

Veinte años de investigación con Geminivirus en vegetales en Guanajuato

Marco Antonio García Nería*, Diana Lilia Trejo Saavedra*, Rafael Francisco Rivera Bustamante*

RESUMEN

La virología es una ciencia muy importante, debido a que los virus perjudican los intereses del hombre, ya sea directamente afectando su salud o indirectamente infectando sus cultivos, su ganado o sus mascotas. Entre las familias de virus que infectan plantas destaca la familia *Geminiviridae*, convertida en un serio problema en el mundo. En México la presencia de estos virus fue reportada a finales de la década de los 70s. Debido a que causan grandes pérdidas agronómicas, el grupo de virología vegetal del Cinvestav Irapuato inició su estudio a finales de los 80s con la intención de poder proponer estrategias de solución. Nuestra intención en este ensayo es, además de hacer una recapitulación de las investigaciones realizadas en los últimos 20 años, mostrar como el avance de una ciencia (virología) se ve influenciada por los avances en otras ramas como la microbiología, física, bioquímica, biología molecular y más recientemente la bioinformática.

ABSTRACT

Virology is an important science because viral diseases affect direct or indirectly to human-kind. There are several families of plant viruses infecting important crops. Among those, the family *Geminiviridae* has become an important problem since cause serious damages around the world. In Mexico, the presence of geminiviruses was reported in the late 70's. Because their importance, the members of the Plant Virology Laboratory at Cinvestav Irapuato have been interested in generating useful information to propose strategies for geminivirus control. Here, we summarized 20 years of research in geminivirology in our laboratory. Another intention was to show how the advances in other research areas such as microbiology, physics, biochemistry, molecular biology and more recently bioinformatics could contribute to our knowledge and understanding of geminivirus.

Recibido: 18 de junio de 2010
Aceptado: 5 de septiembre de 2010

INTRODUCCIÓN

Existen reportes milenarios de varias culturas antiguas, como la china y la egipcia, en donde se infiere claramente la presencia de los virus en varias actividades humanas. Aunque generalmente considerados dañinos, en el caso de la agricultura y otras actividades relacionadas, las interacciones de virus fitopatógenos con diversas plantas se han reportado ocasionalmente algunos beneficios. Por ejemplo, en el siglo XVI los moteados de los tulipanes altamente cotizados en los mercados de los Países Bajos, eran probablemente debidos a la infección de un virus. Sin embargo, los virus han llamado la atención debido a su impacto negativo hacia los intereses del hombre: pérdidas totales de cosechas o reducción de la productividad de cultivos (Matthews, 2002). En este contexto, es fácil entender la importancia de la Virología.

Como sucede frecuentemente en varias actividades humanas, el desarrollo de la Virología como ciencia ha estado relacionado con el avance de otras ciencias. En general la acumulación de información y el avance de las técnicas utilizadas han permitido el desarrollo de trabajos cada vez más complejos, multidisciplinarios que permiten entender con mayor detalle el ciclo viral y la relación virus-planta. A su vez, la Virología ha sido fundamental para el desarrollo de disciplinas de gran relevancia científica e intelectual como la Biología Molecular y la Biotecnología.

Palabras clave:

geminivirus; Cinvestav; infecciones; interacción; resistencia.

Keywords:

geminivirus; Cinvestav; infections; host-interactions; virus-resistance.

* Laboratorio de Virología, Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav)-Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto. México. C.P. 36821 Tel: (462) 623 96 00, Fax: (462) 624 58 46. Correos electrónicos: margarcia@ira.cinvestav.mx, dtrejo@ira.cinvestav.mx, rivera@ira.cinvestav.mx.

La Virología como disciplina nació en 1898 con los estudios de Beijerinck sobre un virus de plantas: el virus del mosaico del tabaco (Beijerinck, 1898). Las investigaciones en esos tiempos incluían las pruebas de infectividad, lo que ayudó a establecer el carácter diferencial de los virus con respecto a las bacterias como agentes patógenos. Un poco más tarde, en el siglo XX se introduce la descripción de rango de hospedantes (aquellas plantas a las que un virus específico es capaz de infectar) y el establecimiento de la relación virus-vector (Matthews, 2002).

