



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE MALEZAS HOSPEDANTES  
DEL *Okra yellow mosaic Mexico virus* Y  
DETERMINACIÓN DE SU TRANSMISIÓN POR  
SEMILLA**

**CANDELARIO ORTEGA ACOSTA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2017**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe CANDELARIO ORTEGA ACOSTA, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. DANIEL OCHOA MARTÍNEZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Identificación de malezas hospedantes del okra yellow mosaic Mexico virus y determinación de su transmisión por semilla y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 15 de Septiembre de 2017



Firma del  
Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Identificación de malezas hospedantes del *Okra yellow mosaic Mexico virus* y determinación de su transmisión por semilla** realizada por el alumno: **Candelario Ortega Acosta** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

ASESOR



Dr. Javier Hernández Morales

ASESOR



Dr. Sergio Ramírez Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2017

**IDENTIFICACIÓN DE MALEZAS HOSPEDANTES DEL *Okra yellow mosaic Mexico virus* Y DETERMINACIÓN DE SU TRANSMISIÓN POR SEMILLA**

**Candelario Ortega Acosta, M C.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**RESUMEN**

Los begomovirus infectan una amplia variedad de especies vegetales principalmente en regiones tropicales y subtropicales siendo las malezas un reservorio importante de éstos. Inicialmente se estableció que los begomovirus no se transmitían por semilla, no obstante, en los últimos años se han reportado diferentes especies transmitidas por esta vía. En el estado de Guerrero, México, se han encontrado begomovirus asociados a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) pero se desconoce si éstos se encuentran en malezas y si se transmiten por semilla. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer si los begomovirus detectados en jamaica se encuentran en malezas asociadas al cultivo y determinar si se transmiten por semilla, con la hipótesis de que existen malezas hospedantes de los begomovirus asociados a jamaica y éstos se transmiten por semilla. En 2016 se colectaron plantas de jamaica y malezas con síntomas de amarillamiento y mosaico en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, así como plantas asintomáticas de ambas como testigo. Las plantas fueron analizadas por PCR con iniciadores universales para begomovirus y específicos para el gen 18Sr como control interno. Los productos amplificados fueron secuenciados, comparados subidos a la base de datos del GenBank®. Por otro lado, se obtuvo semilla de plantas de jamaica y de malezas positivas a begomovirus; parte de la semilla de jamaica se analizó para begomovirus por PCR de la manera antes indicada y otra se sembró en almácigos para obtener plántulas y analizarlas por esta misma técnica previa amplificación de ADN circular por círculo rodante. En el caso de malezas, sólo se analizó la semilla. En plantas de jamaica colectadas en campo con síntomas de mosaico y amarillamiento se detectó al VEM (Vector-

Enabled Metagenomic) *begomovirus 3* y al *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), respectivamente; no obstante, estos virus no se encontraron en semilla ni plántulas. Se identificaron seis especies de malezas con síntomas de amarillamiento y distorsión foliar, de las cuales *Sida collina*, *Sida aggregata*, *Sida acuta*, *Sida hankeana* y *Malacra fasiata* fueron positivas a OYMMV *in planta* y semilla.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM *begomovirus 3*, Amplificación por círculo rodante.

**IDENTIFICATION OF HOSTS WEEDS OF *Okra yellow mosaic Mexico virus* AND  
DETERMINATION OF ITS TRANSMISSION BY SEED**

**Candelario Ortega Acosta, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**ABSTRACT**

Begomovirus infect a wide variety of plant species mainly in tropical and subtropical regions being weeds an important reservoir of these. Initially, it was established that the begomovirus were not transmitted by seed, however, in recent years different species have been reported in this way. In the state of Guerrero, Mexico, have been found begomovirus associated with roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) but it is unknown if these are found in weeds and transmitted by seed. Therefore, the objective of this research was to know if the begomovirus detected in roselle are found in weeds associated with this crop and to determine if they are transmitted by seed, with the hypothesis that there are weeds hosts of the begomovirus associated with roselle and these are transmitted by seed. In 2016, plants of roselle and weeds were collected with symptoms of yellowing and mosaic in the municipalities of Ayutla and Tecoanapa, Guerrero, as well as asymptomatic plants of both as a witness. The plants were analyzed by PCR with universal primers for begomovirus and specific for the 18Sr gene as internal control. The amplified products were sequenced and compared in the GenBank ® database. On the other hand, it is obtained seeds from plants of roselle and weeds positive to begomovirus; part of the seed of roselle was analyzed for begomovirus by PCR in the aforementioned manner and another was planted in seedbeds for seedlings and analyzed by this same technique after amplification of DNA circular by rolling circle. In the case of weeds, only seed was analyzed. In plants of roselle collected in field with symptoms of mosaic and yellowing, VEM (Vector-Enabled Metagenomic) *begomovirus 3* and

*Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), were detected, respectively; however, these viruses were not found in seed or seedlings. Six species of weeds with symptoms of yellowing and distortion foliar were identified: *Sida collina*, *Sida aggregata*, *Sida acuta*, *Sida hankeana* and *Malacra fasiata* and they were positive to OYMMV in plant and seed.

**Keywords:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM begomovirus 3, Rolling Circle Amplification.

## **DEDICATORIA**

Con todo mi ser y corazón, a mi compañera de vida Rosibel, por su confianza, paciencia, por darme ánimo, pero sobre todo por haberme regalado lo más preciado que tenemos, nuestros hijos

Azael y Said, que cada día nos llenan de felicidad.

A mis padres, Filogonia y Agustín, por haberme regalado la vida, por su apoyo, consejos y enseñanzas.

A mis hermanas y hermanos, por todo lo compartido y vivido juntos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, al programa de Fitosanidad-Fitopatología, a todo el personal que lo integra por todo el aporte en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por su confianza, apoyo y orientación para realizar este proyecto, así como su motivación y apoyo incondicional para seguir adelante.

A mi consejo particular: Dr. Javier Hernández Morales y Dr. Sergio Ramírez Rojas, por ser parte de mi formación profesional.

Al M.C. Ricardo Vega Muñoz, por su apoyo en el montaje de las especies de plantas colectadas.

Al Dr. Jorge Alberto Gutiérrez Gallegos, por la determinación de las especies de plantas colectadas.

A los productores de jamaica del Estado de Guerrero por permitir el acceso y muestreo en sus parcelas.

