

# Técnicas serológicas y moleculares utilizadas para la identificación y caracterización de *Beet curly top virus*

Serological and molecular techniques used for the identification and characterization of *Beet curly top virus*

LORETO ROBLES-HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, LUIS CARLOS CHAVIRA-SÁENZ<sup>1</sup>, MARÍA TERESA SÁENZ-GUTIÉRREZ<sup>1</sup>  
Y ANA CECILIA GONZÁLEZ-FRANCO<sup>1,2</sup>

Recibido: Diciembre 20, 2012

Aceptado: Agosto 9, 2013

## Resumen

El *Beet curly top virus* pertenece al género *curtovirus*, dentro de la familia *Geminiviridae*; su genoma está constituido por una cadena sencilla de ADN cubierto por una cápside icosaédrica geminada. La organización de su genoma revela que el ADN de los *curtovirus* produce seis o siete proteínas. El producto del ORF V1 es la proteína de la cápside del virión, el del ORF V2 está involucrado en la regulación de los niveles de ADN genómico y el del ORF V3 facilita el movimiento de célula a célula. Las cuatro proteínas codificadas por los ORFs de sentido complementario están involucradas en la replicación del virus. ORF C1 codifica la proteína Rep, C3 una proteína análoga para la replicación de la proteína de los *begomovirus*, y la C4 es una proteína que puede iniciar la división celular; la función de la C2 es desconocida. Las especies de BCTV causan enfermedades en cultivos hortícolas como chile, frijol y tomate, los cuales son económica y socialmente importantes en el estado de Chihuahua; sin embargo, hay muy poca información de este virus en el estado, es por eso que en esta revisión enfatizamos en las técnicas serológicas y moleculares para la identificación del virus, así como en los métodos de clonación, secuenciación y análisis filogenético para su caracterización, con el fin de poner a disposición esta información para técnicos e investigadores interesados en estudios específicos del BCTV, así como en el manejo de las enfermedades causadas por las cepas de este virus.

**Palabras clave:** Curtovirus, Geminivirus, tipificación de BCTV, métodos de secuenciación, clonación, análisis filogenético.

## Abstract

*Beet curly top virus* belongs to the genus *Curtovirus*, within the family *Geminiviridae*; its genome is composed of a single stranded DNA covered with an icosahedral geminate capsid. The organization of its genome reveals that *Curtovirus* DNA produces six or seven proteins. The product of ORF V1 is the virion coat protein, that of ORF V2 is involved in regulation of the genomic DNA levels, and that of ORF V3 facilitates the cell-to-cell movement of the virus. The four proteins encoded by the complementary-sense ORFs are involved in virus replication. ORF C1 encodes the Rep protein, C3 a protein analogous to the replication enhancer protein of *begomoviruses*, and C4 a protein that can initiate cell division; the function of C2 is unknown. The species of BCTV cause diseases in horticultural crops such as beans, pepper, and tomato that are economically and socially important in Chihuahua State. However, there is limited information about this virus in the State. Thus, in this review, we emphasize the serological and molecular methods for identification of this virus, as well as the clonation, sequencing, and phylogenetic analysis for its characterization with the objective of providing this information to technicians and researchers interested in specific studies of BCTV, as well as in the management of the diseases caused by strains of this virus.

**Keywords:** Curtovirus, Geminivirus, typing of BCTV, sequencing methods, clonation, phylogenetic analysis.

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Ciudad Universitaria S/N Campus 1, Chihuahua, Chih., México. 31310.

<sup>2</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: conzalez@uach.mx.

## Introducción

**E**l *Beet curly top virus* (BCTV) causa enfermedades en cerca de 300 especies de plantas, entre las que se incluyen hortalizas, plantas ornamentales y malezas; las hortalizas más susceptibles son chile verde, tomate, espinacas, betabel y frijol (Bajili *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011).

