirve de templado para la expresión de genes virales o puede iniciar la fase de círculo rodante con participación de factores celulares y productos de la nueva cadena de ADNcs, ello dependerá de la célula huésped.

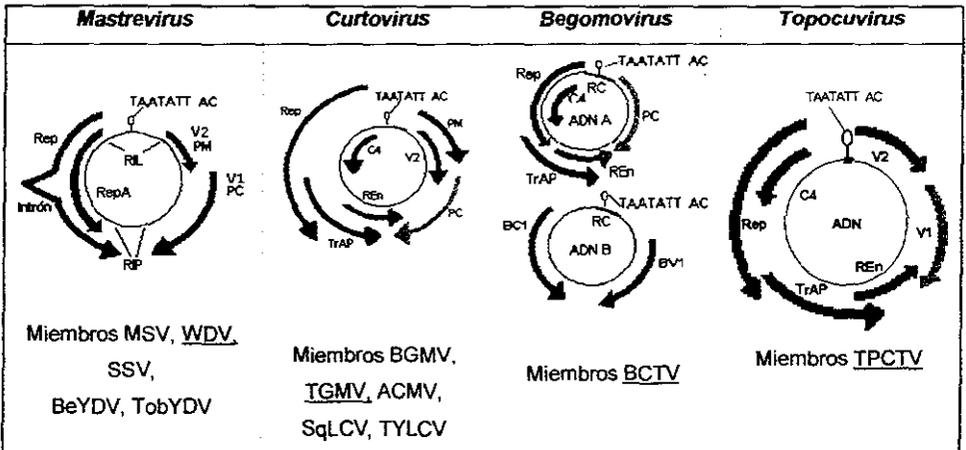
La cadena sencilla de ADN se asocia con la proteína de la cápside para salir fuera del núcleo y después fuera de la célula a través de plasmodesmos (Gutiérrez, 2000).

Fig. 3.- Dibujo esquemático de la replicación de geminivirus en la célula vegetal.

Los *Mastrevirus* son los únicos que contiene dos regiones reconocidas por su tamaño, una región intergénica larga y otra pequeña (RIL y RIP) (cuadro III).

Cuadro III

Organización genómica de geminivirus. Los genes orientados de forma divergente con respecto a un región intergenica que incluye un nonúmero conservado donde existe un sitio de corte para iniciar la replicación. (Tomado de Gutiérrez, 2000)



Los *Mastrevirus* a través de la remoción de intrones del ARN mensajero, transcrito a partir de C1 y C2 que se encuentran traslapados, generan una proteína Rep que es homóloga a la sintetizada por virus bipartitas. Otra proteína también detectada es RepA la cual posiblemente esta involucrada en la regulación de Rep. Los *Mastrevirus* además tienen una molécula iniciadora (cebador) de la síntesis de la cadena complementaria, dicha molécula esta asociada a la región intergénica pequeña (SIR). Los MLAs Rep y RepA se encuentran en sentido complementario denotados respectivamente como C1 y C2. En sentido del virión se encuentran V1 y V2, el primero es necesario para producir la proteína de la cápside y el segundo para el movimiento y desarrollo de síntomas. Los MLAs de *Curtovirus* y *Begomovirus* monopartitas guardan una estrecha homología en cuanto a la disposición de los genes C1, C2 y C3 y en cuanto a los productos proteicos que generan Rep, TrAP y REIn con respecto a la de virus bipartitas. En sentido del virión los genes de *Curtovirus* y *Begomovirus* son muy similares a la de *Mastrevirus* puesto que V1 y V2 tienen la misma función.

II.6.-SINTOMATOLOGÍA

Los efectos visibles de la infección viral son considerados como la sintomatología que desarrolla la planta a partir de introducción del patógeno, pudiendo ser estos a nivel de crecimiento ó metabólico del hospedante. Los síntomas en un principio eran la base para la clasificación y diagnóstico de la virología y precisamente debido a que los síntomas varían de acuerdo a la cepa o mezcla de cepas virales, al estado de desarrollo de la planta y de acuerdo a las condiciones ambientales fue que resultaba impreciso y poco confiable por lo que se optó por clasificarlos de acuerdo a las características mencionadas antes.

Los cambios provocados por estos fitopatógenos comienzan con la replicación lo cual altera el metabolismo celular de la planta denotándose en cambios fisiológicos y bioquímicos. La denotación puede ser macroscópica cuando son claramente visibles o microscópica cuando los cambios internos solo son visibles por técnicas de microscopía.

El moteado clorótico, mosaico amarillo, clorosis foliar, enrollamiento foliar, abultamientos, reducción de área foliar, enanismos y reducción de los frutos son algunos de los síntomas macroscópicos provocados por geminivirus (Polston y Anderson, 1997).

Un ejemplo de geminivirus bipartita es el *virus del mosaico dorado de tomate* (TGMV) descrito por primera vez en 1975 por Matyis *et al.*, este fue aislado inicialmente en plantas de tomate y posteriormente de varias especies de *Nicotiana* incluyendo *N. benthamiana*, BGMV es un virus genéticamente cercano a TGMV y ambos infectan *N. benthamiana* sin embargo solo TGMV esta bien adaptado a este hospedante puesto que BGMV invade solo floema de hojas infectadas sin embargo TGMV invade el tejido mesófilo (Morra y Petty 2000). Estudios previos señalan que existe un proceso de adaptación de las proteínas de movimientos en BGMV y TGMV a su hospedante (Gillette *et al.*, 1998) sin embargo no son el único factor determinante de los fenotipos desarrollados en el hospedante. Los síntomas provocados por TGMV son el

enchinamiento extremo de sus hojas, aclaración de venas y un patrón característico de mosaico dorado que algunas veces inicia en la base de hojas maduras. Otro geminivirus bipartita es el *virus huasteco del chile* PHV que ocasiona amarillamientos que inician a partir del pecíolo y se extiende por el área foliar, produciendo enchinamientos visibles. Además el PHV mantiene sinergismo con otro virus bipartita conocido como el *virus del mosaico dorado del chile* PepGMV el cual produce un síndrome llamado "rizado amarillo". Esta mezcla suele ser comúnmente encontrada de forma natural y produce síntomas mas severos que la ocasionada de manera individual.

II.7.-GENOMA BIPARTITA

Dentro del género *Begomovirus* se encuentran todos los virus que presentan un genoma bipartita es decir su genoma lo integran dos moléculas de ADN que son denominados ADN-A y ADN-B cabe señalar que se requiere de ambos componentes (Rogers *et al.*, 1986), para generar un infección sistémica aun cuando ambos componentes son encapsidados por separado (Hamilton *et al.*, 1983). El género *Begomovirus* es el mas grande de la familia *Geminiviridae* y dentro de este género se encuentran virus con un genoma por lo general BP y algunos con genoma MP.

Los virus con genoma BP presentan dos componentes que difieren en su secuencia nucleotídica excepto por una región común (RC) de aproximadamente 200 nucleótidos, donde se encuentran secuencias requeridas para la replicación de ADN viral. El ADN genómico contiene secuencias codificantes divergentes separadas por una región intergénica, la región intergénica es de aproximadamente 80 b y se encuentra dentro de la RC.

Los análisis y comparaciones de secuencias de varios geminivirus han revelado que la organización de sus genes es conservada (Hamilton *et al.*, 1984). Los genes se encuentran dispuestos de manera divergente con respecto a un región intergénica no codificante, estos genes se denominan de acuerdo al componente que pertenecen, al sentido en que se orienta la cadena y a la secuencia con respecto a la RI (cuadro IV).

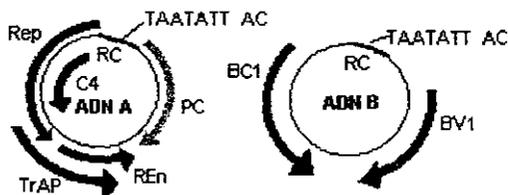


Fig. 4.- Organización genómica de virus bipartitas (TGMV) mostrando los MLAs traslapados con dos tipos de nomenclaturas.

Sin embargo recientemente se ha pretendido nombrarlos de acuerdo a la función del producto proteico, hecho que causa confusiones e imprecisiones puesto que aunque existen homologías algunas proteínas tienen más de una función.

Cuadro IV

Nomenclatura estándar para genes y proteínas de geminivirus con su correspondiente nomenclatura alternativa. La nomenclatura utilizada en el presente trabajo es la sugerida por Van Regenmontel, 1997.

GEN	FUNCIÓN	NOMENCLATURA ALTERNA
Rep	Involucrada en la replicación.	C1, AC1, AL1.
TrAP	Transactiva los genes AV1 y BV1.	C2, AC2 ó AL2 y BR1
REn	Potenciadora de la replicación.	C3, AC3, AL3
AC4	Función desconocida	C4, AC4, AL4
PC	Proteína de la cápside	V1, AV1, AR1
BC1	Proteína de movimiento y síntomas	BC1, BL1
BV1	Proteína de movimiento	BV1, BR1

Estudios en TGMV han demostrado que toda la información necesaria para la replicación y encapsidación se encuentran en el componente A. El componente B no puede replicarse en ausencia del componente A pero este componente es requerido para el movimiento sistémico y la producción de síntomas (Rogers *et al.*, 1986; Sunter *et al.*, 1987).

Una proteína requerida para la expresión de los genes que están orientados en sentido del virión del componente A y B; es decir PC y BV1, es la proteína TrAP dicha expresión ocurre primero en el ámbito de transcripción esto explica la carencia de infectividad en mutantes de TrAP (Sunter, y Bisaro, 1991, 1992, 1997).

La proteína implicada en la encapsidación viral no es necesaria para una infección sistémica, entendiéndose por infección sistémica aquella en la que el virus es capaz de moverse dentro y a través del sistema vascular de su hospedante (Pascal, 1993 citado por *Noueiry et al.*, 1994).

La proteína de la cápside PC está codificada por un marco de lectura abierto que va en el sentido del V. Durante la infección es la proteína más abundante. Esta proteína además de resguardar el genoma viral juega un papel importante en la especificidad con el insecto vector, trabajos de homología entre las secuencias de las proteínas de la cápside de virus transmitidos por *Bemisia tabaci* así lo confirman, además la baja homología entre los MLAs de la PC de los BCTV, MSV y WDV que tienen diferente vector reafirman esta idea (Stanley, 1986). Trabajos reportados en *Nicotiana benthamiana* revelan que la proteína de la cápside no es requerida para la replicación viral o desarrollo de síntomas con TGMV (Gardiner *et al.*, 1988), sin embargo

juega un papel esencial en la infección y propagación del virus en CaMV (Daubert *et al.*, 1983 citado por Gardiner *et al.*, 1988); algo similar pasa con el *virus del mosaico de tabaco* (TMV) en donde la proteína de la cápside es importante para infectar plantas de tabaco. En *Begomovirus* no es indispensable para desarrollar síntomas pero cuando esta proteína está ausente los síntomas se retardan y se atenúan (Gardiner *et al.*, 1988) al igual que mutaciones en RE_n, los *Curtovirus*, por otro lado si requieren de esta proteína para la producción de síntomas.

La PC también está involucrada en el movimiento del virus dentro de la planta, puede interactuar con la proteína del movimiento para llevar a cabo movimientos intra o extracelulares.

En el componente B se encuentran las secuencias que codifican para proteínas de movimiento. Además estudios de mutaciones en BC1 y BV1 han demostrado la pérdida de infectividad (Lazarowitz, 1992). Existen dos tipos de movimiento, el movimiento de célula a célula y el movimiento a larga distancia a través del floema. La proteína BC1 está involucrada en el movimiento extensivo y ayuda al movimiento del ADNcd de célula a célula a través de plasmodesmos y su tamaño no es un factor limitante.

Por otro lado la proteína BV1 está involucrada en el movimiento del ADNcs y ADNcd fuera del núcleo (Noueiry *et al.*, 1994); BV1 transporta el genoma viral de núcleo a citoplasma, sin embargo existen tres distintos elementos genéticos en TGMV implicados en la invasión a mesófilo (Morra y Petty, 2000; Qin y Petty, 2001).