A todos mis compañeros de generación por compartir gratos momentos en mi estancia de maestría.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	vi
DEDICATORIA .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
LISTA DE CUADROS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 Importancia de la jamaica.....	1
1.2- Begomovirus .....	1
1.2.1 Ciclo de replicación .....	1
1.2.2. Proteínas y su función.....	2
1.3-Transmision de begomovirus por <i>Bemisia tabaci</i> .....	3
1.4-Transmisión de virus por semilla .....	3
1.4.1 Distribución del virus en la semilla .....	3
1.4.2 Formas de transmisión por semilla.....	4
1.4.3 Factores que intervienen en la tasa de transmisión por semilla .....	5
1.5 Malezas hospedantes de begomovirus.....	6
1.6- Amplificación por círculo rodante .....	6
1.7 Literatura citada.....	7
CAPÍTULO II. - BEGOMOVIRUS EN JAMAICA Y HOSPEDANTES ALTERNOS .....	10
2. 1 RESUMEN .....	10
2.2 ABSTRACT.....	11
2.3 INTRODUCCIÓN.....	12
2.4 OBJETIVO.....	12
2.4.1 Objetivo general.....	12
2.4.2 Objetivo específico.....	12
2.5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
2.5.1 Colecta de plantas.....	13
2.5.2 Extracción de ADN .....	13
2.5.3 Detección de begomovirus por PCR.....	13
2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
2.6.1 Colecta de plantas.....	14

2.6.2 Detección de begomovirus por PCR.....	14
2.7 CONCLUSIONES.....	19
2.8 LITERATURA CITADA.....	20
CAPÍTULO III. TRANSMISIÓN DE BEGOMOVIRUS POR SEMILLA DE JAMAICA Y MALEZAS ASOCIADAS .....	22
3.1 RESUMEN .....	22
3.2 ABSTRACT.....	23
3.3 INTRODUCCIÓN.....	24
3.4 OBJETIVOS.....	24
3.4.1 Objetivo general.....	24
3.4.2 Objetivo específico.....	25
3.5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
3.5.1 Prueba de transmisión en plántulas de jamaica .....	25
3.5.2 Extracción de ácidos nucleicos totales.....	25
3.5.3 Amplificación por círculo rodante (ACR).....	26
3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
3.7 CONCLUSIONES.....	29
3.8 LITERATURA CITADA .....	30

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO II

- Cuadro 1.** Begomovirus detectados por PCR en tres cultivares de jamaica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero. .... 15
- Cuadro 2.** Begomovirus detectados en malezas asociadas al cultivo de jamaica colectadas en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México..... 17

### CAPÍTULO III

- Cuadro 1.** Malezas en cuya semilla se detectó *al Okra yellow mosaic Mexico virus*. .... 28

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Síntomas asociados a begomovirus en plantas de jamaica: A) Moteado amarillo asociado a Okra yellow vein mosaic Mexico virus; B) Mosaico asociado al VEM begomovirus 3..... 16
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores universales para begomovirus (□550 pb) y específicos para un fragmento del gen 18Sr (844 pb): Carril 1: Control positivo (planta positiva a OYMMV); Carril 2: Control negativo (planta asintomática); Carril 3: Agua; Carril 4: Sida aggregata; Carril 5: Sida collina; Carril 6: Sida haenkeana; Carril 7: Sida acuta; Carril 8: Malachra fasciata; Carril 9: Euphorbia heterophylla; Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega®)..... 18

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR con los iniciadores universales para begomovirus Av494/Ac1048 (□550 pb) y específicos para el gen 18Sr (844 pb). Carril 1: Control positivo (planta positiva a OYMMV); Carril 2, Control negativo (agua); Carril 3: Sida aggregata; Carril 4: Sida collina; Carril 5: Sida haenkeana; Carril 6: Sida acuta; Carril 7: Malachra fasciata; Carril M; Marcador de peso molecular 100pb (Promega®). ..... 28

## CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Importancia de la jamaica

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) se utiliza para la preparación de diversos productos en la industria alimenticia y medicinal (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014). Se cultiva generalmente en suelos marginales de baja fertilidad y con poca retención de humedad. En México, el estado de Guerrero es el principal productor con 14,033 ha destinadas a este cultivo, donde los municipios de Tecoaapa y Ayutla registran la mayor producción y superficie cultivada (SIAP, 2017) por lo que es de gran importancia socioeconómica por el número de empleos que genera en la región.

### 1.2- Begomovirus

Los begomovirus pertenecen a la familia Geminiviridae, este género comprende más de 320 especies reconocidas, poseen partículas geminadas, infectan una amplia gama de especies vegetales y son transmitidos por un complejo de especies crípticas de *Bemisia tabaci* y su genoma puede ser bipartita (ADN-A y ADN-B circular, cada uno de aproximadamente 2.6 kb) o monopartita (una sola molécula circular de ADN de aproximadamente 2.7 kb) (Brown *et al.*, 2015). La mayoría de los begomovirus monopartitas están asociados con satélites circulares de ADN de dos tipos, alfasatélites y betasatélites (Zhou, 2013). Los begomovirus inducen síntomas severos en sus hospedantes que incluyen mosaico amarillo, mosaico dorado y distorsión foliar (Zerbini *et al.*, 2017).

#### 1.2.1 Ciclo de replicación

El primer paso en la replicación de los begomovirus es la síntesis de la cadena complementaria genómica (ADN monocatenario), para producir ADN bicatenario (ADN<sub>bc</sub>) utilizando un mecanismo aún desconocido que se piensa es catalizado completamente por factores del

hospedante (Fondong, 2013). Los begomovirus no codifican una ADN polimerasa, por lo que dependen de los factores del hospedante en la primera etapa de su replicación, la cual emplea un mecanismo de círculo rodante y dependiente de la recombinación (Zerbini, *et al.*, 2017). A partir del ADN genómico, se producen dos formas de ADNbc predominantes, se genera ADN superenrollado para iniciar la transcripción y expresión de genes virales y posteriormente se forma un ADN circular abierto como plantilla para replicación, resultando en la producción eventual de ADN viral de cadena simple. También se generan formas de ADN lineal durante la replicación (Saunders, 2008).

### 1.2.2. Proteínas y su función

Los begomovirus forman diferentes proteínas durante su replicación: 1) proteína asociada a la replicación (AC1) que es conservada en secuencia, posición y función; se considera esencial para la replicación por círculo rodante y está implicada en la modulación de la expresión génica; 2) proteína activadora de la transcripción (AC2) que es multifuncional, está relacionada con la patogenicidad del virus y la supresión del silenciamiento génico, activa la transcripción de los genes que codifican la proteína de la cubierta proteica y la proteína de movimiento; 3) proteína potenciadora de la replicación (AC3), la cual no es esencial para la replicación pero mejora la acumulación de ADN viral y el desarrollo de síntomas; 4) proteína AC4, involucrada en el desarrollo de síntomas y movimiento del virus; 5) proteína de la cápside (AV1), es la única proteína estructural, además de la encapsidación del genoma viral, tiene otras funciones importantes como la transmisión por insectos, movimiento del ADN viral dentro y fuera del núcleo, de célula a célula y la diseminación sistémica en la planta. A pesar de que la región que codifica para la cápside contiene secuencias altamente conservadas, también contiene regiones variables que pueden utilizarse para hacer inferencias filogenéticas; 6) proteína AV2, presente solo en begomovirus

monopartitas, de función incierta aunque se señala que podría estar involucrada en la supresión del silenciamiento génico. En el componente B se encuentran dos proteínas: 1) proteína de movimiento BV1, requerida para el tráfico del ADNmc viral entre el núcleo y el citoplasma y 2) proteína BC1 requerida para el movimiento de célula a célula de la partícula viral (Fondong, 2013).