En el caso de los geminivirus, las primeras investigaciones fueron realizadas a principios de 1900, casi 70 años antes de que la taxonomía viral definiera la familia Geminiviridae. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que un poema escrito por la emperatriz japonesa Koken en el año 752 se puede considerar como la primera descripción de una enfermedad ocasionada por geminivirus (Saunders *et al.*, 2003). En este pequeño poema, la emperatriz describe los cambios inesperados de color (amarillamiento) de una planta de *Eupatorium lundleyanum* que observó en el verano de ese año. De manera menos poética, uno de los primeros casos científicamente documentados es el estudio de la enfermedad provocada por virus de rizado apical de la remolacha (BCTV, *Beet curly top virus*) en diferentes áreas del Mediterráneo y en el oeste de los Estados Unidos. Para 1910 ya se sabía que la distribución de esta enfermedad correlacionaba con la distribución de una chicharrita (*Circulifer tenellus*) que es uno de los insectos vectores de geminivirus (la chicharrita es el vector del género curtovirus), y para 1950 ya se habían diseñado estrategias de control de la enfer-

medad basadas en el manejo del insecto vector. Otro de los primeros casos investigados fue la enfermedad causada por el virus del estriado del maíz (MSV, *Maize streak virus*) que causa importantes daños al maíz en África (Goodman, 1981).

Sin embargo el agente etiológico que causaba tales enfermedades permaneció desconocido hasta 1974 (Bock *et al.*, 1974). Gracias a los avances en los métodos para la purificación e identificación de virus se describió la presencia de partículas icosaédricas asociadas con ambas enfermedades, lo que resultó fundamental para la definición de BCTV y MSV. En 1977 se determinó que el genoma de los virus BCTV y MSV estaba conformado de DNA de cadena sencilla (ssDNA) (Goodman, 1977). Esto fue algo inesperado puesto que los virus de plantas conocidos hasta entonces tenían un genoma de RNA. Los geminivirus fueron establecidos como familia en 1979 y su definición fue la de poseer un genoma de ssDNA, de conformación circular y encapsidado en partículas icosaédricas geminadas (Goodman, 1981). Este tipo de partículas vistas al microscopio electrónico fue lo que originó el nombre de geminivirus (figura 1). Por otro lado, para ese entonces ya se había determinado que un grupo de los geminivirus (pertenecientes al género *Begomoviridae*, o begomovirus) eran transmitidos por un insecto conocido genéricamente como mosquita blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) e infectaban plantas dicotiledóneas.

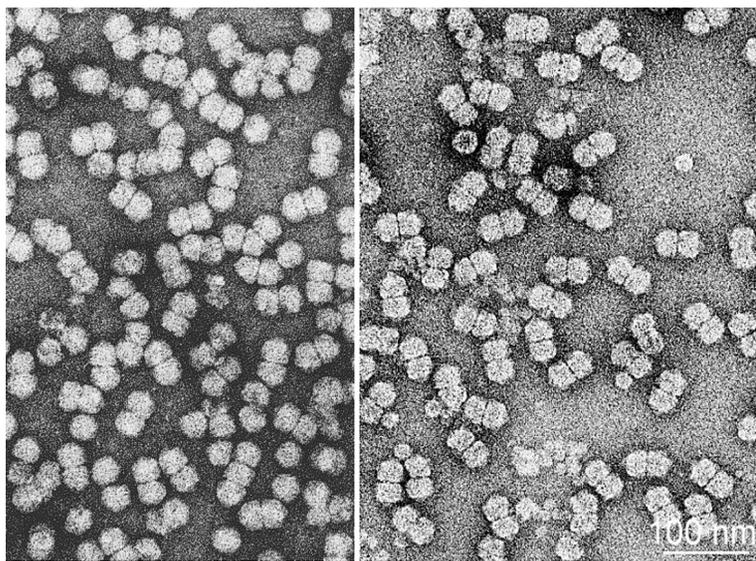


Figura 1. Micrografía electrónica de Geminivirus. Fuente R.G. Milne, Istituto di Virologia, CRN, Torino, Italy.

Identificación y caracterización de geminivirus presentes en México

En México, la primera mención de una enfermedad posiblemente causada por geminivirus se realizó durante el ciclo agrícola 1970-1971. En el estado de Sinaloa se describió una enfermedad en jitomate cuyo síntoma característico era el enchinamiento de las hojas. Posteriormente, se confirmó que el agente causal de esa enfermedad era un

geminivirus que se denominó, siguiendo la tradición de los virus de plantas, virus del chino del tomate (CdTV, *Chino del tomate virus*) (Brown y Hine, 1984; Brown y Nelson, 1988).

Paralelamente se empezó a trabajar con otras enfermedades asociadas a la presencia de mosquita blanca y que causaban los síntomas típicos de geminivirus: amarillamientos y deformaciones de las hojas. Entre las hortalizas afectadas destacaba el cultivo del tomate (*Capsicum annuum L.*). Los métodos tradicionales para identificar virus en plantas incluían, y siguen incluyendo en muchos casos, el aislamiento (separándolo de otros patógenos), la propagación en plantas susceptibles, la purificación y la identificación por métodos serológicos (anticuerpos), de microscopía electrónica, etc.