11.8.-TRANSMISIÓN Y CICLO DE INFECCIÓN

Las interacciones planta-patógeno son altamente específicas lo que sugiere que dichas interacciones son dirigidas por mecanismos específicos de reconocimiento, los mecanismos específicos ocurren a través de señales moleculares entre patógeno y hospedante que determinan si el resultado es el desarrollo de la enfermedad o el desarrollo de mecanismos de resistencia, por lo tanto la capacidad del patógeno de reconocer, invadir y dividirse en la planta hospedante depende de la interacción patogénica.

Existen varios eventos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en la célula de la planta hospedante, una de ellas es la respuesta de hipersensibilidad la cual involucra una rápida muerte celular localizada que conlleva a una necrosis de tejido en el sitio de infección, otra respuesta es la que incluye el engrosamiento de la pared celular alrededor de la región infectada por la deposición de lignina y otros elementos. La acumulación en plantas de ácido salicílico después de una infección actúa como una señal endógena necesaria para la inducción de genes de defensa. Los genes de resistencia confieren al hospedante la capacidad de reconocer un patógeno y producir con ello señales moleculares específicas. Se han desarrollado en el área de la biología de plantas, análisis genéticos de resistencia a enfermedades en *Arabidopsis* para comprender los mencionados eventos (Kunkel 1996).

Cuando los genes de defensa no son inducidos, es decir cuando no hay señales de reconocimiento, los patógenos son capaces de dividirse en su hospedante; a este respecto los

geminivirus para poder llegar a su hospedante, se valen primero de un insecto vector que inocula partículas virales. La transmisión ocurre mediante dos procesos, uno en el que el insecto vector adquiere el virus y otro en el que el virus es adquirido por la planta hospedante. En todos los casos son vectores pertenecientes al orden homóptera con excepción del género recientemente descubierto *Topocuvirus*. Los *Topocuvirus* son transmitidos por saltamontes pertenecientes al orden ortóptera. Las principales familias a las que pertenecen los miembros del orden homóptera son la Cicadelidae o Aleyrodidae, dentro de la primera familia se encuentran distintas especies de chicharritas y en la segunda se encuentra la mosquita blanca, (*Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolli*). Este es precisamente uno de los criterios de clasificación.

II.9.-MOVIMIENTO VIRAL

La transmisión de los geminivirus a través de la mosquita blanca es de tipo circulativo, la transmisión requiere del paso del virus a través del cuerpo del insecto, pasando primero por la hemolinfa y después hacia las glándulas salivares y es mediante las secreciones salivares como se lleva a cabo la inoculación del virus en la planta (Hunter *et al.*, 1998), aunque existen trabajos que demuestran la transmisión transóvarica de un cierto tipo de virus.

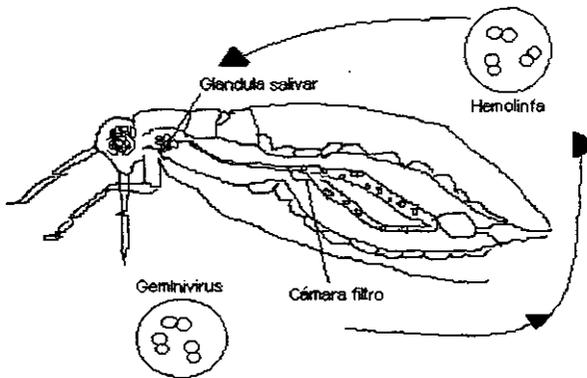


Fig. 5.- Transmisión de geminivirus (tomado de Hunter *et al.*, 1998).

El virus es ingerido a partir de tejido de plantas infectadas y pasa al esófago a través de los estiletes dentro de una cámara filtro donde pasa directo a estas membranas dentro de la hemolinfa. El virus se mueve por la hemolinfa hasta las membranas de las glándulas salivares. Aquí el virus atraviesa la membrana de la glándula salivar y se desplaza por los conductos salivares infectando nuevas plantas.

II.1.1.-REPLICACIÓN

Los geminivirus en general usan el mismo MCR para duplicar y expresar su genoma, este mecanismo tiene dos fases principales; en la fase uno la cadena plus o cadena sencilla sirve como templado para la síntesis de la doble cadena o FR. Durante la segunda fase la FR sirve como templado para la replicación o para la transcripción esto dependerá de la maquinaria biosintética de la célula tal como se describe en la Fig. 3 (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990).

Existe una región común para los geminivirus bipartitas que es idéntica para los dos componentes pero difiere entre geminivirus, esta región común contiene los elementos que controlan el proceso de replicación y transcripción además de contener una zona intergénica esencial para la replicación viral con un repetido invertido rico en GC que tiene el potencial de formar una estructura de tallo y asa, donde se incluye un nonúmero conservada entre todos los geminivirus (Rochester, 1994). En este motivo nonamérico conservado es donde la proteína que inicia la replicación hace un corte para iniciar dicho proceso, el sitio exacto donde hace el corte es TAATATT ↓ AC (Fig. 6).

Estudios bioquímicos demuestran que la síntesis de la cadena plus de ADN inicia dentro de este motivo conservado de la horquilla (Laufs, 1995 citado por Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

En el componente A, se encuentra la secuencia que codifica para la proteína de replicación de ADN viral. A este respecto el presente trabajo consistió en aislar y clonar la secuencia que codifica para la proteína implicada en la replicación viral la cual resulta ser esencial y suficiente para iniciar la síntesis de la doble cadena de ADN. Esta proteína también es suficiente para dirigir la replicación del componente B (Hayes y Buck, 1989, Hanley-Bowdoin *et al.*, 1990) además es requerida para la infección viral. Otra secuencia de interés también aislada fue la secuencia que codifica para la proteína REn, esta juega un papel importante en la acumulación de ADN (Sunter, *et al.*, 1990) a través de un mecanismo aun desconocido (Sunter *et al.*, 1990) y aunque esta no es esencial como Rep (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1989) existen estudios de mutación que señalan que cuando la proteína REn es mutada existe una atenuación y retraso en los síntomas (Elmer *et al.*, 1988). Además Reportes recientes señalan que la proteína REn de TGMV interactúa con Rep y forma oligómeros del mismo modo interactúa con un factor regulador del ciclo celular del hospedante (pRb) (Settlage *et al.*, 2001).

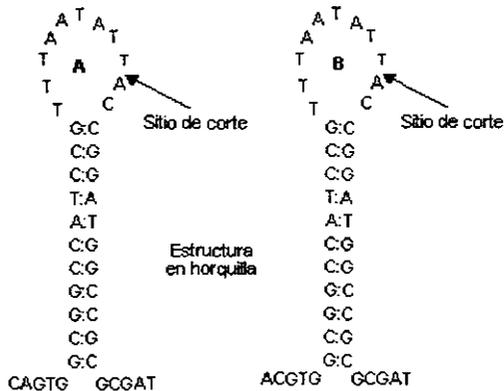


Fig. 6.- Esquema del sitio de corte en la horquilla del componente A y del componente B de TGMV (datos tomados de Hamilton *et al.*, 1984)

La proteína Rep además de estar involucrada en la replicación viral también participa en la transcripción debido a que reprime su propia expresión y puede incrementar la transcripción de genes tardíos en algunos geminivirus, sin embargo, para *Mastrevirus* la proteína C1 es multifuncional puesto que actúa iniciando la replicación y la actividad del promotor de la proteína de la cápside (Hofer, 1992)

Por tanto, el origen de replicación tiene una arquitectura modular que forma dos distintas categorías. Los *Mastrevirus* por su parte, contienen una larga región en *cis* donde la proteína C1 o Rep forma complejos múltiples y los *Begomovirus* por otro lado contienen un sitio de unión a Rep.

Estudios de expresión funcional de Rep en plantas de tabaco con el TGMV demuestran que aunque Rep es suficiente para inducir la replicación de la doble cadena de ADN, no es determinante para la patogénesis (Hanley-Bowdoin, *et al.*, 1990). Sin embargo estudios previos en TGMV demuestran que los productos de Rep, TrAP y REn son requeridos para la infectividad (Elmer *et al.*, 1988).

En los *Begomovirus* y *Curtovirus*, Rep es codificada por un solo marco de lectura abierto en el sentido de la cadena complementaria. Para *Mastrevirus*, Rep es codificada por dos marcos de lectura que son transcritos en un mismo ARN mensajero (Ascencio *et al.*, 1999).

La proteína Rep inicia la replicación introduciendo un corte en la horquilla antes del sitio de corte de Ssp I (TT▼ AC), para dicho corte se requiere un ataque nucleofílico desde el grupo hidroxilo de tirosina 103 de Rep al enlace fosfodiéster entre las 7 y 8 bases de la secuencia nonanucleotídica conservada (secuencia de nueve nucleótidos). Rep debe reconocer una región específica en la región común, esta región es específica para cada geminivirus.

Existen dos modelos que explican la replicación; uno que señala que debe haber dos moléculas de Rep una unida a la cadena y otra que realice el corte final para liberar el

monómero viral. Otro modelo señala que la replicación es discontinua y asume que una sola tirosina de Rep realiza la unión inicial y corte final.

Rep además presenta cuatro secuencias aminoacídicas altamente conservadas el motivo II parece estar relacionada con la unión a iones metálicos, el motivo III contiene tirosina conservada implicada en el corte de ADN, el motivo IV sitio de unión a nucleósidos trifosfatos, el motivo I parece ser parte del dominio que interactúa con ADN, el que presumiblemente posee una estructura de tipo β - α - α (Ascencio, *et al.*, 1999)

El motivo I se encuentra adyacente a un dominio de 10 aminoácidos que ha sido identificado como el determinante de especificidad de unión al ADN (Ascencio, *et al.*, 1999).

La proteína que es potenciadora de la replicación (REn) pero no indispensable para la replicación, no se encuentra en *Mastrevirus*, se desconoce como actúa esta proteína pero podría estar actuando como estabilizador al ADN de cadena sencilla en la interconversión de ADNcs a ADNcd o controlando el ensamble de la partícula viral (Hormuzdi y Bisaro 1993, Lazarowits 1992)

Recientemente se ha propuesto que ayuda como multímero ayudando a la acción de Rep (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999)

Por lo anterior se concluye que para la replicación viral se pueden limitar las fases del ciclo celular en el momento de la replicación cromosomal.

II.1.2.-TRANSCRIPCIÓN

Existen genes que son requeridos al inicio del ciclo de infección por lo que se expresan antes y durante el ciclo de infección, genes como Rep y TrAP son ejemplos claros de genes tempranos. La PC es un ejemplo de genes tardíos pues esta es requerida en los últimos estadios del ciclo infectivo, así mismo estos genes requieren de la expresión de otros genes para poder ser expresados.

TrAP codifica para una proteína que transactiva la expresión del gen de la PC y de una de las proteínas del movimiento BVI, esta proteína activa la expresión de estos genes a nivel de transcripción e independiente del proceso de replicación. En el caso de virus bipartitas, esta transactivación parece ser mediada por elementos de secuencia discretos que actúan en cis y específicos para la acción de TrAP. Esta proteína transactivadora presenta tres dominios: el básico, el atípico dedo de zinc y el dominio ácido (Sunter y Bisaro 1992).

En *Begomovirus* muy cerca de la horquilla de replicación se encuentra un segmento de aproximadamente 60 b que contiene una caja TATA y una caja G, este segmento potencia la transcripción y funciona como elemento regulador de Rep. La proteína Rep por su parte tiene la facultad de autorregular su expresión de forma negativa. Aparentemente en todos los geminivirus existe una localización limitada al floema del promotor de Rep. La PC también se expresa en meristemo y tejido vascular, los elementos involucrados en la expresión de la PC en

meristema se encuentran río arriba del sitio de inicio de la transcripción y entre 115-235 nts los elementos de expresión en tejido vascular (Ruiz, *et al.*, 1999).