### 1.3-Transmisión de begomovirus por *Bemisia tabaci*

Los begomovirus son transmitidos por un complejo de especies crípticas de *Bemisia tabaci* que se distribuyen por todo el mundo y colonizan una amplia gama de plantas en diferentes familias (Brown *et al.*, 2015). La transmisión ocurre de una manera persistente circulativa, lo cual consiste en que una vez ingerido por *B. tabaci*, el virus es traslocado al tracto digestivo y atraviesa las células epiteliales para llegar a la hemolinfa y posteriormente a las glándulas salivales para finalmente entrar en el conducto salival (Ghanim *et al.*, 2001).

### 1.4-Transmisión de virus por semilla

La transmisión por semilla de patógenos de plantas es determinante para la aparición de enfermedades en los cultivos así como para la supervivencia del inóculo de una estación a otra (Albrechtsen, 2006). Se han reportado alrededor de 231 virus y viroides transmitidos por semilla en diferentes partes del mundo, y todos los virus transmitidos de esta manera poseen genoma de ARN (Sastry, 2013). Recientemente, diversos estudios han comprobado que virus con genoma de ADN, como los begomovirus, también son capaces de transmitirse por esta vía (Kim *et al.*, 2015).

#### 1.4.1 Distribución del virus en la semilla

En el caso de las semillas de frutas carnosas como el tomate, pepino, sandía y manzana, virus como el *Tobacco mosaic virus* y el *Tomato mosaic virus*, pueden adherirse a la testa de la semilla,

por lo que en la germinación, la infección del virus ocurre a través de las pequeñas abrasiones causadas por partículas del suelo (Sastry, 2013). Por otro lado, el virus puede llegar al embrión cuando ocurre una infección indirecta, es decir, a través de la infección de los gametos antes de la fertilización o por la invasión directa después de la fertilización; en este último caso también puede encontrarse en el endospermo (Johansen *et al.*, 1994). Algunos virus también se han encontrado en el endospermo y en los cotiledones (Roberts *et al.*, 2003; Ali y Kobayashi 2010). Sin embargo, a diferencia de otros patógenos transmitidos por semilla, como los hongos, el inóculo viral puede, con muy pocas excepciones, sobrevivir sólo si entra en el embrión de la semilla y permanecen infectivos siempre y cuando las semillas sean viables. La infección de otras partes de la semilla durante su desarrollo es probable que ocurra en la mayoría de los virus que se mueven de célula a célula a través de plasmodesmos, no obstante, durante la maduración de la semilla, las partículas virales localizadas fuera del embrión generalmente son inactivadas (Albrechtsen, 2006).

#### 1.4.2 Formas de transmisión por semilla

Una flor típica consta de cuatro órganos florales: sépalos, pétalos, estambres y pistilo (s), y sólo los dos últimos están directamente relacionados en la producción de semillas. La capacidad de los virus para infectar sistémicamente a la planta y llegar al óvulo o los granos de polen antes de la fertilización incrementa sus posibilidades de transmisión por semilla ( Sastry, 2013). Existen dos vías en que los virus pueden infectar el embrión:

A) Invasión directa: La aparente separación precoz del óvulo y del saco embrionario del tejido materno debe impedir la invasión directa del embrión, ya que la separación resulta de la desaparición del plasmodesmo y la formación de una capa de callos y posteriormente de una gruesa pared de pecto-celulosa (Johansen *et al.*, 1994). Wang y Maule (1992) propusieron que el virus

utiliza el suspensor embrionario para la invasión directa del embrión. El suspensor es una estructura transitoria que proporciona apoyo nutricional y posicional para el embrión a comienzos de su desarrollo, pero posteriormente se degenera a medida que los cotiledones se expanden. Dicha degeneración cierra con eficacia esta ventana hipotética para la invasión directa adicional del embrión. Se sabe que el *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) se acumula en el suspensor facilitando la infección del embrión ya que en el punto de contacto entre el suspensor y la radícula embrionaria se han observado un gran número de partículas virales (Maule y Wang 1996; Roberts *et al.*, 2003).

B) Invasión indirecta: Se han observado virus en la célula madre megaspora y el huevo o en las células madre del polen y el polen, por lo que el índice de transmisión por esta vía dependerá de la habilidad del virus para invadir los tejidos meristemáticos reproductivos como se ha demostrado en el caso del *Tobacco ringspot virus* (TRSV) y *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Johansen *et al.*, 1994; Carroll, 1981).

#### 1.4.3 Factores que intervienen en la tasa de transmisión por semilla

La existencia y el alcance de la transmisión depende de varios factores, en primer lugar la especie de virus, aislamiento, hospedantes, tiempo de infección de la planta madre y las condiciones ambientales (Albrechtsen, 2006).

Algunos virus transmitidos por semilla se inactivan dentro de un corto período, mientras que otros pueden permanecer activos durante un mayor tiempo. Maule y Wang (1996) sugieren cuatro factores que regulan la posible transmisión de virus por semilla; 1) la capacidad del virus para invadir los gametos o los tejidos meristemáticos; 2) la supervivencia de los gametos y el embrión

infectados por virus; 3 la multiplicación y el movimiento del virus; 4 la maduración del embrión que afecta la longevidad del virus.

### 1.5 Malezas hospedantes de begomovirus

Muchas especies de malezas han sido reportadas como hospedantes naturales de begomovirus, especialmente las pertenecientes a las familias Malvaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Caparaceae y Sterculiaceae (Barreto *et al.*, 2013). Una gran diversidad de especies de begomovirus se ha caracterizado de malezas en las décadas recientes. Frecuentes infecciones mixtas de muchas malezas con diferentes begomovirus hacen que éstas sean cruciales para la generación de nuevos virus a través de la recombinación, un fenómeno que es fundamental para la especiación y evolución en la familia Geminiviridae; el desarrollo de nuevos begomovirus en estas malezas claramente podría tener importantes consecuencias para las especies cultivadas (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Existen reportes de diferentes malezas hospedantes de begomovirus que son determinantes en la epidemiología de las enfermedades que ocasionan (Prajapat *et al.*, 2014).

Por lo tanto, hay una necesidad apremiante de información adicional sobre la diversidad y distribución de las malezas asociadas a cultivos que probablemente sirvan como reservorio de begomovirus.

### 1.6- Amplificación por círculo rodante

La amplificación por círculo rodante (ACR) utilizando la polimerasa del bacteriófago  $\phi$  29 ADN permite un diagnóstico fiable de geminivirus y presumiblemente de todos los virus con pequeños genomas de ADN monocatenarios circulares. Los resultados de diferentes investigaciones muestran la eficacia de esta técnica en la caracterización del ADN de varios geminivirus. Esta técnica tiene diversas ventajas: (a) no son necesarios dispositivos costosos, (b) manipulación

sencilla, (c) detección de todos los ADN circulares sin ningún conocimiento previo en una sola etapa, y (d) bajos costos por reacción. En adición, el ADN viral amplificado con ACR puede caracterizarse por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción y secuenciarse directamente hasta 900 bases en una única operación evitando la clonación y la purificación de plásmidos. Este atajo acelerará considerablemente la genómica de geminivirus, nanovirus y circovirus en el futuro (Haible *et al.*, 2006).