En uno de los primeros trabajos desarrollados por el grupo de Virología Vegetal del Cinvestav se sugirió que algunas enfermedades como el “enchinamiento” del tomate en Sinaloa y “planta atigrada” o “rizado amarillo del chile” en Tamaulipas eran causadas por geminivirus (Garzón Tiznado *et al.*, 1989). Interesantemente, pronto se pudo comprobar que los genomas de los geminivirus se comportaban de manera similar a plásmidos bacterianos (Koonin y Ilyina, 1992). Utilizando técnicas básicas de biología molecular, se consiguió detectar y clonar varios genomas geminivirales sin necesidad de utilizar los métodos tradicionales de virología vegetal ya mencionados. De esta manera, se identificaron varias secuencias virales provenientes de plantas enfermas. Dos de las secuencias correspondían a los componentes A y B de un geminivirus bipartita (figura 2). El geminivirus identificado fue denominado virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile (PHYVV, *Pepper huasteco yellow vein virus*), en alusión a la sintomatología producida en plantas de chile y a la región de “Las Huastecas” en donde fue detectado. Además, se confirmó que el “rizado amarillo del chile” era una enfermedad compleja en la que podían estar involucrados hasta 4 geminivirus diferentes. Entre éstos se podía encontrar al PHYVV ya mencionado y al Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV, *Pepper golden mosaic virus*), este último también caracterizado en el laboratorio (Garzón-Tiznado *et al.*, 1995; Torres Pacheco *et al.*, 1993; 1996).

Una vez identificados los agentes patogénicos, y con base en información sobre cultivos de chile a lo largo del país que presentaban síntomas similares, se realizaron estudios para la detección y la distribución de los mencionados geminivirus. Torres-Pacheco y

colaboradores (1996), reportaron que el virus de mayor distribución en las principales áreas productoras de hortalizas en México era el PHYVV, mientras que el PepGMV y el CdTV estaban distribuidos de una manera más restringida. Posteriormente, se realizaron otros estudios en otras áreas del país para confirmar la importancia de PHYVV y PepGMV en las diferentes regiones agrícolas. En la península de Yucatán se realizó un escrutinio para analizar la distribución de geminivirus, debido a que se reportaban pérdidas de hasta el 95% en cultivos de chile (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999; Díaz-Plaza *et al.*, 2002; Díaz-Plaza, 2003). Los resultados obtenidos en este escrutinio fueron positivos para PHYVV y PepGMV y además, se detectaron otros geminivirus previamente caracterizados en países vecinos: el virus del moteado del tomate (ToMoV, *Tomato mottle virus*), el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV, *Bean golden mosaic virus*) y el virus del amarillamiento y enrollamiento de la hoja del tomate (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*). Este último ya había sido reportado como causa de devastaciones en cultivos hortícolas en la zona del Mediterráneo (Israel y Europa) y más recientemente se había reportado en el Caribe, incluyendo República Dominicana y Cuba (Polston 1998; Ramos *et al.*, 1996).

Análisis de los aspectos básicos del ciclo viral

Después de que se confirmó la presencia de geminivirus en México y de que se caracterizaron los virus detectados, se iniciaron trabajos de investigación virológica básica usando los virus mencionados como modelos. Inicialmente, los estudios con características más moleculares tuvieron una orientación fitopatológica, posteriormente fueron más bioquímicos y biológicos. Esta diversidad de análisis favoreció que la información básica relacionada con el ciclo de infección viral, la replicación del virus y su expresión génica, así como la compleja variedad de mecanismos de regulación, se percibiera como una oportunidad importante para el diseño de estrategias de control de las enfermedades ocasionadas por los geminivirus, y no como una mera curiosidad intelectual.

Para una mejor comprensión de los trabajos relacionados con los aspectos básicos del ciclo viral que se describen a continuación, es necesario describir brevemente algunas de las características generales de los geminivirus.

Como se ha mencionado previamente, el genoma de los geminivirus consiste de una o dos moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA), covalentemente circularizada

y con un tamaño que oscila entre 2.5 kb y 3.0 kb. Los geminivirus se replican en el núcleo de las células vegetales infectadas mediante un intermediario de doble cadena (dsDNA) (círculo rodante) (Hanley-Bowdoin, *et al.*, 1999; Gutiérrez, 2000). El dsDNA viral se ensambla en el núcleo para formar un minicromosoma, a partir del cual se transcriben los genes virales. Esta característica los ha hecho muy atractivos como modelos de estudio de procesos moleculares básicos en plantas, de manera similar a como fueron utilizados los bacteriófagos en el nacimiento de la Biología Molecular (1950's - 1960's) o los importantes modelos de virus animales en los años 70s (ejemplo adenovirus, SV40). Los geminivirus codifican únicamente para 4 a 6 genes entre los cuales no figura ninguna DNA polimerasa; por esa razón dependen para su replicación de las enzimas del hospedante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutiérrez, 2002).