Existen pocos trabajos sobre el BCTV en México. Velásquez y Medina (2008) reportaron la especie *Beet mild curly top virus* (BMCTV) en el cultivo de chile en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. En Chihuahua se reportó la especie *Beet severe curly top virus* en cultivos de chile, con una incidencia de 11.7% registrado para la región centro sur del estado (Robles-Hernandez *et al.*, 2011). Sin embargo, se desconoce si estas cepas son nativas o introducidas de otros países. Es por eso que en este trabajo se presentan detalladamente las técnicas serológicas y moleculares que se emplean para la identificación de especies de BCTV, así como los métodos más recientes de secuenciación y análisis filogenético de estas cepas de virus, con el fin de contar con una panorámica general de las herramientas con potencial para iniciar trabajos de investigación que permitan construir una caracterización completa de las cepas de virus reportadas en el estado de Chihuahua, y llevar a cabo un mejor manejo de las enfermedades que causan estos virus en los cultivos de chile, frijol y tomate.

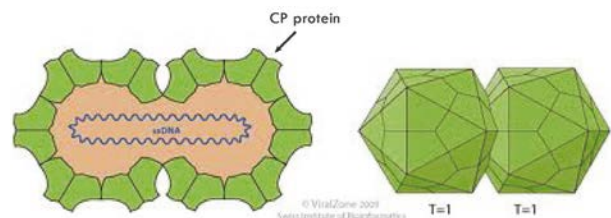
## Taxonomía

Todas las especies de virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae* tienen como característica un genoma de ADN de una sola cadena, empaquetado en una cápside icosaédrica geminada. Los geminivirus se clasifican en cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* y *Begomovirus*; la diferencia y división entre estos géneros está sustentada en la organización de su genoma, las propiedades biológicas, el rango de hospederos y en el tipo de insecto vector que los disemina (Fauquet *et al.*, 2008). Dentro del género *Curtovirus* se tienen identificadas las

especies *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Spinach curly top virus* (SCTV), *Horseradish curly top virus* (HrCTV), *Beet curly top iran virus* (BCTIV) y *Pepper yellow dwarf virus* (PepYDV), los cuales no han sido plenamente caracterizados (Fauquet *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

El BCTV se caracteriza por tener un genoma monopartita de ADN en cadena sencilla, con un tamaño aproximado de 3.0 kb, cubierto por una cápside formada por dos icosaedros geminados casi isométricos (Figura 1); la cápside está constituida por un mismo tipo de proteína de 30 kilodaltons (Creamer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Durrin *et al.*, 2010).

**Figura 1.** Esquematación de la cápside icosaédrica y geminada del BCTV. El color verde representa una sola clase de proteína (Fuente: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/109.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/109.html)).



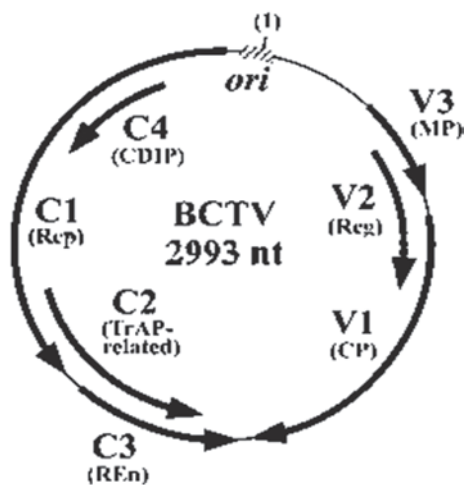
## Descripción del genoma

En el 2002, Hull reportó una clona infecciosa de BCTV con 2993 nucleótidos de longitud. La organización de su genoma revela que el ADN de los curtovirus produce seis o siete proteínas (Figura 2), las cuales están involucradas en todas las actividades de replicación, movimiento y supervivencia del virus. El producto del ORF V1 es la proteína de la cápside del virión, el del ORF V2 está involucrado en la regulación de

los niveles de ADN genómico de cadena sencilla (ss) o de cadena doble (ds), y el del ORF V3 facilita el movimiento de célula a célula del virus. Las cuatro proteínas codificadas por los ORFs de sentido complementario están involucradas en la replicación del virus. El ORF C1 codifica la proteína Rep, C3, una proteína análoga para la replicación de la proteína de los begomovirus, y la C4 es una proteína que puede iniciar la división celular; la función de la C2 es desconocida (Hull, 2002).

En estudios más recientes, se reporta que la V1 está implicada en la codificación de las proteínas de la cápside, la proteína V2, participa en la regulación del ADN (Baliji *et al.*, 2007). Por otro lado, se menciona la participación específica de la proteína C4 en el movimiento del virus, ya que se ha mostrado que en mutaciones de aislados de virus con cambios a nivel de nucleóticos en C4 e inoculados en plantas indicadoras no desplazaban hacia las hojas nuevas de la planta; este hallazgo evidenció la relación de la proteína C4 con el movimiento del virus y posiblemente con su patogenicidad (Teng *et al.*, 2010).