### 1.7 Literatura citada

- Albrechtsen, S. E. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. London, UK. CAB International 268 p.
- Ali, A., and Kobayashi M. 2010. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in Pepper. *Journal of Virological Methods*, 163: 234–237.
- Barreto, S. S., Hallwass, M., Aquino, O. M., and Inoue-Nagata, A. K. 2013. A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology*, 103:436-444.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., and Varsani, A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160: 1593–1619.
- Carroll, T.W. 1981. Seed-borne viruses: virus–host interactions. In: Maramorosch, K. and Harris, K.F. (eds.) Plant Diseases and Vectors. Ecology and Epidemiology. Academic Press: Ecology New York, pp. 293–317.

- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., and Heinrich, M. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L. A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165: 424–443.
- Fondong, V. N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14: 635–649.
- Ghanim, M., Morin S., and Czosnek H. 2001. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*, 91:188–196.
- Haible, D., Kober, S., and Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135(1):9–16.
- Johansen, I. E., Edwards M. C., and Hampton R. O. 1994. Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32:363–386.
- Kim, J., Kil, E.-J., Kim, S., Seo, H., Byun, H.-S., Park, J., Chung, M.-N., Kwak, H.-R., Kim, M.-K., Kim, C.-S., Yang, J.-W., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., and Lee, S. 2015. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathology*, 64: 1284–1291.
- Maule, J. A., and Wang, D. 1996. Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends in Microbiology*, 4:153–158.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., and Sánchez-Campos, S. 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 219–48.
- Prajapat, R., Marwal, A., and Gaur, R. K. 2014. Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47: 157-170.

- Roberts, I. M., Wang D., Thomas C. L., and Maule A. J. 2003. *Pea seed-borne mosaic virus* seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma*, 222:31–43.
- Saunders, K. 2008. Analysis of Geminivirus DNA Replication by 2-D Gel., *Plant Virology Protocols*, 451:135–143.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/icultivo/index.jsp). (Consultado en mayo 2017).
- Sastry, K. S. 2013. Diseases, Seed-borne Plant Virus. Springer I. New Delhi, India. 327 p.
- Wang, D., and Maule A. J. 1992. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of *Pea seed-borne mosaic virus*. *Journal General Virology*, 73:1615–1620.
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., and ICTV Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profiles: Geminiviridae, *Journal of General Virology*, 98:131-133.

## CAPÍTULO II. - BEGOMOVIRUS EN JAMAICA Y HOSPEDANTES ALTERNOS

### 2. 1 RESUMEN

Los begomovirus infectan una amplia variedad de especies vegetales principalmente en regiones tropicales y subtropicales siendo las malezas un reservorio importante de éstos. En el estado de Guerrero, México, se han encontrado begomovirus asociados a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) pero se desconoce si éstos se encuentran en malezas. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer si los begomovirus detectados en jamaica se encuentran en malezas asociadas al cultivo. En 2016 se colectaron plantas de jamaica y malezas con síntomas de amarillamiento y mosaico en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, así como plantas asintomáticas de ambas como testigo. Las plantas fueron analizadas por PCR con iniciadores universales para begomovirus y específicos para el gen 18Sr como control interno. Los productos amplificados fueron secuenciados y comparados en la base de datos del GenBank®. En plantas de jamaica colectadas en campo con síntomas de mosaico y amarillamiento se detectó al VEM (Vector-Enabled Metagenomic) *begomovirus 3* y al *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), respectivamente. Se identificaron seis especies de malezas con síntomas de amarillamiento y distorsión foliar, de las cuales *Sida collina*, *Sida aggregata*, *Sida acuta*, *Sida hankeana* y *Malacra fasiata* fueron positivas a OYMMV. Finalmente, *Euphorbia mosaic virus* se detectó en *Euphorbia hetrophylla* pero no en jamaica.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM *begomovirus 3*, malezas.

## 2.2 ABSTRACT

Begomoviruses infect a wide variety of vegetable species principally in tropical and subtropical regions being the weeds an important reservoir of these. In the state of Guerrero, Mexico, have been found begomoviruses associated to roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) but it is unknown if they are present in weeds. The objective of this investigation was to know if the begomovirus detected in roselle are in weeds associated with this crop. In 2016, plants of roselle and weeds showing symptoms of yellowing and mosaic were collected in the municipalities of Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, as well as asymptomatic plants of both as a control. The plants were analyzed by PCR with universal primers for begomovirus and specific for the 18SR gene as an internal control. The amplified products were sequenced and compared in the GenBank ® database. In roselle plants collected in the field with mosaic and yellowing symptoms, the VEM (Vector-Enabled Metagenomic) *begomovirus 3* and *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV), were detected, respectively. Six species of weeds with symptoms of yellowing and foliar distortion were identified, of which *Sida collina*, *Sida aggregata*, *Sida acuta*, *Sida hankeana* and *Malacra fasiata* were positive to OYMMV. *Euphorbia mosaic virus* was detected, in *Euphorbia heterophylla*, but not in roselle.

**Keywords:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM *begomovirus 3*, weeds.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

En el cultivo de jamaica a nivel mundial se encuentran reportados los begomovirus *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Hibiscus variegation virus* (HiVV, nombre provisional) (Brunt *et al.*, 1996; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Chatterjee y Ghosh, 2008) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV); este último se reportó recientemente en el estado de Guerrero y se asoció a la enfermedad denominada “amarillamiento de la jamaica” cuya incidencia en algunas parcelas fue del 90 al 100 % (Velázquez-Fernández *et al.*, 2016). Previamente, Hernández-Zepeda *et al.* (2007) detectaron al OYMMV en *Abutilon permolle*, *Corchorus siliquosus* y *Sida acuta* en la Península de Yucatán.

Las malezas son un reservorio potencial de virus económicamente importantes y, en el caso de begomovirus, existen reportes de diferentes malezas hospedantes que son determinantes en la epidemiología de las enfermedades que ocasionan (Prajapat *et al.*, 2014). En el estado de Guerrero se han observado parcelas de jamaica con una alta incidencia de plantas con amarillamiento asociados al OYMMV (Velázquez-Fernández *et al.*, 2016) y de mosaico asociados al VEM *begomovirus 3* (datos no publicados) así como diferentes malezas asociadas al cultivo con síntomas de amarillamiento pero se desconoce si estas últimas son hospedantes de ambos begomovirus.

## 2.4 OBJETIVO

### 2.4.1 Objetivo general

- Conocer si existen hospedantes alternos del OYMMV y del VEM *begomovirus 3*.

### 2.4.2 Objetivo específico

- Identificar las especies de malezas hospedantes del OYMMV y del VEM *begomovirus 3* en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.

## 2.5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.5.1 Colecta de plantas

En agosto y noviembre de 2016 en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, se colectaron plantas de tres materiales de jamaica (Criolla, UAN 1 y Coneja) con amarillamiento o mosaico así como de malezas con amarillamiento, mosaico, mosaico amarillo y distorsión foliar dentro y en la periferia de las parcelas. Como testigo se colectaron plantas asintomáticas de jamaica y de las malezas encontradas; estas últimas fueron montadas para su identificación taxonómica en el Herbario-Hotorio CHAPA y JES.