La transcripción de los genes geminivirales es bidireccional, se producen transcritos tanto hacia la orientación derecha (siguiendo las manecillas del reloj) como en el sentido izquierdo o complementario (contra las manecillas). La transcripción depende de RNA polimerasas y otros factores transcripcionales del hospedante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). En el componente A se encuentran codificadas las siguientes proteínas: Rep, indispensable para la replicación viral; REn, proteína que aumenta la replicación; TrAp, proteína que transactiva la expresión de los genes de CP y NSP; y CP, la proteína de la cápside. En el componente B se encuentran los genes de la proteína MP, necesaria para el movimiento célula-célula y la proteína NSP, responsable del transporte del genoma viral de núcleo a citoplasma (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999) (figura 2).

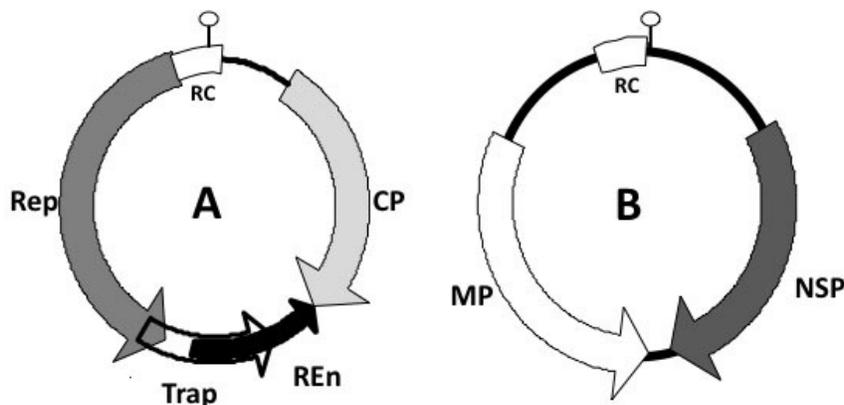


Figura 2. Representación esquemática del genoma de un geminivirus bipartita. Se muestran los marcos de lectura para cada componente. En el sentido de las manecillas del reloj (Expresión a la derecha): CP, proteína de la cápside y NSP, proteína de transporte nuclear. En sentido izquierdo o complementario: Rep, proteína de replicación; TrAp, proteína transactivadora; REn, potenciadora de la replicación y MP, proteína de movimiento.

Uno de los aspectos fundamentales en el ciclo viral es el proceso de replicación. Una de las primeras aportaciones del laboratorio ofreciendo información relevante a este proceso fue realizado por Argüello-Astorga y colaboradores (1994). En este trabajo se llevó a cabo una análisis,

tanto teórico filogenético, como estructural de las regiones intergénicas de los geminivirus reportados hasta ese momento. Se encontró que existían de pequeñas regiones conservadas indispensables para la replicación y cuya secuencia y orientación es muy importante para que sean reconocidos por la proteína Rep para dar inicio a la replicación viral. Este reporte fue considerado como una contribución importante en la caracterización de nuevos geminivirus y su clasificación, así como en el entendimiento del proceso de inicio de la replicación en geminivirus.

Otro de los aspectos importantes en el ciclo infectivo es la expresión de los genes virales. De manera general, el estudio espacial y temporal de la transcripción de genes se ha visto beneficiado con el descubrimiento y desarrollo de genes reporteros como GUS y la proteína verde fluorescente (GFP) (Jefferson, 1989; Epel *et al.*, 1996). Por otro lado, con el surgimiento de las primeras aplicaciones comerciales con plantas transgénicas, se disparó a nivel internacional la búsqueda y caracterización de nuevos elementos genéticos como promotores, potenciadores o terminadores de la expresión génica, etc. Esta búsqueda tenía bases, tanto en la preocupación de aspectos de propiedad intelectual, como en el diseño de plantas con expresión mas refinada a nivel temporal y de especificidad de tejidos. Así, los geminivirus en general emergieron como una interesante fuente de elementos genéticos con aplicaciones biotecnológicas. Los virus caracterizados a nivel local, no fueron la excepción. En trabajos realizados por el grupo de geminivirus mediante el uso de genes reporteros y otras técnicas, se observó que los genes virales y sus

productos, establecen interacciones entre sí; por ejemplo, el gen TrAP es capaz de inducir la transcripción del gen CP (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Además, se determinó que la transcripción de los genes virales en este caso del PHYVV, ocurre de forma ordenada y temporal. Así, el gen CP no puede expresarse sin que antes se haya expresado el gen TrAp. Igualmente, los genes involucrados en la replicación del virus (Rep, TrAP y REn) son expresados de manera temprana, mientras que los genes involucrados en la encapsidación y el movimiento del virus se expresan un poco más tarde (Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante, 2007). Estos resultados son importantes porque permiten proponer modelos de regulación de la expresión de los genes virales que pueden ayudar a entender las interacciones que los geminivirus establecen con el hospedero para poder llevar a cabo su ciclo infectivo. Adicionalmente, desde el punto de vista biotecnológico, ofrecía la alternativa de promotores virales inducibles por la presencia del mismo virus, característica muy deseada para ciertos desarrollos biotecnológicos.