**Figura 2.** Organización del genoma de BCTV. El círculo representa el ADNss, la línea continua la región común. Las flechas dentro del círculo son los ORFs y sus productos, los cuales están involucrados en todas las actividades de replicación, movimiento y permanencia viral (Fuente: [http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007\\_3-540-29719-7\\_56-1](http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_3-540-29719-7_56-1)).

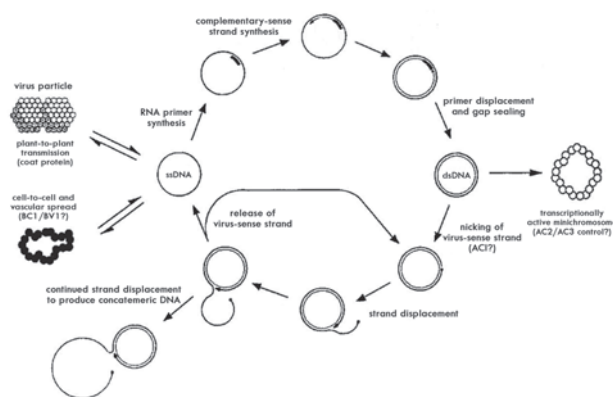


## Formas de replicación

La replicación de los geminivirus depende de las funciones de la célula del hospedero. Los geminivirus se replican en células diferenciadas que están en su fase G, es decir, cuando éstas han terminado la mayoría de sus actividades de replicación de ADN. Los geminivirus reactivan las actividades de replicación que ellos requieren y regresan a la célula a su fase S (Hull, 2002). Se cree que la síntesis de la hebra (-) del ADN viral se inicia a partir de un oligonucleótido complementario de la región intergenómica 3'. Este oligonucleótido puede ser extendido por la ADN-polimerasa *in vitro* y podría ser el iniciador *in vivo* de la cadena (-) en los masterovirus; sin embargo, poco se conoce en relación a las proteínas y los mecanismos involucrados en la síntesis de la cadena (-) en los geminivirus, y se piensa que la síntesis de esta cadena es afectada por los factores del hospedero. Por otro lado, la síntesis de la hebra (+) de los geminivirus se da en un sitio específico del anillo de la horquilla (TAATAATT↓AC) del ADN *in vivo*. La síntesis de la hebra (+) está regulada por la proteína Rep, la cual actúa como endonucleasa y ligasa para cortar y pegar la hebra (+) del ADN viral en la misma posición en la cadena *in vitro*. Se piensa que el origen de la cadena (+) se encuentra en el lado izquierdo de ésta, la cual tiene una región constante (como en el caso del TGMV) y se traslapa con el promotor AC61. Se han identificado seis elementos *cis* en esta región: 1) el elemento horquilla es común en los genomas de los geminivirus. Este elemento tiene una región rica en GC en el tallo y otra región rica en AT en el anillo. La secuencia conservada 5' TAATAATT↓AC del anillo es común en todos los geminivirus y se encuentra en el origen de la hebra (+) de otros ácidos nucleicos que se replican a través del círculo rodante (Zúñiga-Vega, 2002). 2) El sitio de unión de la proteína Rep presenta varias características: (i) es específico para el virus pero tiene algunas secuencias constantes, (ii) el GGAT es un requerimiento absoluto, (iii) el espacio entre

GGAT es importante. 3) El origen de la hebra (+) de los curtovirus comparte sitios de unión para dos factores de transcripción, la caja TATA y la caja G. Ni los factores de transcripción del hospedero ni los sitios de unión son requeridos para la replicación del virus. 4) Los otros dos elementos son la región AG y la región CA. La primera región es esencial para la replicación del virus, pero no se ha detectado ningún papel en la transcripción del AG61. Remoción de la región CA redujo la replicación de TGMV hasta 20 veces y dicha mutación sugiere que actúa como un elemento eficiente. Aunque el mecanismo por el cual estos elementos operan no se ha determinado, se sugiere que podrían unirse a los factores de la planta que son requeridos para la replicación del virus. La proteína Rep es esencial para la replicación de los geminivirus. Esta proteína es multifuncional y tiene varias características: se encuentra en el núcleo, tiene sitios de reconocimiento específicos, tiene actividad de endonucleasa, ligasa, ATPasa y de GTPasa. La proteína Rep también funciona como promotor del gen de ARNm para la síntesis de la proteína de la cápside (Hull, 2002) (Figura 3).