### 2.5.2 Extracción de ADN

Se realizó a partir de hojas de jamaica y malezas con el producto Concert™ Plant RNA Reagent (Cat. 12322-012, Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN se verificó en un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000) y la integridad se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

### 2.5.3 Detección de begomovirus por PCR

Se utilizaron los iniciadores universales para begomovirus Av494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') y Ac1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3') que amplifican un fragmento de 550 pb del gen de la cubierta proteica (CP) (Wyatt y Brown, 1996). La mezcla de reacción consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.55 µL (10 µM) de cada iniciador, 0.05 µL (10 µM) de cada iniciador del gen 18Sr que amplifican un fragmento de 844 pb como indicador de la efectividad de la PCR (Gambino y Gribaudo, 2006), 4.9 µL de agua ultra pura, 0.1 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL PROMEGA) y 1 µL de ADN (20 ng/µL) en un volumen final de 10 µL. La PCR se realizó en un termociclador (Techne TC-512®) con las siguientes condiciones:

desnaturalización inicial a 95 °C / 4 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C / 1 min, 55 °C / 2 min, 72 °C / 1 min y un ciclo de extensión final de 72 °C / 10 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los productos obtenidos se secuenciaron (Macrogen Inc. Corea), las secuencias fueron editadas con el programa DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>), comparadas y subidas a la base datos del GenBank®.

## 2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.6.1 Colecta de plantas

En total se colectaron 34 plantas de jamaica de diferentes cultivares, de las cuales 30 fueron criolla, dos del cultivar UAN 1 y dos más del cultivar Coneja, con síntomas de amarillamiento o mosaico y 10 asintomáticas, de las cuales seis fueron del cultivar criolla, dos del cultivar UAN 1 y dos más del cultivar Coneja, así como seis malezas diferentes con síntomas de amarillamiento y distorsión foliar y una asintomática de cada una de ellas.

### 2.6.2 Detección de begomovirus por PCR

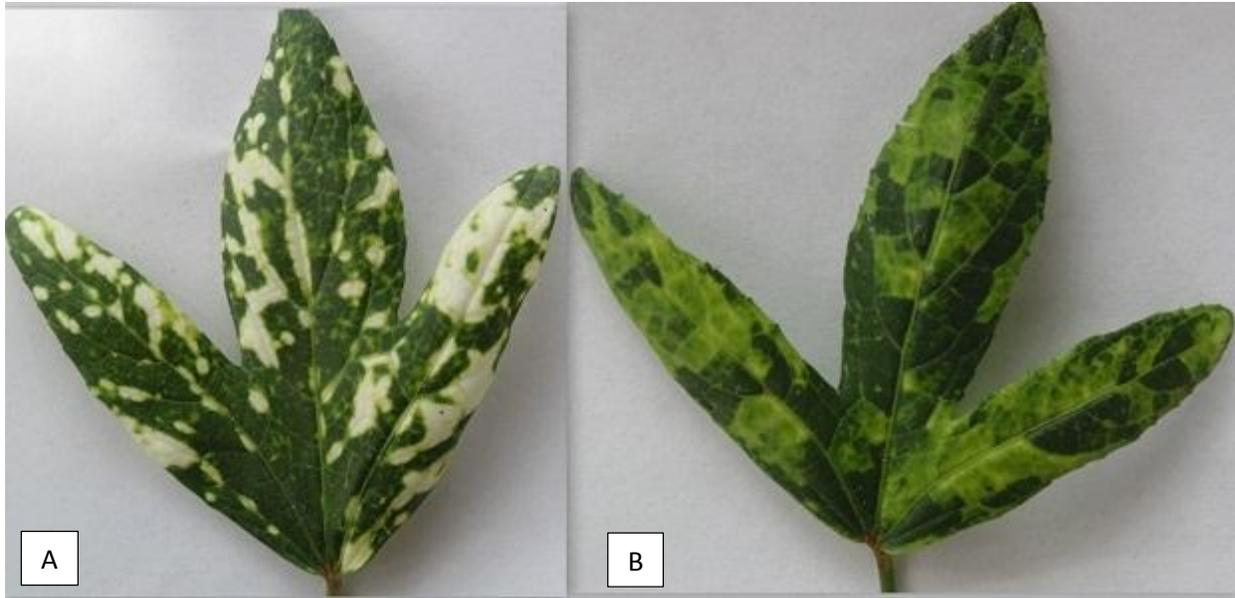
Todas las plantas de jamaica con síntomas amplificaron el fragmento esperado (□550 pb) con los iniciadores universales para begomovirus, 26 tuvieron una similitud del 97-98 % con el VEM *begomovirus 3* (Números de acceso MF632074, MF632075, MF632076 y MF632077) (Cuadro 1). Este begomovirus fue encontrado por Rosario *et al.*, (2015) en *Bemisia tabaci* y se designó como VEM debido a que no se había detectado previamente en una especie vegetal. Las ocho plantas restantes tuvieron una homología del 93-94 % con OYMMV (Números de acceso MF315084, MF315085, MF315086 y MF315087). El OYMMV había sido previamente reportado por Velázquez-Fernández *et al.* (2016) en el cultivo de jamaica en la zona de estudio. En el caso de begomovirus se ha establecido que una secuencia con una similitud  $\geq 91$  % con todo el genoma

o parte del componente ADN-A indica que se trata de la especie en cuestión, mientras que si se tiene una similitud < 91 %, deberá considerarse como una nueva especie (Brown *et al.*, 2015).

**Cuadro 1.** Begomovirus detectados por PCR en tres cultivares de jamaica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.

<b>Cultivar</b>	<b>Begomovirus</b>	<b>Plantas positivas</b>
Criollo	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	8
Criollo	<i>VEM begomovirus 3</i>	22
UAN 1	<i>VEM begomovirus 3</i>	2
Coneja	<i>VEM begomovirus 3</i>	2
<b>Total</b>		<b>34</b>

Las plantas de jamaica positivas a OYMMV inicialmente muestran una clorosis en las nervaduras y posteriormente se observa un moteado amarillo que puede cubrir toda la lámina foliar. En el caso de las plantas de jamaica positivas a *VEM begomovirus 3* se tiene un mosaico que se vuelve más evidente con el tiempo (Figura 1).