Análisis de la interacción virus-planta

Para estudiar la interacción virus-planta, se desarrolló y estandarizó la metodología de biobalística que permite realizar la infección uniforme de un gran número de plantas en condiciones controladas (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Esta herramienta, la biobalística o “pistola de genes”, su desarrollo inicial y su mejoramiento a lo largo de las dos últimas décadas fue fundamental para el desarrollo del trabajo del laboratorio, ya que todos los experimentos con inoculaciones de geminivirus fueron realizados con esta metodología.

Los virus alteran la fisiología normal del hospedero cambiando la expresión de algunos genes de manera temporal y/o espacial (Cooper, 2001). Estos cambios ocurren por la activación de mecanismos de defensa en contra del patógeno invasor (Whitham *et al.*, 2003). Para la identificación de genes relacionados a una infección viral se han utilizado diversas estrategias; una de ellas, establecida por primera vez para geminivirus, es el uso de “trampas génicas”. Esta metodología permite identificar los genes que modifican su patrón de expresión bajo diferentes condiciones de desarrollo o de estrés y utiliza genes reporteros y el sistema de transposones Ac/Ds provenientes de maíz (Sundaresan *et al.*, 1995). Utilizando una colección de líneas de *Arabidopsis thaliana* que contenían trampas génicas, se lograron identificar 8 genes cuya expresión

fue alterada por la infección con el geminivirus del enrollamiento de la hoja de la col (CaLCuV, *Cabbage leaf curl virus*). Uno de estos genes conocido como “*Crumpled leaf (CRL)*” resultó muy interesante, puesto que las plantas transgénicas que no expresan el gen CRL no presentan síntomas al ser infectadas con CaLCuV. Definir el papel que juega la proteína CRL en las infecciones virales podría contribuir con estrategias novedosas para controlar estas enfermedades (Trejo-Saavedra *et al.*, 2009).

Uno de los mecanismos de defensa contra virus más conservados evolutivamente es el silenciamiento génico mediado por RNA, curiosamente descubierto en un estudio de interacción virus-planta (Lindbo y Dougherty, 2005). El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) se activa cuando la célula detecta intermediarios de RNA de doble cadena (dsRNA). Este proceso se caracteriza por la generación de RNAs pequeños, llamados siRNAs, provenientes de la degradación de RNAs mensajeros. En el caso de los geminivirus, éstos no emplean intermediarios de dsRNA durante su replicación por lo que no está muy claro la forma de como inducen el sistema de silenciamiento (Chellappan *et al.*, 2004).

Existe un fenómeno conocido como “Recuperación” o “Remisión de síntomas” que se ha descrito para infecciones virales (Covey *et al.*, 1997; Chellappan *et al.*, 2004). Este fenómeno se caracteriza por la desaparición de los síntomas conforme se desarrolla una planta infectada con la concurrente disminución en la concentración del virus en los tejidos nuevos de la planta infectada. En nuestro grupo, se han realizado varios trabajos (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007 y Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009), en los que se observó que el sistema PTGS está activo en el proceso de recuperación de síntomas. También se detectó que había producción de siRNAs no aleatorios provenientes de los transcritos del geminivirus PepGMV en las plantas infectadas y que el proceso de recuperación estaba relacionado con altos niveles de metilación del DNA viral. Además, la cantidad de DNA viral en el tejido recuperado (R) de plantas de Chile infectadas con PepGMV, era significativamente menor al encontrado en tejido sintomático (S) (figura 3). Esto significa que la planta trata, por todos los medios a su alcance, de controlar la replicación y expresión del genoma viral para impedir su propagación. Desafortunadamente para ella, los virus también han encontrado formas de darle vuelta a la mayoría de las líneas de defensa del hospedante. La batalla continúa ...