**Figura 3.** Diagrama representativo de la replicación de un geminivirus (Hull, 2002).



## Formas de transmisión

El BCTV se transmite solamente a través del insecto *Circulifer tenellus*, comúnmente conocido como chicharrita (Figura 4), que

pertenece al orden hemíptera y es de la familia *Cicadellidae*; es un insecto en forma de cuña que mide aproximadamente 3 mm, el cual se torna de color verde pálido a gris; su aparato bucal es de tipo chupador, es de movimientos rápidos y es difícil detectar en forma individual, solamente puede ser visto en conjunto en las hojas de las plantas (Nischwitz y Olsen, 2011).

**Figura 4.** Insecto *Circulifer tenellus* (salta-hojas) transmisor específico del BCTV (Fuente: <http://cals.arizona.edu/yavapai/graphics/beetleafhoper.jpg>).



Debido al amplio rango de plantas hospederas, el BCTV puede alojarse en malezas y posteriormente ser transportado por su vector a los cultivos hortícolas hospederos. El vector es un insecto de migración anual, en temporada invernal los adultos se alojan en malezas perenes iniciando así su ciclo reproductivo. El virus se puede alojar en el insecto desde la etapa ninfal y permanecer en él hasta el término de su ciclo de vida. En primavera, los insectos emigran hacia zonas agrícolas transmitiendo el virus en el momento en que el insecto introduce el estilete para succionar la savia de la planta, diseminándolo de planta en planta (Chen *et al.*, 2010).

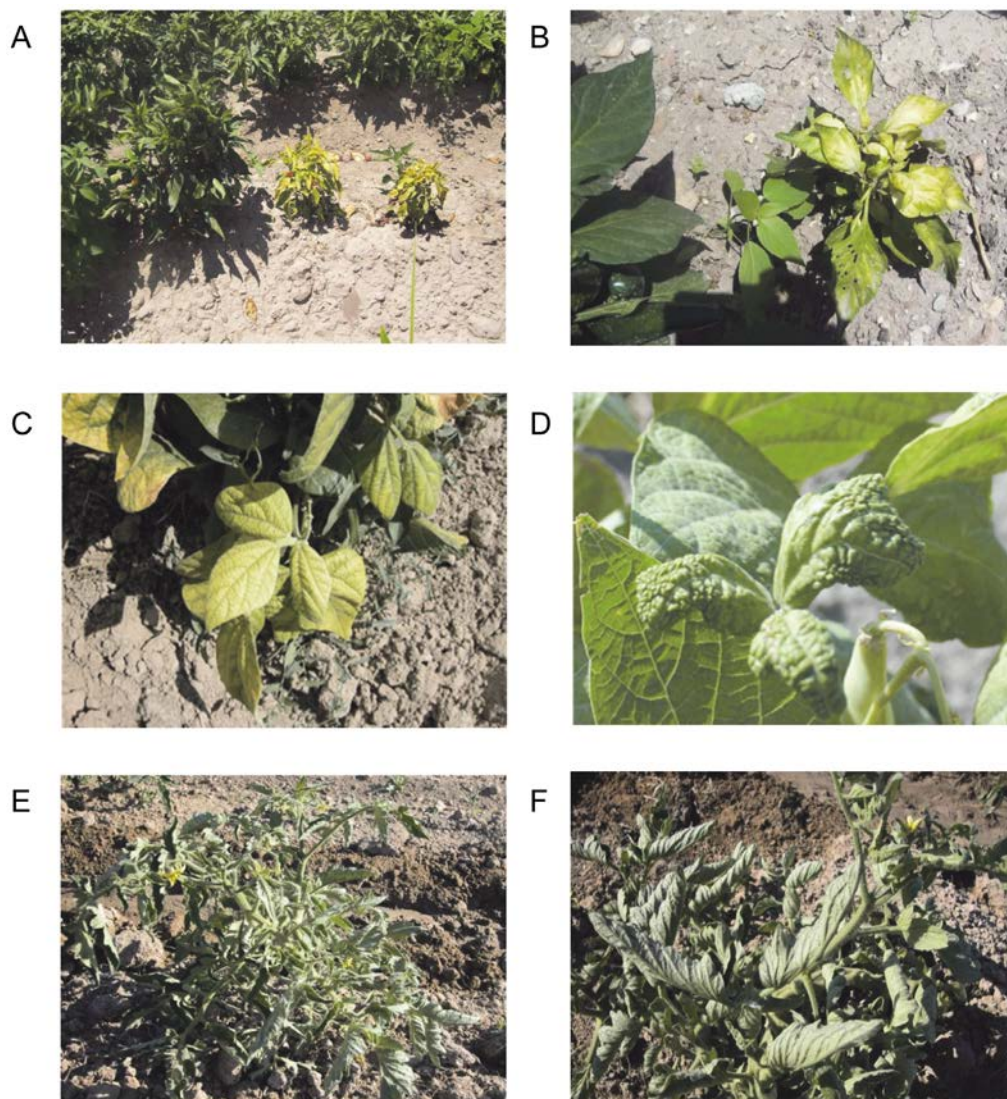
## Sintomatología de plantas infectadas por BCTV