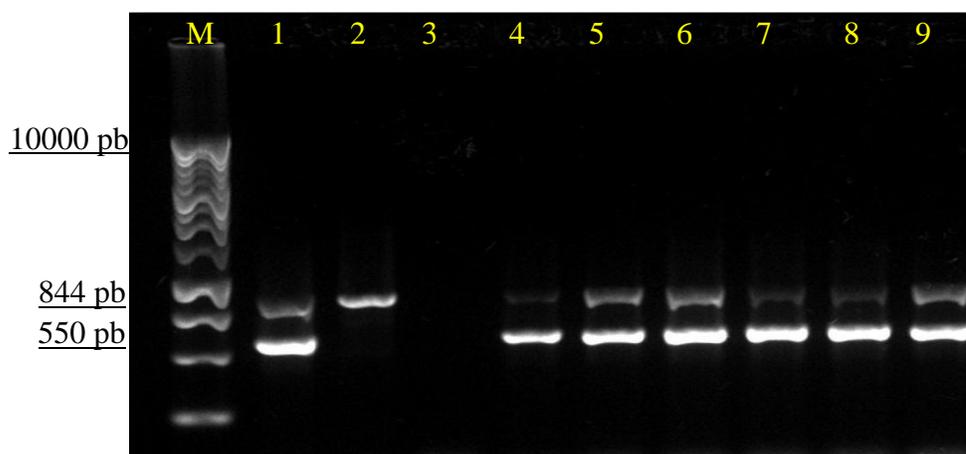


**Figura 1.** Síntomas asociados a begomovirus en plantas de jamaica: A) Moteado amarillo asociado a *Okra yellow mosaic Mexico virus*; B) Mosaico asociado al VEM *begomovirus 3*.

Por otro lado, se identificaron seis especies de malezas pertenecientes a dos familias asociadas al cultivo de jamaica, siendo la familia Malvaceae la que tuvo el mayor número de especies (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los reportados en otras investigaciones en las cuales se han encontrado distintos begomovirus asociados a malezas que pertenecen a la familia Malvaceae (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2016). Todas las especies de malezas que mostraban síntomas amplificaron el fragmento esperado para begomovirus (□ 550 pb) y el del gen 18Sr (844 pb) usado como control interno (Figura 2); este último es esencial para la detección de falsos negativos, degradación del ADN o presencia de inhibidores en la PCR (Gambino y Gribaudo, 2006).

**Cuadro 2.** Begomovirus detectados en malezas asociadas al cultivo de jamaica colectadas en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.

<b>Familia</b> Especie	Begomovirus	Número de acceso Genbank®
<b>Malvaceae</b>		
<i>Sida aggregata</i> K.	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	[MF315079]
<i>Sida collina</i> S.	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	[MF315080]
<i>Sida haenkeana</i> (C.) Presl	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	[MF315081]
<i>Sida acuta</i> Burm. f.	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	[MF315082]
<i>Malachra fasciata</i> Jacq.	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>	[MF315083]
<b>Euphorbiaceae</b>		
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	<i>Euphorbia mosaic virus</i>	[MF632073]



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores universales para begomovirus (□550 pb) y específicos para un fragmento del gen 18Sr (844 pb): Carril 1: Control positivo (planta positiva a OYMMV); Carril 2: Control negativo (planta asintomática); Carril 3: Agua; Carril 4: *Sida aggregata*; Carril 5: *Sida collina*; Carril 6: *Sida haenkeana*; Carril 7: *Sida acuta*; Carril 8: *Malachra fasciata*; Carril 9: *Euphorbia heterophylla*; Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega®).

De las malezas positivas a OYMMV (Cuadro 2), sólo *Sida acuta* había sido reportada previamente como hospedante de este virus C, mientras que *Sida collina*, *Sida aggregata*, *Malachra fasciata* y *Sida hankeana* se reportan por primera vez como hospedantes del mismo. La mayoría de las malezas tienen una alta adaptabilidad al medio ambiente y varias se han reportado como hospedantes de un gran número de begomovirus por lo que son consideradas un factor importante en estudios epidemiológicos (Prajapat *et al.*, 2014). Asimismo, conocer la gama de hospedantes alternos de virus es fundamental para diseñar estrategias eficaces de manejo de virosis ( Kai-Shu *et al.*, 2011).

Ninguna de las especies de malezas analizadas en el presente estudio resultó positiva a VEM *begomovirus 3* aun cuando este virus se detectó en plantas de jamaica con síntomas de mosaico. Ello puede deberse a que el VEM *begomovirus 3* esté limitado al género *Hibiscus* como en el caso

del SPLCV que se encontró solamente en plantas del género *Ipomoea* de un total de 111 especies pertenecientes a 30 familias (Kai-Shu *et al.*, 2011).

## 2.7 CONCLUSIONES

En plantas de jamaica, se detectó al VEM *begomovirus 3* en plantas con mosaico y al OYMMV en plantas que mostraban mosaico y mosaico amarillo respectivamente. Se identificaron cinco especies de la familia Malvaceae, consideradas como malezas en el cultivo de jamaica hospedantes del OYMMV pero no del VEM *begomovirus 3*. Una maleza fue positiva a un begomovirus no detectado en plantas de jamaica.

## 2. 8 LITERATURA CITADA

- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., and Varsani, A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160: 1593–1619.
- Brunt, A., Crabtree, A. K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., and E. J. Zurcher. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/>. (Consulta: Mayo 2017).
- Chatterjee, A., and Ghosh, S. K. 2008. Alterations in biochemical components in mesta plants infected with yellow vein mosaic disease. *Brazilian society of plant physiology*, 20: 267–275.
- Gambino, G., and Gribaudo, I. 2006. Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology*, 96: 1223-1220.
- Hernández-Zepeda, C., Idris, A. M., Carnevali, G., Brown, J. K., and Moreno-Valenzuela, O. A. 2007. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes*, 35: 825–833.
- Kai-Shu, L., Harrison, H. F., Simmons, A. M., Zhang, S. C., and Jackson, D. M. 2011. Experimental host range and natural reservoir of *Sweet potato leaf curl virus* in the United States. *Crop Protection*, 30:1055-1062.

- Nascimento, L. D., Silva, S. J. C., Sobrinho, R. R., Ferro, M. M. M., Oliveira, M. H. C., Zerbini, F. M., Assunção, I. P., and Lima, G. S. A. 2016. Complete nucleotide sequence of a new begomovirus infecting a malvaceous weed in Brazil. *Archives of Virology*, 161: 1735–1738.
- Prajapat, R., Marwal, A., and Gaur, R. K. 2014. Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal. *Archives of Phytopathology and Plant Protecion*, 47: 157-170.
- Rosario, K., Seah, Y., Marr, C., Varsani, A., Krabeger, S., Stainton, D., Moriones, E., Polston, J., Duffy, S., and Breitbart, M. 2015. Vector-Enabled Metagenomic (VEM) Surveys Using Whiteflies (Aleyrodidae) Reveal Novel Begomovirus Species in the New and Old Worlds. *Viruses*, 7: 5553–5570.
- Velázquez-Fernández, P., Zamora-Macorra, E. J., Ochoa-Martínez, D. L., Negrete-Fernández, G., y Hernández-Moráles, J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34: 200–207.
- Wyatt, and Brown, J. K.. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polimerasa chain reaction. *Phytopathology*, 86: 1288–1293.