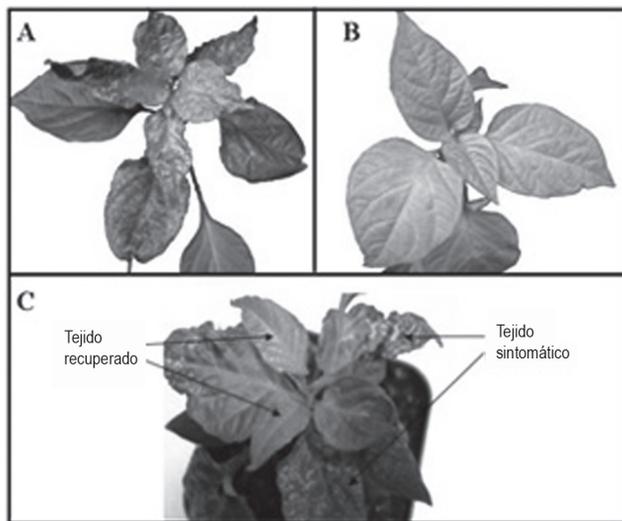


Figura 3. Sintomatología típica de las infecciones geminivirales en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) variedad Sonora Anaheim. **A.** planta de chile infectada con el geminivirus PepGMV. **B.** planta de chile sana. **C.** Planta de chile mostrando la recuperación de síntomas. Fuente Rentería-Canett, 2004.

Más recientemente se han desarrollado metodologías de secuenciación masiva que permiten la obtención de gran cantidad de datos. Para poder aprovechar al máximo esta tecnología de secuenciación ha sido necesario desarrollar herramientas bioinformáticas y bases de datos que permiten organizar y analizar toda la información generada (Ronaghi, 2001; Peterson *et al.*, 2009). Por medio de la metodología de pirosecuenciación 454 se realizó un análisis de la expresión diferencial de genes para estudiar en detalle el sistema de remisión de síntomas (Góngora-Castillo *et al.*, en proceso de publicación). De esta manera, se lograron identificar varios genes que se expresan de manera diferente en los tejidos con síntomas (S) y en proceso de remisión o recuperación (R). Dentro de esta lista hay algunos genes relacionados a patogénesis y otros novedosos que no han sido reportados en ningún otro trabajo. En la actualidad se está realizando la caracterización de los genes identificados. Adicionalmente, en un trabajo de colaboración con la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Guanajuato, ya se ha generado una base de datos amigable en la que se han almacenado todas las secuencias obtenidas en este trabajo y que en breve estará en línea para su consulta.

Por otro lado, otra línea de investigación de nuestro grupo es la caracterización de plantas con resistencia natural a geminivirus. Recientemente se caracterizó una colecta de chile habanero que fue reportada como resistente a la infección mixta de PepGMV y PHYVV (en proceso de publicación). Realizando un análisis de segregación de genes, se observó que la resistencia dependía de dos genes y que estaba asociada a una menor replicación del virus en las células infectadas, así como a un deficiente movimiento del virus PepGMV. También se observó que en las plantas resistentes infectadas con PepGMV se presenta una respuesta más intensa y más rápida que se caracteriza por un aumento de la concentración de ácido salicílico y de especies reactivas de oxígeno. Estas características son comúnmente asociadas a la respuesta sistémica adquirida (SAR), uno de los mecanismos de defensa más conservados. Se propone que la resistencia a geminivirus observada en estas plantas depende de la inducción de SAR por un mecanismo no determinado aún (García-Neria *et al.*, en proceso de publicación).

Estudio de las interacciones entre diferentes geminivirus

Si bien en condiciones de laboratorio generalmente se estudia de manera controlada la interacción de una sola especie de virus con una sola especie de planta, en su estado natural las plantas pueden ser infectadas al mismo tiempo por más de un virus (infecciones mixtas como el caso mencionado de la enfermedad "tizado amarillo") o por varios patógenos de manera simultánea. La mayoría de las estrategias para la detección de virus se habían enfocado en el aislamiento de virus individuales, debido a que en muchas regiones del mundo las enfermedades son causadas por un solo virus. En México las infecciones mixtas son muy comunes, por lo que uno de los objetivos permanentes del laboratorio ha sido optimizar técnicas de detección de geminivirus en infecciones mixtas en México y tratar de entender los aspectos básicos de estas interacciones.

Un aspecto importante de las infecciones mixtas es que frecuentemente se modifica la sintomatología. En un estudio realizado por Méndez-Lozano (2003) se observó que una de las infecciones mixtas más comúnmente encontradas en nuestros campos agrícolas nacionales es la combinación de PHYVV y PepGMV. Esta infección mixta es importante, puesto que los síntomas que se producen son más severos, fenómeno que se conoce como sinergismo. Debido a su importancia se han

realizado estudios más detallados para entender los aspectos básicos de este sinergismo entre PHYVV y PepGMV (Méndez-Lozano *et al.*, 2003). Rentería-Cannett, (2004) por su parte, obtuvo mutantes de PHYVV para analizar con mas detalles cuáles genes virales están involucrados o son responsables del sinergismo. Concluyó que las proteínas Rep, TrAp y CP son necesarias para que se lleve a cabo el sinergismo a nivel de síntomas.