Las enfermedades provocadas por BCTV han causado importantes pérdidas de cultivos en distintas regiones de Estados Unidos y en México. De acuerdo con las investigaciones realizadas, el BCTV infecta a una amplia gama

de cultivos, entre los que destacan, frijol, chile verde, espinacas y tomate (Creamer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). El nombre de la enfermedad no está bien definido, por lo tanto, su diagnóstico se basa en los síntomas característicos que se presentan en la mayoría de los cultivos. El proceso de infección en los cultivos se da cuando el insecto vector se alimenta de las plantas, inoculando con el aparato bucal el virus que pudo haber adquirido durante su etapa de desarrollo (Chen *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo de la enfermedad se presentan algunos síntomas que pueden ser similares en todos los cultivos afectados por virus. Sin embargo, también se presentan síntomas que son específicos para cada cultivo (Figura 5). En el caso del chile, las plantas jóvenes presentan enanismo, clorosis y rizado de hojas; en plantas en etapas de desarrollo avanzado se presenta una disminución en el amarre de fruto, también se pueden presentar hojas duras y quebradizas (Creamer, 2005).

**Figura 5.** Síntomas característicos causados por BCTV en diferentes cultivos hortícolas. A) hojas rizadas y quebradizas de chile, B) hojas cloróticas de chile., C) hojas cloróticas de frijol, D) hojas epinásticas de frijol, E) hojas de tomate con decoloración púrpura y rizadas hacia arriba y F) hojas de tomate pequeñas, rizadas y quebradizas (Fuente: A y B – proporcionadas por Loreto Robles Hernández; C y D – Schwartz *et al.*, 2005; E y F – <http://www.coopext.colostate.edu/TRA/PLANTS/curlytopvirus.shtml>).



En el cultivo de frijol, durante los primeros estadios de crecimiento se presenta epinastia, rizado en las primeras hojas trifoliadas, distorsión en las puntas de crecimiento y muerte en las yemas secundarias; las primeras hojas se tornan amarillas y la planta puede morir en pocas semanas, también se produce enanismo en la planta y las hojas se vuelven gruesas y quebradizas; en infecciones tardías, las plantas pueden madurar y producir pocas vainas si éstas se forman antes de la infección; las hojas trifoliadas que se formaron parcialmente durante la infección primaria pueden permanecer de un color verde oscuro y con malformaciones rizadas hacia abajo (Zitter, 2001; Nischwitz y Olsen, 2011). En el cultivo de tomate, las hojas de plantas infectadas se vuelven pequeñas, se tornan quebradizas y se rizan hacia arriba; las venas en el envés de la hoja presentan una decoloración púrpura y frecuentemente se hinchan; las raíces detienen su crecimiento y exhiben una proliferación de raíces secundarias; el tejido de floema presenta necrosis y aparece como círculos oscuros en un corte transversal (Zitter, 2001).