II.1.3.-CLONAS VIRALES USADAS

Existen antecedentes muy antiguos de la presencia de geminivirus que afectaron la economía en África desde 1894 causada por el *virus africano del mosaico de la yuca* ACMV; pero hasta la década de los 70's se logró caracterizar algunos de estos virus lo que permitió que se reconociera oficialmente como grupo independiente en 1978. El primer reporte sobre geminivirus en México produjo una enfermedad en jitomate con un severo enchinamiento de hojas conocido como *virus del chino del tomate* CdTV. Sin embargo, el primer geminivirus aislado y caracterizado molecularmente en México fue el *virus huasteco del chile* PHV (Idris *et al.*, 1999). PHV fue primero detectado en Tamaulipas en cultivos de chile, mientras que en Sinaloa los cultivos de jitomate eran afectados por otros virus (CdTV). Ha resultado PHV ser un modelo interesante de estudio tanto a nivel fitopatológico como a nivel molecular debido que al parecer este virus forma interacciones complejas con otros virus detectados antes. Una mezcla comúnmente encontrada en muchos cultivos hortícolas de México es la mezcla PepGMV-PHV (Méndez-Lozano, *et al.*, 2003), la cual establece una interesante interacción virus-virus. Recientes estudios sobre dicha interacción sugieren que estos virus pueden interactuar a nivel de replicación y movimiento, así mismo pueden interactuar de diferente manera, sinérgica o antagónica (Méndez-Lozano, *et al.*, 2003). Esta combinación de virus ha sido utilizada en el presente trabajo para estudios de expresión génica en plantas transposantes de *Arabidopsis*.

Estudios de filogenia demuestran que PHV presenta hasta un 80% de homología con virus como BGMV, BDMV, SqLCV y TGMV, en cuanto a la proteína de la cápside se refiere. Además estudios basados en la organización de los sitios de unión de Rep señalan que PHV puede considerarse un virus híbrido entre geminivirus de viejo y nuevo mundo (Ruiz-Medrano *et al.*, 1996).

PHV es un virus bipartita perteneciente a los *Begomovirus* y presenta en el componente A, tres MLAs orientados en sentido complementario y uno en sentido del virión, para el componente B son dos MLA, uno en sentido complementario y otro en sentido del virión (Fig. 7).

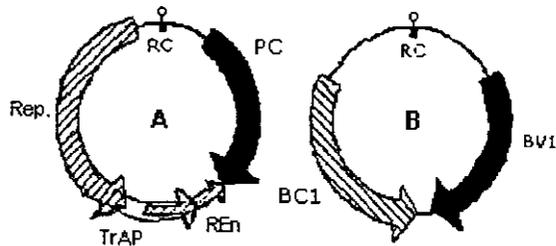


Fig. 7.- Dibujo esquemático de los MLA's del virus huasteco del chile (PHV). Rep codifica para la proteína involucrada en la replicación viral, TrAP el gen que transactiva los genes en sentido del virión de ambos componentes, REn involucrada en la acumulación de ADN. BC1 y BV1 proteínas del movimiento, CR o RC región común donde se encuentra la región intergénica RI (Ruiz-Medrano, *et al.*, 1996).

Para poder definir los elementos de secuencia involucrados en la regulación por TrAP de PHV se examinó los promotores del gen PC y BV1 los resultados sugieren que aun truncando el promotor de la PC este es aun transactivador viral (Ruiz Medrano *et al.*, 1999)

Un geminivirus que tiene un amplio rango de hospedantes dentro de la familia Brassicaceae que incluye la col y *Arabidopsis thaliana* es el virus del enrollamiento de hoja de col (CabLCV). Este virus también invade eficientemente mesófito de *Nicotiana benthamiana* (Hill *et al.*, 1998) aunque este un hospedante común de todos los geminivirus bipartitas. Estudios recientes sobre pseudorecombinantes de virus del enrollamiento de hoja de calabaza (SqLCV) y virus del enrollamiento de hoja de col (CabLCV), proveen indicios sobre el posible origen de nuevos geminivirus bipartitas a través de mezclas infecciosas, este estudio señala que virus con diferente rango de hospedantes, pueden tener orígenes de replicación y proteínas de replicación suficientemente similares para permitir que dichos pseudorecombinantes sean infecciosos, aun cuando no pueden desarrollar una enfermedad sistémica (Hill *et al.*, 1998).

II.1.4.-*Arabidopsis thaliana* COMO MODELO DE ESTUDIO

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea perteneciente a la clase Magnoliopsida o plantas dicotiledóneas. En la familia Brassicaceae a la que pertenece esta dicotiledónea se encuentran plantas de interés agro-económico como la col y el brócoli y aunque *Arabidopsis* carece de valor económico está se ha consolidado como un excelente modelo biológico para estudiar diferentes procesos biológicos, en particular la interacción planta-patógeno por poseer un gran número de propiedades y facilitar el trabajo experimental (Meyerowitz *et al.*, 1987).

Arabidopsis consiste básicamente de una roseta basal de hojas (cortos internodos) y tallos (largos internodos) terminados en flores, es una planta de pequeño tamaño (20-30 cm de altura), que tiene un ciclo corto de generación (5-6 semanas), con un alto número de semillas, (10,000 por planta), es autopolinizable y tiene una alta eficiencia de transformación genética (Seki *et al.*, 2002); pero sobre todo *Arabidopsis* es una excelente herramienta experimental

debido a que posee el genoma vegetal más pequeño conocido hasta ahora, además contiene en su mayoría secuencias únicas de ADN; su genoma es de un tamaño de 7×10^7 pb en 5 cromosomas, el cual ha sido secuenciado en su totalidad, motivo por el cual se ha convertido en objeto de estudios de genética en plantas con un enfoque sobre la biología del desarrollo.

Recientemente esta pequeña herbácea ha sido establecida como un sistema modelo para estudios de interacción con diversos patógenos entre los que se encuentran virus, bacterias, hongos y nematodos (Kunkel, 1996).

Agrobacterium T-ADN ha sido utilizado para estudios de mutagénesis insercional lo que ha permitido usar y clonar un cierto número de genes (Feldmann *et al.*, 1989) a este respecto, *Arabidopsis* podría ampliar el uso de la mutagénesis insercional. Recientemente se han identificado elementos transponibles en esta herbácea (Tsay *et al.*, 1993) aunque no han sido bien identificados. El uso de transposones heterólogos en *Arabidopsis* específicamente *Ac* y *Ds* de maíz, han sido analizados con respecto al efecto de posición de diferentes transformantes, (Bancroft y Dean, 1993); también este sistema ha sido utilizado para etiquetar genes requeridos para un desarrollo normal de *Arabidopsis* (Bancroft, Jones y Dean 1993). Alrededor de 150 ecotipos o aislados silvestres se encuentran en esta herbácea, por lo que también ofrece un abundante material para análisis genéticos de variación en cuanto a resistencia a enfermedades y fenotipos se refiere (Kunkel 1996).

En estudios de maíz y tabaco el patrón de transposición de *Ac* varía de un locus a otro, (Greenblatt 1984) para *Arabidopsis* existe trabajos que demuestran que elementos *Ds* tienen una diferente distribución en términos de cantidad de recombinación entre sitios aceptor y donante (Bancroft y Dean 1993).

II.1.5.-TRANSPOSONES

Los genes se encuentran en una posición específica en el cromosoma. Algunos genes pueden intervenir en su propio movimiento de un lugar a otro y pueden existir copias dispersas por todo el genoma. Estos elementos genéticos transponibles son conocidos como "transposones"

Hace varios años se descubrió que existen elementos transponibles en organismos procariontes luego se descubrió que existen también en fagos, bacterias, hongos, insectos y virus. Este importante fenómeno fue detectado en estudios genéticos de maíz por McClintock.

Bárbara McClintock pudo concluir que los genes *Ac* (activador) y *Ds* (disociador) en plantas de maíz eran elementos controladores transponibles donde *Ds* no se transpone en ausencia del elemento *Ac* (Fig. 8).

Los elementos genéticos transponibles fueron detectados debido a que su movimiento por el genoma, interrumpe funciones genéticas, que conllevan a variaciones en las actividades y estructuras de los genes cercanos a los sitios donde se mueven.

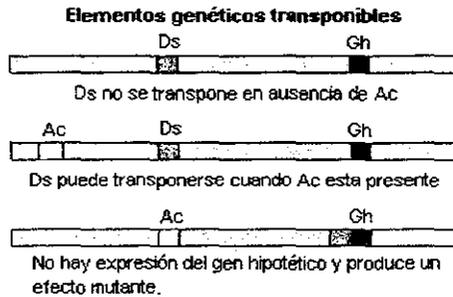


Fig. 8.- Influencia del gen *Activador de la transposasa (Ac)* sobre el gen *Disociador (Ds)*.

La secuencia en la que se inserta el elemento transponible se llama secuencia blanco. Durante la inserción de un transposon la secuencia blanco se duplica y así aparece como repetición directa flanqueando al elemento transponible insertado. Los elementos genéticos transponibles son una conveniente herramienta que permite interrumpir genes de plantas e imponer su propia función. La expresión de secuencias blanco puede ser monitoreada y manipulada por medio de transposones con genes reporteros y señales regulatorias (Martienssen, 1998).

II.1.5.-MUTAGENESIS EN *Arabidopsis*: ENHANCER TRAP Y GENE TRAP

Enhancer traps son genes reporteros que cuentan con un promotor mínimo que puede responder a enhancers cercanos, los gene traps cuentan con un splice aceptor. En ambos casos la expresión del gen reportero simula la del gen cromosomal.

En este trabajo sobre interacción planta-patógeno hemos, utilizado algunas líneas de *Arabidopsis* que llevan el gen de disociación (*Ds*) de maíz que lleva además un gen reportero *uidA* y un gen de resistencia kanamicina *NPTII*. El enhacer trap (*DsE*) además lleva un promotor 35S de CaMV. Otras líneas mutagénicas de *Arabidopsis* fueron con el gene trap el cual es precedido por un triplete de splice aceptor y por un corto intrón que permite la inserción dentro de intrones cromosomales y dirige la expresión génica vía splicing. Los elementos transponibles son movilizados a través de un gen activador de la transposasa dirigido por un promotor 35S.

Las líneas de *Arabidopsis* tienen insertado un transposon que tiene el locus *uidA* en sitios diferentes. Estudios sucesivos con los genes de PHV aislados y clonados, permitirán conocer el patrón de expresión del gen β -glucoronidasa al momento de ser infectada y así esta línea estaría sujeta a una caracterización molecular para conocer el sitio donde esta insertado el transposon y saber que gen esta afectando.

III JUSTIFICACION

Los geminivirus han proporcionado información acerca de procesos celulares y complejas interacciones entre planta y patógeno. En este sentido *Arabidopsis thaliana* es un excelente modelo de trabajo para los estudios de dichas interacciones; además los transposones han demostrado ser una importante herramienta para aislar y estudiar la función de nuevos genes mediante la técnica de PCR. La combinación de estas dos herramientas permitió identificar líneas transposantes de *Arabidopsis thaliana* que son susceptibles a la infección con geminivirus; lo cual permitirá mediante pruebas sucesivas y específicas de PCR (TAIL-PCR), identificar aquellos genes endógenos que son expresados por la presencia de geminivirus y que quizás estén involucrados en el reconocimiento del patógeno y la expresión de resistencia a enfermedades lo que podría conducir a la creación de plantas transgénicas resistentes a ciertas virosis.

IV.-HIPOTESIS

La infección con geminivirus puede influenciar la expresión de genes en plantas; por lo que es posible identificar algunos de estos genes con el uso de líneas transposantes.

V.-OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar líneas transposantes que expresen GUS con la inoculación de *Begomovirus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Seleccionar líneas que muestren tinción de GUS en presencia de geminivirus (PHV-PeGMV y CabLCV).
- ✓ Aislar y clonar el gen que expresa la proteína involucrada en la replicación viral.
- ✓ Aislar y clonar el gen que expresa la proteína potenciadora de la replicación.