Uso de geminivirus como herramienta para silenciamiento de genes

Una de los mayores retos en la genética es el estudio de la función de los genes. En los últimos años, este estudio se ha abordado usando plantas transgénicas para sobre-expresar o apagar el gen en estudio. Sin embargo, en aquellas especies en las cuales no se cuenta con un sistema de transformación genética (siendo el chile uno de ellos), dichas herramientas no estaban disponibles, complicando así el estudio. Recientemente se ha desarrollado una estrategia que aprovecha la capacidad de los virus de inducir el silenciamiento de genes mediado por RNA; a esta estrategia se le conoce como silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS, del inglés Virus-induced gene silencing). VIGS ha sido una herramienta muy importante para estudiar la función de un gen, ya que se puede abatir la expresión de un gen específico y observar el fenotipo resultante. Los vectores basados en geminivirus representan una ventaja con respecto a los vectores basados en virus de RNA, debido a que tienen un genoma pequeño de DNA, son de fácil modificación con herramientas de biología molecular y pueden ser fácilmente inoculados. Los geminivectores son especialmente importantes para el análisis de genes en cultivos que son recalcitrantes para la obtención de mutantes por métodos convencionales como los cultivos de chile y yuca (Carrillo-Tripp *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas hasta el momento en el Laboratorio de Virología Vegetal del Cinvestav Irapuato han estado encaminadas a entender diferentes aspectos del ciclo viral, las interacciones de los virus con su hospedero y las interacciones entre virus en infecciones mixtas. Aunque la línea de investigación a lo largo de los años ha sido consistente, los diferentes puntos de vista o enfoques metodológicos han sido gratamente influenciados por los estudiantes participantes y sus antecedentes e intereses de investigación.

Ha sido realmente placentero y educativo tener un lugar donde ingenieros agrónomos convivan y discutan experiencias con bioquímicos, biólogos, químicos, biotecnólogos y más recientemente con matemáticos.

Entre los avances importantes generados en el Laboratorio de Virología Vegetal, desde el punto de vista de desarrollos biotecnológicos, podemos destacar: la generación de plantas transgénicas de tabaco y jitomate con resistencia a geminivirus (figura 4), el análisis y caracterización de los promotores virales con fines biotecnológicos, el desarrollo de geminivectores VIGS para estudiar la función de genes en varias especies de solanáceas incluyendo el chile, la estandarización de metodologías para la detección e identificación de genomas virales, así como el establecimiento de métodos eficientes de infección en condiciones controladas.



Figura 4. Comparación de plantas resistentes a geminivirus contra plantas no resistentes. A la izquierda se muestra una planta de tabaco con los síntomas típicos de la infección del virus PHYVV, y a la derecha se muestra una planta resistente de tabaco que no muestra síntomas al ser infectada con el virus PHYVV (Díaz-Plaza, 2003).

A pesar de que a habido un gran avance en el conocimiento en torno a estos patógenos, es necesario seguir investigando más a detalle la interacción planta-virus y la biología del propio virus para poder entender los mecanismos que utiliza para infectar a las plantas. Nuestra intención es comprender cómo las plantas responden a las infecciones geminivirales, y de esta manera, continuar aportando conocimientos que puedan ser importantes en el diseño de estrategias para poder controlar las enfermedades producidas por estos interesantes patógenos.