## CAPÍTULO III. TRANSMISIÓN DE BEGOMOVIRUS POR SEMILLA DE JAMAICA Y MALEZAS ASOCIADAS

### 3.1 RESUMEN

Inicialmente se estableció que los begomovirus no se transmitían por semilla, no obstante, en los últimos años se han reportado diferentes especies transmitidas por esta vía. En el estado de Guerrero, México, se han encontrado a los begomovirus VEM *begomovirus 3* (VEM *begomovirus 3*) y *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) asociados a jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Asimismo cinco malezas asociadas al cultivo son hospedantes de OYMMV, sin embargo, se desconoce si éstos se transmiten por semilla. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer si los begomovirus detectados en jamaica y malezas asociadas al cultivo se transmiten por semilla. Se obtuvo semilla de plantas de jamaica y de malezas positivas a VEM *begomovirus 3* y OYMMV; parte de la semilla de jamaica se analizó para begomovirus por PCR, la otra parte se sembró en almácigos para obtener plántulas y analizarlas por esta misma técnica previa amplificación de ADN circular por círculo rodante. En el caso de malezas sólo se analizó para OYMMV. VEM *begomovirus 3* y OYMMV no se encontraron en semilla ni plántulas de jamaica. *Sida aggregata*, *Sida collina*, *Sida haenkeana*, *Sida acuta* y *Malachra fasciata* fueron positivas a OYMMV *in planta* y semilla.

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM *begomovirus 3*, amplificación por círculo rodante.

### 3.2 ABSTRACT

Initially, it was established that the begomoviruses are not transmitted by seed, however, in recent years different species have been reported in this way. In the state of Guerrero, Mexico, VEM *begomovirus 3* (VEM *begomovirus 3*) and *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OYMMV) are associated to roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). Also, five weeds associated with this crop are hosts of OYMMV. However it is unknown if these begomoviruses are transmitted by seed. Therefore, the objective of this study was to know if begomoviruses detected in jamaica and weeds are transmitted by seed. Seed from plants of roselle and weeds positive to VEM *begomovirus 3* and OYMMV were collected; part of the seed of roselle was analyzed by PCR for begomoviruses, the other part was sown and seedlings were analyzed by the same technique after the amplification of DNA circular by rolling circle method. In the case of weeds, only seed were analyzed. VEM *begomovirus 3* and OYMMV were not found in seed or seedlings of roselle. *Sida aggregata*, *Sida collina*, *Sida haenkeana*, *Sida acuta* and *Malachra fasciata* were positive to OYMMV.

**Keywords:** *Hibiscus sabdariffa*, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, VEM *begomovirus 3*, rolling circle amplification.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

La transmisión por semilla es un factor fundamental en la dispersión primaria de muchos virus y viroides y se estima que alrededor de 231 de ellos son transmitidos de esta manera (Sastry, 2013). La transmisión por semilla se puede dar de manera vertical, lo cual implica el paso del virus de la planta madre a la semilla a través del polen durante la fertilización, o bien, de manera horizontal de planta a planta a través de polen infectado (Albrechtsen, 2006). Los reportes de transmisión por semilla involucraban exclusivamente a virus con genoma de ARN y no de ADN como los begomovirus (Sastry, 2013). Sin embargo, Kim *et al.* (2015) reportaron al *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) como el primer begomovirus transmitido por semilla en camote (*Ipomoea batatas*); posteriormente se reportó un 32 % de transmisión por semilla de *Mung bean yellow mosaic virus* (MYMV) en *Vigna mungo* (Kothandaraman *et al.*, 2016) y del *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en 84 % de semilla de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kil *et al.*, 2016).

En el estado de Guerrero se han observado parcelas de jamaica con una alta incidencia de plantas con amarillamiento asociados al OYMMV (Velázquez-Fernández *et al.*, 2016) y de mosaico asociados al VEM *begomovirus 3* (datos no publicados) así como diferentes malezas asociadas al cultivo con síntomas de amarillamiento identificadas como hospedantes alternas del OYMMV. Esta alta incidencia puede estar asociada, entre otras cosas, a que ambos virus están siendo transmitidos por semilla.

### 3.4 OBJETIVOS

#### 3.4.1 Objetivo general

- Conocer si el OYMMV y el VEM *begomovirus 3* se transmiten por semilla.

### 3.4.2 Objetivo específico

- Determinar el porcentaje de transmisión por semilla del OYMMV y el VEM *begomovirus 3* en jamaica y malezas asociadas

## 3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.5.1 Prueba de transmisión en plántulas de jamaica

Se sembraron 100 semillas colectadas de plantas de cada uno de los tres materiales de jamaica (Criolla, UAN 1 y Coneja) colectados en campo que fueron positivos a VEM *begomovirus 3* y OYMMV en charolas de unicel que contenían suelo estéril; para evitar contaminación por algún virus presente en la cubierta de la semilla, ésta se lavó con hipoclorito de sodio al 10 % y se eliminó el exceso con agua destilada (Kim *et al.*, 2015). Como testigo se sembraron 200 semillas que provenían de plantas de jamaica que fueron negativas a *begomovirus* de cada uno de los tres materiales de jamaica. Las charolas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a una temperatura de 27 ° C y un fotoperiodo de 16 h (Albrechtsen, 2006). Tres meses después de la siembra, se extrajeron ácidos nucleicos totales de diez plántulas de cada material de jamaica y se analizaron por PCR como se indicó en el capítulo II.

### 3.5.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

Se hizo extracción de ácidos nucleicos totales de diez muestras compuestas de diez semillas de plantas de los tres materiales de jamaica y de malezas que fueron positivas a OYMMV. En ambos casos, la semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio de la manera antes indicada.

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó con el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983), con las siguientes modificaciones: se maceró 0.1 g de tejido foliar (o un grupo de 10 semillas) con nitrógeno líquido, el macerado se transfirió a un tubo de 1.5 mL que contenía 750 µL de buffer de extracción EB1 (100 mM Tris pH 8, EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM mercaptoetanol), se agitó

30 s en vórtex , se agregaron 75  $\mu$ L de SDS 20 %, se mezcló por inversión cinco veces y se incubó a 65 °C por 20 min (cada 5 min el tubo se mezcló por inversión). Posteriormente, se agregaron 250  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M (frío) y se incubó en hielo por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 15,000 rpm, se transfirieron 900  $\mu$ L de la fase acuosa (parte superior) a un tubo de 1.5 mL que contenía 540  $\mu$ L de isopropanol frío y se mezcló por inversión cinco veces. Los tubos se mantuvieron a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron a 15,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar 10 min. La pastilla se disolvió suavemente en 700  $\mu$ L de buffer de extracción EB2 (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8) después de lo cual los tubos se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomaron 500  $\mu$ L de la parte superior y se colocaron en un tubo que contenía 75  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y 500  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión de 5 a 10 veces y se centrifugó a 15,000 rpm durante 4 min. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 75 % y se dejó secar 20 min a temperatura ambiente para finalmente disolverla en 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