VI.-MATERIALES Y METODOS

VI.1.- Selección de líneas transposantes de *Arabidopsis*.

Las semillas de las líneas transposantes de *Arabidopsis thaliana* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Apomixis del Dr. Jean Philippe Vielle Calzada del CINVESTAV. Irapuato, Gto.

VI.1.1.-Desinfección y germinación de semillas de *Arabidopsis*.

La germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Lansberg erecta*, se realizó *in vitro*, en un medio de cultivo nutritivo de Murashige y Skoog (MS) con 5mg/ml de kanamicina para seleccionar las transformadas. Las semillas fueron previamente desinfectadas (Ver anexo, protocolo 1) y posterior a ello colocadas en cajas petrí conteniendo medio MS sólido y se mantuvieron durante tres días a 4 °C para romper dormancia, después se pasaron a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo y temperatura controlado.

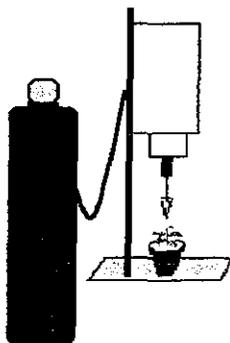
VI.1.2.-Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis*.

Las plantas de *Arabidopsis* fueron pasadas a una mezcla especial de sustrato para *Arabidopsis* (3:1:1 mezcla sunshine (no. 3), zonalite vermiculita, agrolita hortipert) cuando presentaban de 2 a 3 hojas verdaderas. Se mantuvieron tapadas con una charola transparente para evitar la deshidratación y permitir su adaptación durante aproximadamente 4 días en una cámara de crecimiento Persivall con 16 horas luz y 8 de oscuridad y temperatura de 25 °C, con un riego periódico cada tercer día. Después de una semana de haber retirado la charola se procedió a realizar los ensayos de biobalística.

VI.1.3.-Preparación de partículas de tungsteno

Las partículas de tungsteno antes de ser utilizadas en los ensayos de biobalística fueron limpiadas con etanol absoluto y resuspendidas en 250 µl de agua desionizada estéril (ver anexo, protocolo 2).

VI.1.4.-Ensayos de biobalística



Se inocularon 27 líneas transposantes de *Arabidopsis* con los componentes A y B de PHV y PepGMV (la mezcla) ambos de forma dimérica clonados en el vector bluescript (pBS) en una proporción 1:1 por el método de biobalístico (ver anexo, protocolo 3) (Garzón-Tiznado, 1993). Se seleccionó además 10 líneas de las 27 iniciales para ser inoculadas con CabLCV, utilizando en ambos casos a pBS como control por daño mecánico.

Fig. 9. Dibujo esquemático de una pistola de baja presión diseñada en el CINVESTAV, Irapuato para inoculación con virus mediante la técnica de biobalística.

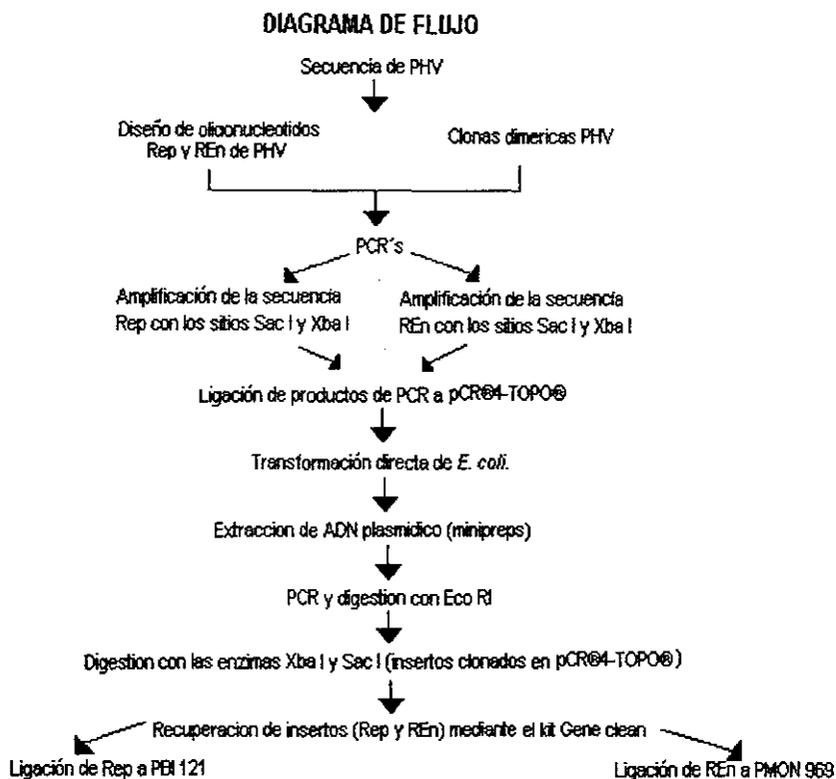
Las plantas transposantes de *Arabidopsis* fueron inoculadas con ambos componente clonados por separado en pBS. Se tuvieron dos repeticiones por tratamiento y dos controles por daño mecánico inoculando con pBS y dos controles sin inocular.

Los ensayos de biobalística se realizaron a 130 libras de presión con helio y la distancia fue de 4 cm (entre la superficie del sustrato y la puntilla). El diámetro de aspersion fue de 2.5-3 cm.

VI.1.5.-Análisis de la β -glucoronidasa

Para los análisis de expresión, las plantas inoculadas fueron colectadas al tercer y quinto día post-inoculación. Las hojas o en su caso toda la planta fueron colocadas directamente con el sustrato (solución X-GLUC, anexo, cuadro 1) en cajas de titulación y mantenidas durante toda la noche a 37° C con agitación constante para luego destefir el tejido con metanol-acetona 3:1 y hacer más evidente la expresión o la no expresión de GUS, por ultimo se mantuvieron almacenadas en glicerol 50%. El material fue visualizado con estereoscopio (Nikon).

VI.2.-Aislamiento y clonación de Rep y REEn de PHV.



VI.2.1.-Diseño de Oligonucleótidos

Se analizó la secuencia del componente A de PHV y se ubicó el sitio de inicio de los MLAs de Rep y REEn para diseñar oligonucleótidos complementarios al MLA y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificaron la secuencia que codifica para la proteína de replicación Rep y la secuencia que codifica para la proteína involucrada en aumentar la tasa de replicación REEn de PHV, por lo tanto se diseñó un oligonucleótido sentido y un antisentido para cada uno de los MLAs y además a ambos oligonucleótidos se les dio un sitio SacI al sentido y un sitio XbaI al antisentido (**cuadro V**).

Cuadro V

Secuencias de los oligonucleotidos para amplificar Rep y REn de PHV

Oligonucleotidos	Rep de PHV	REn de PHV
Sentido con sitio SacI	5' TGT GAG CTC GCA AAT CTA	5' CTC GAG CTC GAA TTA
	TGG C 3'	ATA AAG 3'
Antisentido con sitio XbaI	5' CTC TT T CTA GAA ATA TGC C 3'	5' ATT AAC TCT AGA AAC
		AAT GGA 3'

VI.2.2.- Condiciones de PCR para amplificar Rep y REn de PHV.

Mediante un PCR (**cuadro VI**) se comprobó que los oligos amplificaran un fragmento de aproximadamente 1049 pb que es lo que mide Rep y otro de 398 pb correspondiente a REn.

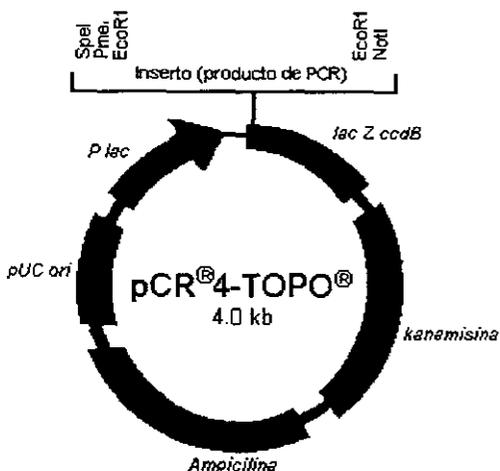
Cuadro VI

Condiciones de PCR.

Mezcla para PCR (vol. Final)	TEMPERATURAS
DNTP 200 µM	Desnaturalización inicial 94° C 1.30 min.
Buffer PCR 1x	Desnaturalización 94° C 40 seg.
Tap. Polimerasa 0.8 U	Alineación 55° C 40 seg.
MgCl ₂ 2.0 mM	Síntesis 72° C 1.0 min.
	72° C 3.0 min.

Para una reacción de PCR se añadió 5 µl de la mezcla para PCR, 0.5 µl de oligonucleotidos (concentración 100 ng/µl) sentido y antisentido, 1 µl de ADN de PHV A dimérico (concentración 1.7 ng/µl) diluido 1:10 y 20 µl de agua desionizada. Una vez que amplifico la secuencia se realizo una electroforesis para corroborar el tamaño y posteriormente se subclonó en pCR®4-TOPO®

Ligación de productos de PCR a pCR[®]4-TOPO[®]



Se tomo 1.5 μ l del producto de PCR de Rep; 0.5 μ l de solución salina (sistema de pCR[®]4-TOPO[®]); 0.5 μ l de vector pCR[®]4-TOPO[®] y 0.5 μ l de agua desionizada, se incubo durante 10 minutos a temperatura ambiente para después transformar con células calcio-competentes de *E. coli*. Se ligo RE en a pCR[®]4-TOPO[®] de igual procedimiento. Para corroborar que los insertos se subclonaron en el sitio Eco R1 de pCR[®]4-TOPO[®] se corto con la enzima Eco R1, las positivas se cortaron con Xba I y Sac I así como el vector para ligarlos en este sitio.

Fig. 10. Vector pCR[®]4-TOPO[®]

VI.2.3.-Biotransformación con *Escherichia coli* (*E. Coli*)

Este procedimiento se fundamenta en la obtención de células competentes, las cuales poseen una mayor capacidad de incorporar moléculas de ADN exógeno y ser transformadas por ellas. Las técnicas de biología molecular se realizaron de acuerdo a Sambrook *et al.*, 1989. La cepa utilizada para transformación bacteriana fue a partir de una capa de células DH5 α .

Las células hospedantes de *E. Coli* en activo crecimiento, se hicieron permeables al ADN plasmídico por incubación en buffer de CaCl₂ y almacenamiento en frío (ver anexo, protocolo 4). El plásmido fue espontáneamente transportado, al interior de una pequeña fracción de células hospedantes, este proceso se facilito por un corto periodo de choque con calor (ver anexo, protocolo 5). El cultivo con el antibiótico dentro de un medio sólido Luria Broth (LB) (ver anexo, cuadro 2), permitió el crecimiento selectivo, de células portadoras del plásmido. Las colonias de estas células, se hacen evidentes, luego de 12 a 16 horas de incubación a 37°C.

Dentro de los mecanismos de transformación, este es uno de los mas utilizados, con una eficiencia de transformación de alrededor de 10⁶ colonias/ μ g de ADN súper-enrollado, la cual es adecuada para la mayoría de procedimientos de este tipo (Davis y Stanley 1989).

VI.2.4.-Vectores de clonación.

En un intento por encontrar vectores que contuvieran un promotor constitutivo (35S) y un terminador encontramos que el plasmido pBI121 (fig 11) es un excelente candidato para realizar nuestras construcciones con Rep y REn de PHV excepto porque es un vector de tamaño considerable. Otro plasmido que nos ofrece estas cualidades es el plasmido pMON969 y es de mucho menor tamaño por lo que se intento subclonar nuestras secuencias de interés primero en pMON969.



Figura 11. Diagrama del plásmido pBI 121, plásmido derivado de pBIN 19. Producido por CLONTECH Laboratory. Su tamaño es de 13 Kb 35S-P promotor 35S, nptII neomicina fosfotransferasa, nos-T sitio de terminación nopalina sintasa, gus β -glucuronidasa, nos-P promotor nopalina sintasa, 35S-T sitio de terminación 35S, H HindIII, X XbaI, S SacI, E EcoRI.