REFERENCIAS

- Ascencio-Ibañez, J. T., Díaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Arguello-Astorga, G. R., Rivera-Bustamante, R. F. (1999). First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease*. 83:1178.
- Beijerinck, M.J. (1898). Concerning a *contagium vivum fluidum* as cause of the spot disease of tobacco leaves. Translation published in English as *Phytopathological Classics Number 7* (1942). American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota.
- Bock, K. R., Guthrie, E. J. & Woods, R. D. (1974). Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugarcane and *Panicum maximum*. *Annals of Applied Biology* 77, 289-296.
- Brown, J. K., and Hine, R. B. (1984). Geminate particles associated with the leaf curl or "chino" disease of tomatoes in coastal areas of western México. *Phytopathology*. 74:844.
- Brown, K. J. and Nelson, M. R. (1988). Transmission, host range and virus-vector relationships of chino del tomate virus, a whitefly-transmitted geminivirus from sinaloa, México. *Plant disease*. Vol 72. No. 10.
- Carrillo-Tripp, J., Shimada-Beltrán, H., Rivera-Bustamante, R. F. (2006). Use of geminiviral vectors for functional genomics. *Current Opinión in Plant Biology*. 9:2009-2015.
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., Rivera-Bustamante, R. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*. 97:51-59.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C. (2004). Short interfering rna correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology*. 78: 7465-7477.
- Cooper, B. (2001). Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *The Plant Journal*, 26: 339-349.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., Turner, D.S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature*. 385: 781-782.
- Díaz-Plaza, R. Avilés-Baeza, W.I., Peña-Ramírez, R., Rivera-Bustamante, R.F. (2002). Geminiviruses detected in habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) un Yucatán Peninsula. *Proceedings of the 16th International Pepper Conference*. Tampico, Tamaulipas, México. November 10-12.
- Díaz-Plaza, R. (2003). *Distribución de geminivirus en la península de Yucatán y estrategias moleculares para su control*. Tesis Doctoral. Cinvestav Irapuato, México. 145p.
- Epel, B.L., Padgett, H.S. Heinlein, M., Beachy, R.N. (1996). Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene*. 173:75-79.
- Garzón-Tiznado, J.A., Rivera-Bustamante, R., Herrera-Estrella, L., Delgadillo-Sánchez, F., Pozo-Campodónico, O. (1989). Estudio preliminar sobre el "Rizado Amarillo" del chile (*Capsicum annum* L.) en el sur de Tamaulipas: un geminivirus. *XII Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Fitopatología*. Montecillo, Edo. de Mex. Resúmenes pp: 16
- Garzon-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibañez, J., Herrera-Estrella, L. and Rivera-Bustamante, R.F. (1993). Inoculation of pepper with infections clones by a biolistic procedure. *Phytopathology*. 83: 514-521.
- Garzón-Tiznado, J.A. (1995). *Geminivirus involucrados en la enfermedad "rizado amarillo" del cultivo de chile en el sur de Tamaulipas*. Caracterización molecular y distribución en México. Tesis Doctoral. Cinvestav-Irapuato.
- Goodman, R.M. (1981). Geminiviruses. *Journal of General Virology*. 54:9-21.
- Goodman R.M. (1977). Single stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology*, 83:171
- Golem, S. Culver, J.N. (2003). Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 681-688.
- Gutiérrez, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO Journal*. 19: 792-799.
- Hanley, L. B., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant dna replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Science*, 1:71-106.
- Harrison, B.D. Barker, H., Buck, W.K., Guthrie, J.E., Meredith, G, and Atkinson, M. (1977). Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature*. 334:179.
- Jefferson, R.A. (1989). The GUS reporter system. *Nature*. 342: 837-838.
- Koonin EV, Ilyina TV. (1992). Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology*, 73: 2763-2766.
- Lindbo, J.A, and Dougherty, W.G. (2005). Plant pathology and RNAi: A brief history. *Annual review phytopathology*. 43:191-204.
- Matthews, R.E.F. (2002). *Plant Virology*. Academic Press. Fourth Edition.
- Nelson, M.R. (1986). Diseases of vegetables in Arizona. *Primer taller sobre enfermedades de hortalizas México-Estados Unidos*. SARH, CAADES, The University of California.
- Petterson, E., Lundeberg, J. and Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 93:105-111.
- Polston, J.E. (1998). The appearance of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the movement of this and other tomato geminivirus. Abstract. *International Workshop on Bemisia an Geminivirus*. Sn. Juan, Puerto Rico. L40
- Ramos, P.L., Guerra, O., Dorestes, V., Ramírez, N., Rivera-Bustamante, R.F., Oramas, P. 1996. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant disease*. 80:1208

- Rentería-Cannet, I. (2004). *Mecanismo de la interacción sinérgica en la mezcla del Virus huasteco del chile y el Virus del mosaico dorado del chile a nivel de replicación*. Tesis de maestría.
- Rodríguez-Negrete, E.A., Carrillo-Tripp, J. and Rivera-Bustamante, R.F. (2009). RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology*. 83:1332-1340.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. 11:3-11.
- Saunders, K., Lucy, A., and Stanley, J. (2003). The earliest recorded plant virus disease. *Nature* 422, 831
- Shimada-Beltran, H. and Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expresión in *Pepper huasteco yellow vein virus*. *Journal of General Virology*. 88:3145-3153
- Sundaresan, V. Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*. 9: 1797.
- Torres-Pachecho, I., Garzón-Tiznado, J.A., Brown, J.K., Becerra, F.A., and Rivera-Bustamante, R.F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in México and the Southern Unites States. *Phytopathology*. 86(11):1186-1192.
- Trejo-Saavedra, D.L. and Rivera-Bustamante, R.F. (2009). The movement of *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) is affected by CRUMPLED LEAF (CRL) gene in *Arabidopsis thaliana*. *Virology Journal*. 6:169.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., Hou, Y. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Journal*, 33: 271-283.