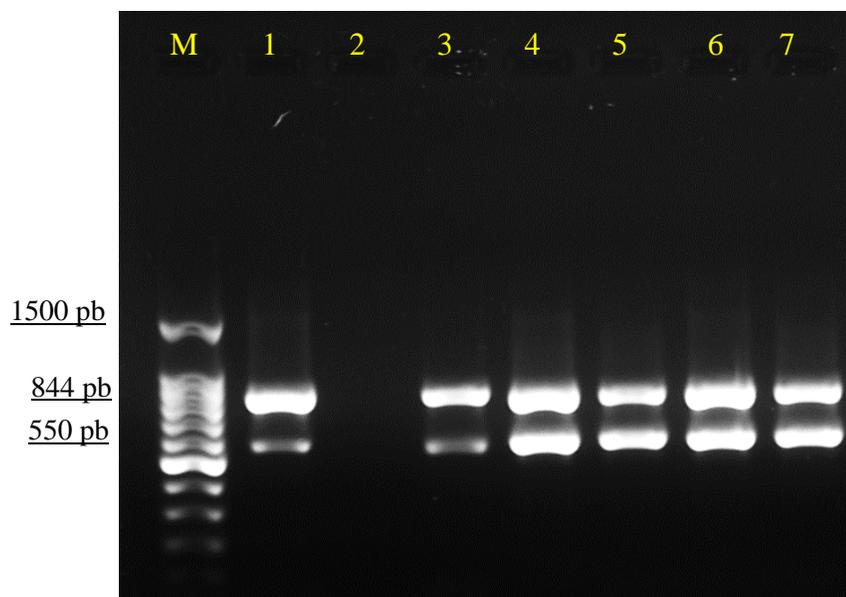
Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y fueron secuenciados (Macrogen Inc. Corea). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa DNA baser (<http://www.dnabaser.com/index.html>) y se compararon y registraron en la base de datos del GenBank®.

### 3.5.3 Amplificación por círculo rodante (ACR)

Los ácidos nucleicos totales de las plántulas y semilla de jamaica se sometieron a ACR con el kit TempliPhi 100 Amplification® (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante con el propósito de enriquecer el ADN circular que estuviera presente. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y los productos obtenidos se analizaron por PCR como se indicó en el Capítulo II.

### 3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por PCR para la detección del VEM *begomovirus 3* y del OYMMV en los diferentes cultivares de jamaica fue negativo en semillas y en plántulas, solo se obtuvo amplificación del gen 18Sr por lo que se descartan falsos negativos o la presencia de inhibidores de PCR. Tampoco se obtuvo amplificación para begomovirus por PCR a partir de ADN obtenido por ACR lo cual apoya los resultados previos de no transmisión de estos begomovirus por semilla de jamaica (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Kothandaraman *et al.*, 2015 ). Por otro lado, se observó que 16 plántulas de jamaica del cultivar Coneja procedentes de semilla colectadas de plantas madre positivas a VEM *begomovirus 3* mostraron mosaico a los 90 días de la emergencia, sin embargo, al analizarlas por PCR para begomovirus no se tuvo amplificación. Estos resultados difieren de los obtenidos para *Sweet potato leaf curl virus* y *Mung bean yellow mosaic virus* que fueron detectados en plántulas asintomáticas por PCR; sin embargo, en campo dichas plántulas pueden ser permisivas y ser fuente de inóculo para la infección de plántulas sanas (Kim *et al.*, 2015; Kothandaraman, *et al.*, 2016). En el caso de la semilla de las malezas se detectó al OYMMV (Figura 1) con una similitud que varió del 94 al 96 % (Cuadro 3). Estos resultados indican que el virus se encuentra dentro de la semilla y puede ser transmitido de una generación a otra a través del embrión (Kim *et al.*, 2015). Se sabe que muchos virus que se transmiten por semilla lo hacen sólo en ciertas especies vegetales y no en otras, tal es el caso del TYLCV que se transmite por semilla de *Solanum lycopersicum* (Kil *et al.*, 2016) pero no de *N. benthamiana* (Rosas-Díaz, *et al.*, 2017). Esto último pudiera explicar la detección de OYMMV en semilla de malezas pero no de jamaica.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR con los iniciadores universales para begomovirus Av494/Ac1048 (□550 pb) y específicos para el gen 18Sr (844 pb). Carril 1: Control positivo (planta positiva a OYMMV); Carril 2, Control negativo (agua); Carril 3: *Sida aggregata*; Carril 4: *Sida collina*; Carril 5: *Sida haenkeana*; Carril 6: *Sida acuta*; Carril 7: *Malachra fasciata*; Carril M; Marcador de peso molecular 100pb (Promega®).

**Cuadro 1.** Malezas en cuya semilla se detectó al *Okra yellow mosaic Mexico virus*.

Especie	Similitud (%)	Número de acceso Genbank®
<i>Sida aggregata</i> K.	94	MF632078
<i>Sida collina</i> S.	95	MF632079
<i>Sida haenkeana</i> (C.) Presl	96	MF632080
<i>Sida acuta</i> Burm. f.	95	MF632081
<i>Malachra fasciata</i> Jacq.	94	MF632082

Los virus transmitidos por semilla pueden pasar directamente de una generación a otra, por lo que esta estructura reproductiva actúa como una fuente de inóculo. Las malezas que son hospedantes alternos de virus tienen la capacidad de transmitirlos por semilla y constituyen una fuente importante de su dispersión al permitir su permanencia en una zona aún en ausencia de un vector (Rosas-Díaz, *et al.*, 2017). Es necesario estudiar la función que tiene la transmisión por semilla del OYMMV en las malezas analizadas en la presente investigación en la epidemiología del amarillamiento de la jamaica en el estado de Guerrero.

### **3.7 CONCLUSIONES**

No se tuvo transmisión por semilla de VEM *begomovirus* 3 y de OYMMV en semilla de jamaica, mientras que en semilla de cinco especies de malezas asociadas al cultivo se detectó al OYMMV.

### 3.8 LITERATURA CITADA

- Albrechtsen, S. E. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. London, UK. CAB International 268 p.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19–21.
- Inoue-Nagata, Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., and Nagata, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, 116; 209-211
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y.-J., Byun, H.-S., Park, J., Seo, H., Kim, C.-S., Shim, J.-K., Lee, J.-H., Kim, J.-K., Lee, K.-Y., Choi, H.-S. and Lee, S. 2016. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports*, 6:19013.
- Kim, J., Kil, E.-J., Kim, S., Seo, H., Byun, H.-S., Park, J., Chung, M.-N., Kwak, H.-R., Kim, M.-K., Kim, C.-S., Yang, J.-W., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., and Lee, S. 2015. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathology*, 64: 1284–1291.
- Kothandaraman, S. V., Devadason, A., and Ganesan, M. V. 2016. Seed-borne nature of a begomovirus, *Mung bean yellow mosaic virus* in black gram. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1925–1933.
- Rosas-Díaz, T., Zhang, D., and Lozano-Durán, R. 2017. No evidence of seed transmissibility of *Tomato yellow leaf curl virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 18: 437–440.

Sastry, K. S. 2013. Diseases, Seed-borne Plant Virus. Springer I. New Delhi, India. 327 p.

Velázquez-Fernández, P., Zamora-Macorra, E. J., Ochoa-Martínez, D. L., Negrete-Fernández, G., y Hernández-Moráles, J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34: 200–207.