VI.2.5.-Extracción de ADN plasmídico

Las técnicas en biología molecular se realizaron de acuerdo a los procedimientos por Sambrook *et al.*, 1989. Las enzimas de restricción se utilizaron bajo las recomendaciones de cada uno de los fabricantes. El objetivo de las extracciones de ADN plasmídico por medio de minipreps (ver anexo, protocolo 6, cuadro 4) fue para realizar restricción enzimática para corroborar los tamaños de las construcciones y clonas virales conocidas así como las nuevas construcciones generadas. Las extracciones (maxiprep) por columna (marca Quiagen) (ver anexo protocolo 7, cuadro 3) se realizaron con el objeto de obtener suficiente ADN para los ensayos de biobalística y en algunos casos para purificar y mandar secuenciar las posibles construcciones. Posterior a la extracción se cuantifico el ADN plasmídico por medio de un espectrofotómetro (marca Beckman Mod. DU 650 ESPECTROPHOTOMETER) (ver anexo).

VI.2.6.-Ligación de Rep en PBI-121

Las secuencias una vez subclonadas por separado en pCR[®]4-TOPO[®] y transformadas en *E.coli* fueron digeridas con las enzimas Sac I y Xba I para liberar el inserto (Rep y REn) y ligarlas en los plasmidos pBI 121 y pMON 969 respectivamente (ver anexo, protocolo 9 y 10), primero se intento ligar ambos insertos por separado en PMON969 debido al menor tamaño de este vector.

VI.2.7.- Restricción enzimática

Se corto pBI 121 con las enzimas de restricción Xba I y Sac I para eliminar GUS e insertar Rep o REn de PHV así mismo también se corto con las mismas enzimas las secuencias de interés subclonados en pCR[®]4-TOPO[®] y pMON 969 para posteriormente ligar los insertos por separado (ver anexo, protocolo 9 y 10) en pBI 121 y pMON 969. Las bandas de dichas digestiones fueron recuperadas con el sistema Gene Clean (ver anexo, protocolo 8).

VI.2.8.- Secuenciación de construcciones

El método utilizado para determinar la secuencias nucleotídicas de las construcciones de este trabajo fue desarrollado en el laboratorio de secuenciación de CINVESTAV, Irapuato mediante el método enzimático del dideoxiterminal de Sanger, el sistema utilizado BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready reaction sistema (núm. de parte. 4336917) marca Applied Biosystems y el equipo utilizado es ABI Prisma 377 DNA Sequencer, marca Applied Biosystems. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 4 %.

VI.2.9.- Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *lansberg*

La extracción de ADN genómico (ver anexo, protocolo 11) se realizó con la finalidad de amplificarlo en pruebas posteriores a este trabajo mediante un PCR altamente específico (TAIL-PCR). Este PCR usa iniciadores semianidados dentro del transposon e iniciadores degenerados para amplificar las secuencias cercanas al sitio de inserción.

VI.3.-Pruebas de infectividad

Se realizaron pruebas de infectividad con el objeto de comprobar que las clonas virales fuesen infectivas, para ello se realizó ensayos de biobalística, inoculando plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* con micropartículas de tungsteno, las partículas llevan adheridas el ADN viral. Las partículas son de esta manera introducidas a células vegetales sin causar daños.

VI.3.1.-Condiciones de bombardeo

Se inoculo plantas de tabaco con 2 disparos por planta y seis repeticiones por tratamiento, utilizando la mezcla PHV-PepGMV y otras plantas fueron inoculadas con un solo virus. La inoculación fue realizada con 5 ng de ADN por componente. Plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis silvestres* ecotipo *lansberg* fueron igualmente inoculadas con CabLCV para observar la posible producción de síntomas.

Las plantas de tabaco (*N. tabacum* y *N. benthamiana*) inoculadas se mantuvieron en un invernadero con un riego periódico.

VII.-RESULTADOS

VII.1.- Selección de líneas transposantes susceptibles a la infección con *Begomovirus*.

A partir de un previo escrutinio de líneas transposantes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *lansberg* se seleccionaron 10 líneas para ser inoculadas con la mezcla PHV-PepGMV. Las líneas que expresaron GUS después de ser inoculadas con la mezcla y que son susceptibles a la infección viral son las líneas MGT 580 y la MGT 361.

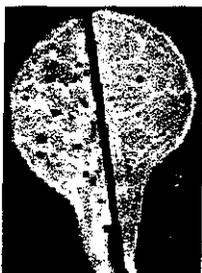


Foto 1.- Análisis histoquímicos de plantas inoculadas con geminivirus, mostrando la expresión de GUS (puntos azules en tejido desteñido con metanol acetona).

En un experimento utilizando las mismas líneas pero con inoculación *in vitro* y a una presión de 400 psi y 800 psi nuevamente la línea MGT 580 y la MGT 361 mostró expresión de GUS. Sin embargo la línea MGT 327 mostró expresión en todos los controles. Además de las diez primeras líneas se analizaron 17 líneas más de las cuales 5 expresaban GUS después de ser inoculadas con la mezcla, dichas líneas son la MGT 221, MGT 613, MGT 24, MGT 699 y MET 348.

Arabidopsis es hospedero de CabLCV por lo que se inoculó plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *lansberg* con este virus y no mostraron síntomas aparentes aun cuando se realizó a 4 diferentes concentraciones, 2 distancias y 3 diferentes presiones.

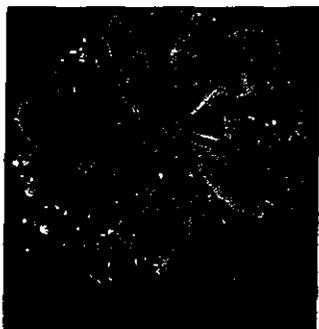


Foto 2.-Plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Lansberg erecta* fueron inoculadas con CabLCV y no desarrollaron síntomas aparentes

Las líneas transposantes que expresaron GUS con la mezcla PHV-PepGMV fueron inoculadas con el componente A y B de CabLCV y en los análisis histoquímicos realizados en estas plantas se pudo establecer que las líneas MGT24, MGT221 y MGT699 expresaron GUS después de ser infectadas con CabLCV teniendo como control por daño mecánico a pBS y controles negativos de plantas sin inocular.

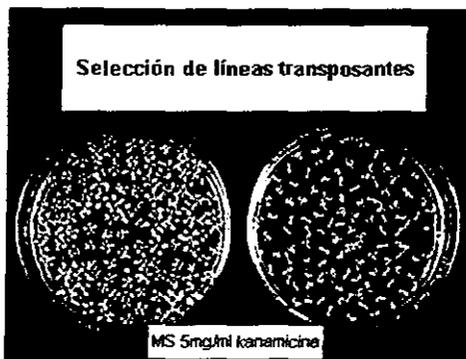


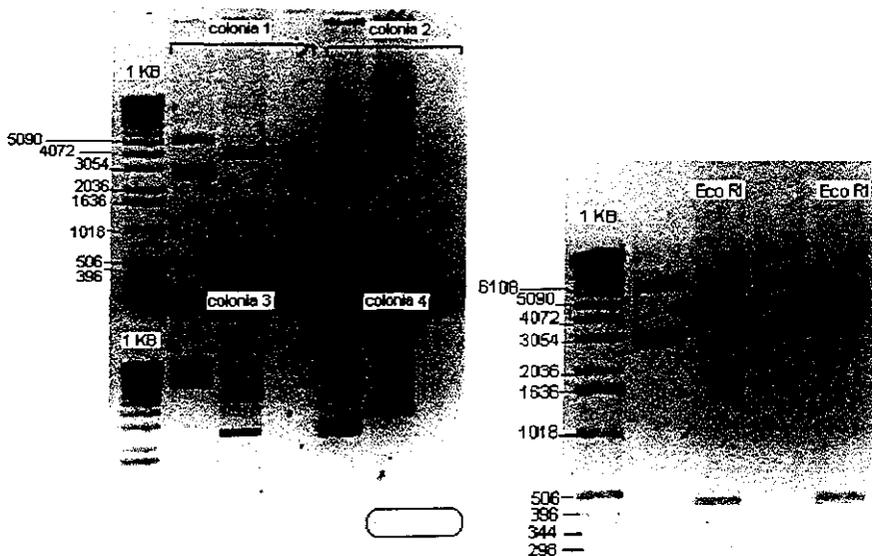
Foto 3.- Selección de transposantes en medio MS con 5mg/ml de Kanamicina

Las plantas antes de ser inoculadas con los virus fueron seleccionadas en medio MS kanamicina (5mg/ml) observando que existe segregación.

VII.2.- Aislamiento y clonación de Rep y REn de PHV

A partir de PCRs se logró aislar la secuencia que codifica para la proteína Rep y la secuencia que codifica para la proteína REn, ambas de PHV, estas se sub-clonaron en pCR[®]4-TOPO[®] y transformaron en *E. Coli*. Para confirmar que las colonias de *E. Coli* hubiesen sido transformadas con el inserto se procedió a picar varias colonias y realizar una miniprep para después cortar con la enzima para liberar el inserto y por último un PCR para que amplificara dicho inserto. El siguiente gel (gel 1) muestra en los tres carriles subsecuentes al marcador 1 KB, la minipred de una colonia transformada de *E. coli* con REn clonada en el sitio *Eco RI* de pCR[®]4-TOPO[®] la digestión con la enzima *Eco RI* para liberar inserto y la PCR de la minipred, en el mismo orden los siguientes tres carriles de otra colonia. Los carriles inferiores muestran otras dos colonias en los mismos términos. Cabe resaltar que la primera y última colonia si liberan y amplifican el inserto del tamaño de REn (398 pb) por lo que fueron secuenciadas para confirmar dichos resultados.

El gel 2 muestra en el primer carril después del marcador 1 KB la minipred y enseguida el corte con *Eco RI* liberando un inserto de menos de 500 pb; el cuarto carril otra extracción con su correspondiente digestión con *Eco RI*.



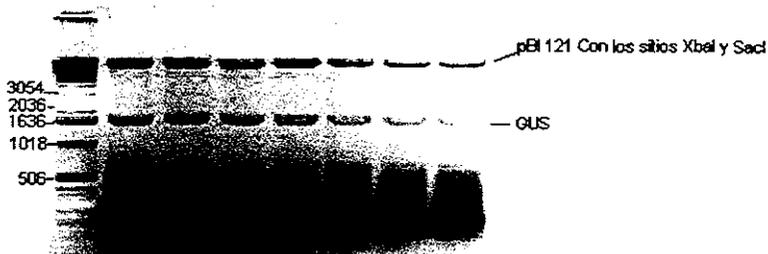
Gel 1.- Miniprep, digestión y PCR de REN

Gel 2.- restricción enzimática con Eco RI

Los insertos subclonados en pCR[®]4-TOPO[®] fueron recuperados por restricción enzimática con Sac I y Xba I (gel 3) para liberar y ligarlos al vector pBI 121 y pMON 969.

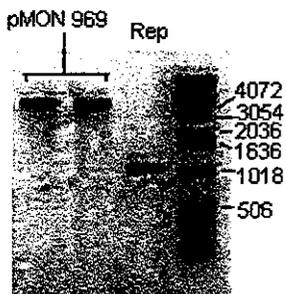
Gel 3.-Digestión con las enzimas Xba I y Sac I a la subclonación pCR[®]4-TOPO[®]-Rep (Rep mide 1049 pb)

Así mismo se cortaron los plasmidos con las mismas enzimas para ligarlos en este sitio (gel 4). En el caso de pBI 121 se escindió con estas enzimas el gen reportero GUS e insertado en su sitio Rep de PHV.



Gel 4.- Restricción enzimática con *SacI* y *XbaI* a pBI 121 para eliminar GUS (GUS mide 1811 pb) e insertar Rep de PHV.

Las bandas fueron recuperadas con el sistema GENE CLEAN para hacer las correspondientes ligaciones (gel. 5).



En el carril 1 y 2 se corrió 1 μ l de pMON 969 purificado con el sistema GENE CLEAN con los sitios *XbaI* y *SacI* y muestra 1 μ l de Rep recuperado de una digestión con las mismas enzimas de pCR[®]4-TOPO[®].

Gel. - 5 purificación de bandas con el sistema GENE CLEAN.

VII.3.-Pruebas de infectividad

Las plantas de *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* inoculadas con la mezcla PHV-PepGMV desarrollaron síntomas severos y síntomas muy ligeros en plantas inoculadas con un solo virus.

Las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con CabLCV no desarrollaron síntomas aparentes.



Foto 4



Foto 5

Foto 1.- muestra a la izquierda una planta sana de *Nicotiana tabacum* var. *xantii* y a la derecha una planta inoculada con la mezcla (PHV-PepGMV). La foto 2 muestra un acercamiento de la planta infectada mostrando clorosis foliar.

VIII.-DISCUSIÓN

La idea principal del presente trabajo consistió en identificar aquellas líneas de *Arabidopsis* que expresaran GUS después de ser inoculadas con las clonas diméricas de la mezcla (PHV-PepGMV) lo que nos estaría indicando la posible activación de genes endógenos debida a la influencia de proteínas virales. Este estudio ha permitido identificar dichas líneas las cuales estarán sujetas a futuros aislamientos y mapeos de *Arabidopsis* mediante un PCR altamente específico (Termal asymmetric interlaced TAIL-PCR) mismo que utiliza iniciadores semianidados en el transposon e iniciadores degenerados que permitirán amplificar las secuencias adyacentes al sitio de inserción. Sin embargo los análisis histoquímicos realizados a las líneas transposantes de *Arabidopsis* no fueron tan evidentes cuando fueron visualizados al estereoscopio quizás debido a la degradación del X-GLUC por bacterias y otros contaminantes por lo que podría haber falsos positivos en los análisis. En este sentido una de las líneas específicamente la línea MGT 327 presento expresión de GUS en todos los controles lo cual podría estar indicando que dicha línea posee genes que se expresan de manera constitutiva y no debido a la presencia de geminivirus o una posible degradación del X-GLUC, para descartar la posible degradación del X-GLUC por contaminación se procedió a realizar ensayos de biobalística *in vitro* y nuevamente hubo expresión en todos los controles de la línea MGT 327.

En un experimento con semillas de líneas transposantes se probó diferentes concentraciones de kanamicina para corroborar que hubiese selección de transformantes confirmando que efectivamente la hay y a todas las concentraciones probadas, el problema con algunas líneas que no expresaron GUS en repeticiones inoculando con la mezcla PHV-PepGMV podría deberse a su heterozigocis. Sin embargo la línea MGT 24 presento en todas las repeticiones un crecimiento irregular con respecto a las demás líneas pues su tamaño era siempre menor.

Una infección exitosa esta supeditada a las numerosas interacciones moleculares que ocurren durante la replicación viral, la activación de la transcripción y movimiento de virus por lo que un error en alguno de estos procesos puede resultar en la carencia de infectividad (Hill *et al.*, 1998). Existen reportes que indican que *Arabidopsis* es hospedante de CabLCV sin embargo en plantas silvestres del ecotipo *lansberg* inoculadas con este virus no hubo desarrollo de síntomas lo cual podría deberse a una posible falta de infectividad en la doble cadena de CabLCV, uno o los dos componentes podrían ser defectivos, o bien el ecotipo *lansberg* es

resistente a este virus. Otro suceso que podría estar confirmando lo anterior son las inoculaciones realizadas en plantas de *Nicotiana benthamiana* la cual es un hospedante común de geminivirus bipartitas (Hill *et al.*, 1998) y sin embargo las plantas no desarrollaron síntomas aparentes después de ser inoculadas con CabLCV.

Las clonas diméricas usadas en el presente trabajo de PHV y PepGMV fueron analizadas por patrón de bandedo mediante restricción enzimática y aunque algunas no dieron los patrones esperados, si produjeron los síntomas conocidos en plantas de tabaco cuando se realizo pruebas para saber si dichas clonas eran infectivas. El diferente patrón de bandedo podría deberse a los rearrreglos en la estructura genómica de los virus y a pesar de estos rearrreglos conservan su capacidad de infección como ocurre en algunos estudios con pendorrecombianes. Las plantas de *Nicotiana tabacum* var. xanthi no desarrollaron síntomas cuando fueron mantenidas en una cámara de crecimiento Persivall sin embargo las plantas mantenidas en condiciones de invernadero a una temperatura por arriba de 25 °C si desarrollaron los síntomas conocidos siendo mas severos con la mezcla que individual.

Otra parte importante en el presente trabajo fue el aislamiento y clonación de genes virales de expresión temprana es decir aquellos genes requeridos al inicio del ciclo infectivo. La idea es conocer cual es la proteína viral que es capaz de inducir la activación de genes endógenos en *Arabidopsis* para lo cual aislamos y clonamos las secuencias que codifican para las proteínas Rep y REn de PHV en vectores de clonación con un promotor constitutivo y un terminador. Ambos elementos los encontramos en los vectores pMON 969 y pBI 121 debido a que pMON 969 es de menor tamaño intentamos ligar las dos secuencias por separado en este vector sin embargo solo se ligo REn y fue necesario ligar Rep en el otro vector. Aunque las construcciones no fueron probadas logramos clonar la secuencias que codifican para las proteínas Rep y REn en los vectores pBI 121 y pMON 969 respectivamente. Sin embargo tuvimos muchos problemas para poder ligar Rep quizás debido a que es una secuencia de mayor tamaño. En tanto que la ligación de REn en pMON 969 no hubo problemas además en las digestiones realizadas para corroborar el tamaño del inserto hubo mas de tres colonias positivas.

La extracción de ADN genómico de líneas transposantes de *Arabidopsis* se realizó utilizando el método de extracción "Plant DNAzol" modificado esto con el fin de utilizar este material para amplificar las secuencias adyacentes al transposon mediante TAIL-PCR aunque esta parte del trabajo se realizara en futuras pruebas logramos reconocer que este método extracción de ADN es eficiente para la obtención de ADN de buena calidad para ser amplificado por PCR puesto que logramos amplificar por PCR el gen de ARN ribosomal 16S de cloroplasto (el cual es altamente conservado en plantas).

IX.-CONCLUSIONES

- Se logro identificar líneas transposantes de *Arabidopsis* que son susceptibles a la infección con geminivirus.
- Las líneas que expresan GUS después de ser inoculadas con la mezcla PHV-PepGMV son MGT 221, MGT 613, MGT 24, MGT 699 y MET 348.
- Las líneas que expresan GUS después de ser inoculadas con CabLCV son MGT 24, MGT 221, MGT 699.
- Los oligonucleotidos y las temperaturas para amplificar las secuencias que codifican para las proteínas involucradas en la replicación de PHV son los adecuados.
- Se logro aislar y clonar la secuencia que codifica para la proteína involucrada en la replicación Rep de PHV en pBI 121.
- Se logro aislar y clonar la secuencia que codifica para la proteína involucrada en aumentar la tasa de replicación REn en pMON 969.
- El método de extracción con el sistema comercial DNazol modificado resulto ser el mas adecuado para la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

X.-LITERATURA CITADA

- **Anaya-López, J. L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Garzón-Tiznado, J. A y Pons-Hernández, J. L.** 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in mexican wild peppers. *HortScience* (38) 2:251-255.
- **Arguello-Astorga, G. R., Herrera-Estrella L. y Rivera-Bustamante R. F.** 1994. (a) Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*. 26:553-556.
- **Arguello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella L. y Rivera-Bustamante R. F.** 1994. (b) Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology* 203:90-100.
- **Bancroft, I. y Dean C.** 1993. Transposition pattern of the maize element Ds in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 134:1221-1229.
- **Briddon, R. W. y Markham, P. G.** 2001. Complementation of bipartite *Begomovirus* movement functions by *Topocuvirus* and *Curtoviruses*. *Archives of Virology* 146:1811-1819
- **Davies J. W. y Stanley J.** 1989. Geminivirus genes and vectors. *Trends Genetics* 5: 77-81.
- **De La Torre-Almaraz R., Valverde R., Méndez-Lozano J. y Ascencio-Ibañez J.** 2002. Caracterización preliminar de un geminivirus en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B.) en la región central de México. *Agrociencia* 31:471-481.
- **Egelkrout E. M., Robertson, D. y Hanley-Bowdoin, L.** 2001. Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 13:1437-1452.
- **Elmer J. S., Brand L., Sunter G., Gardiner W. E., Bisaro D. y Rogers S.** 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucl. Acids. Res.* (16) 14: 7043-7060
- **Fauquet, C. y Stanley, J.** 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Annals of Applied Biology* (142) 2: 165-189.
- **Fontes, E. P., Eagle, P., Sipe, P., Luckow, V. y Hanley-Bowdoin, L.** 1994 Interaction between a Geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *The Journal of Biological Chemistry* (269) 11:8459-8465.

- **Garzón-Tiznado J., Torres-Pacheco I., Ascencio-Ibañez J., Herrera-Estrella L., y Rivera-Bustamante R.** 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 83:514-521
- **Garzón-Tiznado J., Acosta-García G., Torres-Pacheco I., González-Chavira M., Rivera-Bustamante R., Maya-Hernández V., y Guevara-González G.** 2002. Presencia de los Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile variante Tamaulipas (TPV-T), y chino del tomate (VCdT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* (20) 1:45-52.
- **Gardiner W. E., Sunter, G., Brand, L., Elmer, J., Rogers, S. y Bisaro, D.** 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *The EMBO Journal.* (7) 4:899-904
- **Gladfelter H. J., Eagle, P. A., Fontes, E. P., Batts, L. y Hanley-Bowdoin, L.** 1997. Two domains of the AL1 protein mediate geminivirus origin recognition. *Virology.* 239:186-197.
- **Gierl A. y Saedler, H.** 1992. Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Molecular Biology.* 19: 39-49
- **Gillette, W., Meade, T. J., Jeffrey, J. L. y Petty, Ian.** 1998. Genetic determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components. *Virology.* 251:361-369.
- **Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F. y Guevara-González, R.** 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *HortScience* 36 (1):139-142.
- **Gutiérrez C.** 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO journal* (5) 19: 792-799
- **Hamilton W., Bisaro, D., Coutts, R. y Buck, K.** 1983. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. *Nucl. Acids. Res.* (11) 21: 7387-7396
- **Hamilton W., Stein, V., Coutts, R. y Buck, K.** 1984. Complete nucleotide sequence of the infections cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: potential coding regions and regulatory sequences. *The EMBO Journal* (3) 9:2197-2205
- **Hanley-Bowdoin, L., Elmer, S. y Rogers, S.** 1989. Functional expression of the leftward open reading frames of the A component of tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Plant Cell.* 1:1057-1067.
- **Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. y Rogers, S.** 1990. Expression of functional replication protein from tomato golden mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:1446-1450

- **Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S., Orozco, B., Nagar, S. y Robertson, D.** 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* (18) 1:71-106.
- **Hayes R. J. y Buck, K. W.** 1989. Replication of tomato golden mosaic virus DNA B in transgenic plants expressing open reading frames (ORFs) of DNA A: requirement of production of single-stranded DNA. *Nucl. Acids. Res* (17) 24: 10213-10222
- **Hill, J. E., Strandberg, J. O., Hierbert, E. y Lazarowits, S. G.** 1998. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminivirus evolution an movement. *Virology* 250:283-292
- **Hunter, W. B., Hierbert, E., Webb, S. E., Tsai, J. H. y Polston, J. E.** 1998. Location of Geminiviruses in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease* (82) 10:1147-1151.
- **Idris, A.M.; Lee, S.H. y Brown, J.K.** 1999 First report of Chino del tomate and pepper huasteco geminiviruses in greenhouse-grown tomato in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 83 (4), p 396.
- **Ingham, D., Pascal, E. y Lazarowitz, S.,** 1995. Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range buy only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology* 207:191-204.
- **Jefferson R. A., Kavanagh, T. y Bevan, M.** 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* (13) 6: 3901-3907
- **Jeffrey, W. y Stanley, J.** 1989. Geminivirus genes and vectors. *Trends Genetics* (5) 3: 77-81
- **Jeffrey J. L., Poorna, W. y Petty, Ian.** 1996. Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology* 223:208-218.
- **Jeske H. Lutgemeier, M. y PreB, W.** 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination depend replication of abutilon mosaic virus. *The EMBO Journal.* 20 (21): 6158-6167.
- **Kong L. J., Orozco, B. M., Roe, J. L., Nagar, S., Ou, Sharon., Feiler, H., Durfee, T., Miller, A., Gruissem, W., Robertson, D. y Hanley-Bowdoin, L.** 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *The EMBO Journal.* (19) 13:3485-3495
- **Kong L. J. y Hanley-Bowdoin.** 2002. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *The plant cell.* 14:1817-1832.

- **Lapidot M., Friedmann., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R. y Cohen, S.** 2001. Effect of host plant resistance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathology* (91) 12:1209-1213
- **Lazarowitz, S. G.** 1991. Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. *Virology* (180) 1:70-80
- **Lazarowitz S. G.** 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. (11) 4:327-349.
- **Liu Y., Mitsukawa N., Oosumi T. y Whittier R.** 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal* (8) 3:457-463
- **Martienssen R. A.** 1998. Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceeding Natural Academy Science*. 95: 2021-2026
- **Matthew's Roger Hull.** 2000. Plant virology. 4ta Ed. Academic Press. Págs. 345-351.
- **Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M. y Rivera-Bustamante, R. F.** 2003. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *pepper huasteco virus* and *pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93:270-277
- **Meyerowitz, R. V., Furtak, D. B., Greveling, C. y Scheil, J.** 1987. *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* 21:93-111.
- **Morra, M. y Petty, Ian.** 2000. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*. (12) 11:2259-2270.
- **Moya A., Guirao, P., Cifuentes, D., Beitias, F. y Cenis, J.** 2001. Genetic diversity of iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Molecular ecology*. 10:891-897.
- **Neueiry A. O., Lucas, W. y Gilbertson, R.** 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*. 76:925-932.
- **Orozco B. M., Ling-Jie Kong., Lou Ann Batts., Sharon Elledge y Hanley-Bowdoin.** 2000. The multifunctional character of a geminivirus replication proteins reflected by its complex oligomerization properties. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9):6114-6122.
- **Padidam, M., Sawyer, S. y Fauquet, C.** 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*. 265:218-225.
- **Pedersen T. y Hanley-Bowdoin, L.** 1994. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. *Virology*. 202:1070-1075
- **Pico B., Díez, M. J. y Nuez, F.** 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses in the tomato yellow leaf curl virus -a review. *Scientia Horticulture*. 67:151-196.
- **Polston J. E. y Anderson P. K.** 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* (81) 12:1358-1369.

- **Pooma, W., Jeffrey, J. y Petty, Ian.** 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* 218:264-268.
- **Pongtharin, L., Valverde, R. A., De la Torre, R. y Sim, J.** 2000. Occurrence of a strain of *texas pepper virus* in tabasco and habanero pepper in Costa Rica. *Plant Disease* (84) 2:168-172.
- **Rogers S., David M. Bisaro., Robert B. Horsch., Robert T. Fraley., Nancy L. Hoffmann., Leslie Brand., Scott Elmer y Alan M. Lloyd.** 1986. Tomato golden mosaic virus a component DNA replicates autonomously in transgenic plants. *Cell* 45, 593-600
- **Ruiz-Medrano R. Guevara-González R., Arguello-Astorga R. y Monsalve-Fonnegra Z.** 1996. Identification of a sequence element involved in AC2 mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology* 253: 162-169.
- **Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. *Cold Spring Harbor laboratory press*, 2ed. 1.21, 1.40, 6.3 11.3.
- **Saunders, K., Andrew, L. y Stanley, J.** 1991. DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucl. Acids. Res.* (19) 9: 2325-2330.
- **Settlage, S. B., Miller, A. B., GUISSEM, W. y Hanley-Bowdoin, L.** 2001. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. *Virology*. 279:570-576.
- **Seki M. et al.,** 2002. Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*. 296:141-145.
- **Simon A. M.** 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* 3:286-287.
- **Stanley J., Markham, P. G., Callis, R. J. y Pinner, M. S.** 1986. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus, *The EMBO Journal*. 5:1761.
- **Stanley J.** 1993. Geminiviruses: plant viral vectors. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:91-96.
- **Sundaresan V.** 1996. Horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements. *Science* 1(6):184-190.
- **Sunter, G., Gardiner, W., Rushing, A., Rogers, S. y Bisaro, D.** 1987. Independent encapsidation of tomato golden mosaic virus A component DNA in transgenic plants. *Plant. Mol. Boil.* (8) 6: 477-484.
- **Sunter, G. y Bisaro, D.** 1991. Transactivation in a Geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 180: 416-419.
- **Sunter, G. y Bisaro D.** 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant Cell*. 4:1321-1331.

- **Sunter, G., Hartz, M., Hormuzdi, H., Brough, C. y Bisaro, D.** 1990. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179: 69-77.
- **Sunter, G. y Bisaro, D.** 1997 Regulation of a geminiviruses coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and depression mechanisms. *Virology* 232:269-280.
- **Varma, A. y Malathi, V.** 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of applied biology.* (142) 2:145-164.
- **Vega-Arreguin J. y Rivera-Bustamante R.** 2001. Los virus cómplices para descifrar procesos moleculares en las plantas. *Avance y Perspectiva.* 20:349-355.

ANEXO

Protocolo 1

Desinfección de semillas de *Arabidopsis*

PROCEDIMIENTO:

- 1) Colocar las semillas en tubos eppendorf.
- 2) Agregar 200 μ l de etanol 70%.
- 3) Mezclar durante dos minutos.
- 4) Retirar sobrenadante.
- 5) Agregar 500 μ l de cloro al 10%.
- 6) Mezclar durante 10 Min.
- 7) Enjuagar con agua desionizada estéril 3 veces.

Nota: El proceso de desinfección se realizó bajo condiciones asépticas y en campana de flujo laminar.

Protocolo 2

Preparación de partículas de Tungsteno

PROCEDIMIENTO:

- 1) Pesar 60 mg de partículas de tungsteno M10 (BioRAP).
- 2) Agregar las partículas en un tubo corex de cristal de 15 ml.
- 3) Agregar 2 ml de HNO_3
- 4) Resuspender.
- 5) Centrifugar por 30 seg. a 12 K.
- 6) Eliminar con micro pipeta el HNO_3
- 7) Agregar 1 ml de agua desionizada estéril y transferir a un tubo eppendorf de 2 ml.
- 8) Centrifugar de 10 a 30 segundos a 10 K.
- 9) Eliminar el agua con micropipeta y agregar 1 ml de etanol absoluto.
- 10) Resuspender brevemente.
- 11) Centrifugar de 10 a 30 segundos a 10 K.
- 12) Eliminar el etanol con pipeta y agregar 1 ml de agua desionizada estéril.
- 13) Resuspender brevemente.
- 14) Colocar 250 μ l de la suspensión en cuatro tubos eppendorf y agregar 750 μ l de agua desionizada estéril a cada tubo.

Nota: Resuspender con un sonicador de partículas.

Protocolo 3

Preparación de partículas de tungsteno con el ADN viral para ensayos de biobalística.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 50 μ l de partículas de tungsteno suspendidas en agua desionizada.
2. Adicionar lentamente 10 ng de ADN (5 ng de ADN por componente)
3. Adicionar 50 μ l de CaCl_2 2.5M
4. Adicionar 20 μ l de espermidina 0.1M
5. Agitar por 5 minutos.
6. Centrifugar 5-10 segundos.
7. Eliminar el sobrenadante.
8. Adicionar 140 μ l de etanol al 70 %
9. Resuspender
10. Centrifugar 5-10 segundos.
11. Eliminar sobrenadante
12. Lavar con 140 μ l de etanol absoluto.
13. Resuspender en 70 μ l de etanol absoluto. Esta preparación es para seis disparos tomando 10 μ l por disparo.

Nota:

- a) Las partículas no pueden ser utilizadas cuando haya transcurrido mas de 3 horas después de su preparación con el ADN.
- b) Los componentes deben adicionarse en estricto orden y con agitación constante para evitar su aglutinación.
- c) En cada paso resuspender usando un sonicador.

Protocolo 4

Establecimiento de células calcio competentes de *Escherichia coli*

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 5 ml de medio LB sin antibiótico con 5 μ l de células,
- 2) El cultivo se diluye en proporción 1:1000 con LB sin antibiótico,
- 3) Incubar a 37°C en agitación constante durante tres horas,
- 4) Transferir las células a tubos de centrifugación de 250 ml,
- 5) Mantenerlos en hielo durante 10 minutos,
- 6) Centrifugar por 7 minutos a 3,500 rpm, a 4°C,
- 7) Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de MgCl_2 10 mM, frio,
- 8) Adicionar 120 μ l de MgCl_2 10 mM,
- 9) Centrifugar por 7 minutos a 3,500 rpm, a 4°C eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de CaCl_2 50 mM / Glicerol 20%,
- 10) Centrifugar por 7 minutos a 3,500 rpm, a 4°C,

- 11) Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de CaCl_2 50 mM / Glicerol 20%,
- 12) Incubar en hielo durante 1 hora,
- 13) Transferir alícuotas de 400 μl en tubos eppendorf estériles,
- 14) Inmediatamente congelar con hielo seco o nitrógeno líquido,
- 15) Almacenar a -70°C ,

Nota: la viabilidad de la células baja si se descongela continuamente.

Protocolo 5

Biotransformación de *E.coli* mediante choque térmico.

PROCEDIMIENTO:

1. Añadir a 100 μl de células calcio-competentes de *E. Coli*
2. Agregar 100 ng de ADN a transformar.
3. Incubar en hielo durante 20 minutos.
4. Incubar a 42°C por 2.5 minutos.
5. Incubar en hielo durante 10 minutos.
6. Adicionar en campana de flujo laminar 1 ml de medio LB sin antibiótico durante 1 hr, a 37°C .
7. Centrifugar 30 segundos a 12,000 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante
9. Resuspender con 50 μl de medio.
10. Sembrar en placas con el medio y antibiótico adecuado.

Las bacterias transformadas se crecieron en medio LB con crecimiento selectivo en kanamicina (40mg/ml).

Protocolo 6

Aislamiento de ADN plasmídico (miniprep birboim)

1. Inocular 1ml de medio LB con el antibiótico apropiado en tubos eppendorf la noche anterior a 37°C de temperatura y en agitación constante (16hrs).
2. Centrifugar (centrifuga marca sorvall mod. 40175948) a 10^3 r.p.m. durante 1 minuto.
3. Descartar sobrenadante y resuspender la pastilla en 150 μl de la solución I de Birboim.
4. Resuspender con un agitador tipo vortex
5. Adicionar 300 μl de solución II de Birboim mezclar suavemente (10 inversiones máximo).
6. Adicionar 225 μl de la solución III de Birboim
7. Incubar en hielo durante 10 minutos
8. Centrifugar a 12^3 r.p.m. por 5 min.

9. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf previamente marcado.
10. Adicionar un volumen igual de isopropanol frío.
11. Centrifugar a 12^3 r.p.m. por 5 min.
12. Eliminar sobrenadante y limpiar la pastilla con 50 μ l de etanol 70 %.
13. Mezclar con un vortex
14. Centrifugar a 12^3 r.p.m. por 5 min.
15. Cuidadosamente descartar el sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre una toalla de papel para secar la pastilla.
16. Disolver la pastilla en 40 μ l de agua desionizada.
17. Adicionar 1 μ l de RNAsa (10 mg/ml) y mezclar e incubar a 37°C por 15 min.
18. Analizar por electroforesis en gel de agarosa de 0,8%.

Protocolo 7

Extracción de ADN plasmídico de un cultivo bacteriano (maxiprep de Qulagen)

1. Picar una colonia e Inocular en 250 ml de medio LB con el correspondiente antibiótico e incubar durante toda la noche a 37° C con agitación constante.
2. Centrifugar (centrifuga marca sorvall mod. Super T21 rotores SL50T y SL250T) a 10^3 rpm durante 10 minutos.
3. Eliminar sobrenadante y resuspender la pastilla con 20 ml de la solución P1.
4. Mezclar hasta resuspender en un agitador tipo vortex.
5. Adicionar 20 ml de la solución P2 y mezclar suavemente.
6. Adicionar 20 ml de la solución P3 e incubar en hielo 10 minutos.
7. Centrifugar a 12^3 rpm a 4° C por 30 minutos.
8. Pasar el sobrenadante a un frasco sorvall haciéndolo pasar por una magitel estéril sobre un embudo.
9. Adicionar un volumen igual de isopropanol frío y mézclase invirtiendo el tubo suavemente.
10. Centrifugar a 12^3 rpm por 30 minutos.
11. Desechar el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente.
12. Resuspender con 5 ml de agua desionizada estéril.
13. Pasar los 5 ml a un columna de resina previamente equilibrada con la solución QBT (10 ml de solución QBT).

NOTA: la columna deberá estar de manera vertical para que las soluciones bajen por gravedad a través de la resina

14. Una vez que el ADN se queda en la columna por diferencia de cargas se lava dos veces con 10 ml de la solución QC

15. Eluir la muestra con 5 ml de la solución QF por lo que se coloca un tubo corex bajo la columna.
16. Adicionar un volumen igual de isopropanol frío e incubar a 4° C por 15 minutos.
17. Centrifugar a 12³ rpm por 30 minutos.
18. Desechar el sobrenadante y secar la pastilla
19. Resuspender en 500 µl de agua desionizada estéril.

Protocolo 8

Recuperación y purificación de bandas a partir de un gel de electroforesis.

1. Adicionar 3 veces (µl) el peso (gr.) de NaI que incluye el sistema.
2. Incubar a 65° C 10 minutos hasta disolver la agarosa.
3. Adicionar 15 µl de la solución glass milk e incubar 20 minutos a temperatura ambiente agitando.
4. Centrifugar y retirar sobrenadante.
5. Lavar dos veces con 1 ml de la solución new wash.
6. Centrifugar y retirar sobrenadante
7. Adicionar 20 µl de agua desionizada.
8. Incubar a 65° C por 15 minutos.
9. Centrifugar y recuperar el sobrenadante.
10. Visualizar en un gel 1 µl de la muestra.

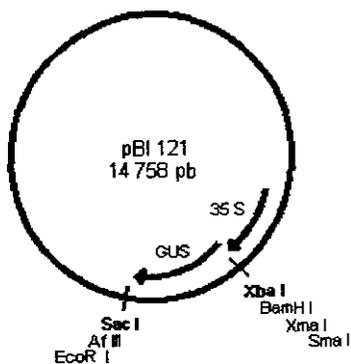
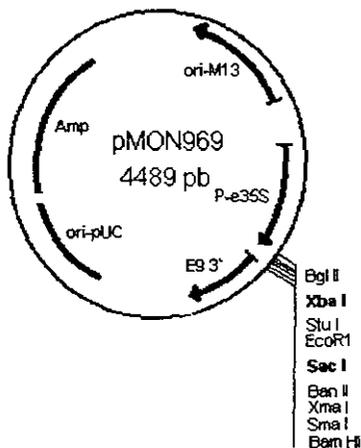


Fig. 11.- vector pBI 121

9.- PROTOCOLO DE LIGACIÓN pBI 121-Rep

- 2 µl de vector
- 10 µl de Rep
- 4 µl de buffer 5x
- 1 µl de ligasa
- 3 µl de agua desionizada estéril.



PROTOCOLO 10

LIGACIÓN pMON 969-REN

- 3 μ l del vector
- 6 μ l de REN
- 1 μ l de ligasa
- 4 μ l de buffer 5x
- 6 μ l agua desionizada
- Incubar a 4° C y a 16° C durante 16hrs

Fig. 12.- vector pMON 969

Protocolo 11

Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

La mayoría de los protocolos de extracción de ADN utilizan detergentes y solventes orgánicos esto con el objeto de lisar los núcleos de las células y además propiciar la remoción de proteínas asociadas al ADN para posteriormente precipitarlos con el uso de sales y alcoholes.

Método de extracción de ADN "Plant DNAzol" (Gibco, Life Technologies) modificado

1. Tomar de 4 a 5 hojas o la planta completa si es muy pequeña.
2. Colocarlas el tejido en tubos eppendorf y congelar las muestras en nitrógeno líquido
3. Moler las muestras congeladas abriendo el tubo eppendorf y macerar el tejido con la punta metálica de un homogenizador.
4. Adicionar 300 μ l de DNAzol (sistema comercial)
5. Adicionar 300 μ l de fenol:cloroformo 1:1
6. Mezclar con un agitador tipo vortex
7. Centrifugar a 14³ rpm por 5 minutos
8. Recuperar sobrenadante
9. Adicionar 300 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1
10. Mezclar y centrifugar a 14³ rpm por 5 minutos
11. Recuperar sobrenadante
12. Agregar un volumen igual de isopropanol.
13. Centrifugar a 10³ rpm por 5 minutos
14. Retirar sobrenadante
15. Añadir 50 μ l de etanol 70 %

16. Centrifugar a 10^3 rpm por 5 minutos
17. Decantar y secar
18. Resuspender con 50 μ l de agua desionizada.
19. Correr 1 μ l muestra en un gel de agarosa al 0.8%

Cuadro 1
Compuestos de la solución X-GLUC

Solución de tinción	Concentración final
Buffer de fosfatos Na pH 7.0	50mM
EDTA	10mM
Triton x-10	0.1%
Ferrocianuro K	2mM
Ferricianuro K	2mM
Cloranfenicol	100mg/ml
X-Gluc	1mg/ml

Cuadro 2
Medio de cultivo Luria-Broth (LB)

COMPUESTO	%
Hidrolizado enzimático de caseína	1
Cloruro de sodio	0.5
Extracto de levadura	0.5

Ajustado el pH a 7.2 – 7.4 y esterilizado a 121°C por 25 minutos y en caso de ser necesario solidificado con Bactoagar Oxoid® 1.2 %, además de los antibióticos necesarios para la selección de la bacteria, estos se adicionan una vez que haya reducido la temperatura. Se seleccionaron con Kanamicina (100mg/ml) Xgal (100ml/ml) e IPTG (1M).

Cuadro 3
Soluciones para extracción de ADN plasmidico por medio de miniprep birboim.

Solución de lisis Birboim I		Solución alcalina Birboim II		Solución salina Birboim III	
Tris.HCl,	1M pH8	NaOH	2N	Acetato de potasio	5M
EDTA	0.25M pH 8	SDS	10%	Ácido acético glacial	
Glucosa	1M				
Volumen final y aforar con agua desionizada.		Volumen final y aforar con agua desionizada.		Volumen final y aforar con agua desionizada.	

Cuadro 4

Soluciones para una maxiprep de Quiagen.

Composición para 1 lt de solución. No autoclavar MOPS o soluciones que contengan Isopropanol, esterilizar por filtrado. Las soluciones con Tris ajustar pH con HCl.

P1	P2
Disolver en 800 ml agua desionizada: Tris-base 6.60 grs. Na ₂ EDTA · 2H ₂ O 3.72 grs. Añadir 100 mg RNAsa Aforar con agua desionizada.	Disolver en 8.0 grs. de NaOH en 950 ml de agua desionizada SDS 20% (p/v) 50 ml
P3	QBT
Disolver 294.5 grs. de acetato de potasio en 500 ml de agua desionizada Ajustar a un pH 5.5, con ácido acético glacial (aprox. 110 ml.) Ajustar a 1 litro con ácido acético.	Disolver 294.5 grs. de acetato de potasio en 500 ml de agua desionizada Ajustar a un pH 5.5, con ácido acético glacial (aprox. 110 ml.) Ajustar a 1 litro con ácido acético.
QC	QF
Disolver 58.44 grs. de NaCl en 800 ml de agua desionizada Añadir 10.46 grs. de MOPS Ajustar el pH a 7.0 con NaOH Añadir 150 ml de isopropanol Aforar con agua desionizada.	Disolver 73.05 grs. de NaCl en 800 ml de agua desionizada Añadir 6.06 grs. de Tris base Ajustar el pH a 8.5 con HCl Añadir 15 ml de isopropanol Aforar con agua desionizada a 1 lt.

Cuantificación de ADN

Las purinas y pirimidinas interaccionan con la luz ultravioleta (UV) por lo que cualquier molécula que contenga bases nitrogenadas (nucleosidos, nucleótidos y polinucleótidos) puede ser analizada usando luz UV. Los ácidos nucleicos presentan mayor absorción de luz UV a 254-260 nm de longitud de onda. La estimación referente a cantidad y pureza del ADN plasmídico y genómico fue determinado por densidad óptica de 260 nm y 280 nm mediante el uso de un espectrofotómetro.

Procedimientos:

1.- Agregar 999 µl de agua desionizada a un tubo eppendorf y 1 µl de muestra, mezclar suavemente y pasarlo a una celda de cuarzo.

2.- Tomar la lectura a 260 y 280 nm.

Nota el resultado esta en ng/ml a 260 nm y para calcular la pureza es necesario dividir la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm. La pureza debe estar entre 1.8 y 2 para que sea considerada buena.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMV	<i>Virus africano del mosaico de yuca</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCTV	<i>Virus del encrespado de betabel</i>
BeYDV	<i>Virus del enanismo amarillo de frijol</i>
BGMV	<i>Virus del mosaico dorado de frijol</i>
BP	Bipartita
c	Complementaria
CaMV	<i>Virus del mosaico de la coliflor</i>
CbLCV	<i>Virus del enrollamiento de hoja de col</i>
CdTV	<i>Virus chino del tomate</i>
CSMV	<i>Virus del mosaico estriado de Chloris</i>
FR	Forma replicativa
GUS	<i>B-gluconidasa</i>
kD	Kilodalton
RIL	Región intergénica larga
MLA	Marco de lectura abierta
MP	Monopartita
MSV	<i>Virus del estriado del maíz</i>
pb	pares de bases
PC	Proteína de la cápside
PepGMV	<i>Virus del mosaico dorado de chile</i>
PHV	<i>Virus huasteco del chile</i>
PJV	<i>Virus del chile jalapeño</i>
Pbs	Plasmido BlueScript
RC	Región común
RCR	Replicación por círculo rodante
REn	Proteína potenciadora de la replicación
Rep	Proteína iniciadora de la replicación
RI	Region intergénica
RIP	Region intergénica pequeña

SqLCV	<i>Virus del enrollamiento de hoja de calabaza</i>
STLCV	<i>Virus del enrollamiento de hoja de tomate de Sinaloa</i>
TGMV	<i>Virus del mosaico dorado de tomate</i>
TMV	<i>Virus del mosaico del tabaco</i>
TPCTV	<i>Virus del pseudo-enrollamiento apical del tomate</i>
TPV	<i>Virus texano del chile</i>
TrAP	Proteína activadora de la transcripción
TYDV	<i>Virus del enanismo amarillo de tomate</i>
TYMV	<i>Virus del mosaico amarillo de tomate</i>
TToMoV	<i>Virus taino del moteado del tomate</i>
TYLCV	<i>Virus del enrollamiento amarillo de hoja de tomate</i>
V	Virion
WDV	<i>Virus del enanismo de trigo</i>