## Técnicas de identificación y cuantificación de BCTV

Debido a la naturaleza de los virus, resulta complicado, y a veces implica grandes costos, poder cultivarlos y aislarlos *in vitro*, ya que requieren de condiciones y sustratos altamente específicos y de un microscopio electrónico para poderlos visualizar; como alternativa, se han desarrollado técnicas específicas que arrojan resultados convincentes de su presencia (Madigan *et al.*, 2003). Dentro de las técnicas más comunes y factibles para la identificación de *Beet curly top virus* se encuentran la identificación de síntomas, pruebas fisiológicas en plantas indicadoras, prueba de serología y técnicas moleculares (Robles-Hernández *et al.*, 2010a). Dichas técnicas se utilizan ampliamente para la identificación y caracterización de diferentes tipos de virus fitopatógenos en el estado de Chihuahua (Robles-Hernández *et al.*, 2010b y Robles-Hernández *et al.*, 2011). A continuación se describen algunas de las más comunes.

## Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas que más se emplean para el diagnóstico de enfermedades causadas por virus en plantas es la prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que se basa en la unión covalente de enzimas con anticuerpos, de manera que se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos; existen variaciones sobre esta técnica, los cuales se describen a continuación. *El método de ELISA indirecto* se basa en la adsorción del antígeno a una placa de poliestireno, seguida de la adición del anticuerpo específico, el cual reacciona con el antígeno adherido a la placa. Posteriormente, se siguen los mismos pasos del método anterior, adición de la enzima ligada al anticuerpo, incorporación del sustrato y lectura de absorbancias en el lector de microplacas, recordando que cada uno de los pasos de cada reacción lleva un tiempo de incubación (Madigan *et al.*, 2003; Roitt *et al.* 2003). *El método directo de doble anticuerpo tipo sándwich (DAS-ELISA)* consiste principalmente en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno a la cual se le adiciona el antígeno presente en la muestra. Una vez que se lleva a cabo la unión antígeno-anticuerpo, se adiciona un segundo anticuerpo, el cual está ligado a una enzima que va a reaccionar con el complejo antígeno anticuerpo formado previamente. Una vez formado este complejo, se adiciona un sustrato como indicador de la reacción, que suministra una coloración directamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra (Robles *et al.*, 2010b). Una variante de esta prueba es el *triple anticuerpo tipo sándwich (TAS-ELISA)*. El fundamento de esta técnica surge a partir de la obtención de antisueros (suero con anticuerpos producidos por animales de laboratorio), el cual se obtiene mediante inmunizaciones en conejos o cobayos, principalmente. Estos anticuerpos son adsorbidos en una placa de poliestireno, luego se adiciona el extracto vegetal para provocar la unión del antígeno con el anticuerpo

primario; posteriormente se agregan otra serie de anticuerpos procedentes de otro proceso de inmunización, los cuales se unen al complejo antígeno-anticuerpo formado previamente. Para completar el proceso se adicionan anticuerpos conjugados con una enzima en donde se unen al complejo anticuerpo antígeno-anticuerpo; seguidamente, después de un período de incubación se adiciona un sustrato, el cual reaccionará con la enzima y suministrará una coloración directamente proporcional a la concentración de antígeno, la cual también se refleja con la medición de absorbancia (Vidhyasekaran, 2003; Durrin *et al.*, 2010).

De todas las variantes del método ELISA, la más utilizada para la identificación de las especies del BCTV es la técnica TAS-ELISA, debido a que es un método que tiene menos interferencia y es más sensible en la detección de este virus; esta técnica fue aplicada por Durrin *et al.* (2010) para la inmunodetección de dos cepas de *Curtovirus* en remolacha azucarera. Robles *et al.* (2011) aplicaron con éxito esta técnica para la identificación de *Beet severe curly top virus* en el cultivo de chile en el estado de Chihuahua.

## Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares son otra alternativa para el estudio y diagnóstico de enfermedades virales en plantas. Dichas técnicas se caracterizan por ser altamente sensibles y se basan en la manipulación de ácidos nucleicos aprovechando las propiedades singulares, en particular las del ADN (Zúñiga-Vega, 2002); los métodos para determinar la secuencia de bases del ADN emplean la manera en que éste se replica (Campbell y Farrell, 2004; Agrios, 2005; Chen *et al.*, 2011).

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. La PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) es una técnica muy utilizada en biotecnología, consiste en generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN y parte del requisito fundamental para que se lleve a cabo la reacción, es disponer de

fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos se conocen como cebadores o *primers*. Todo este proceso se desarrolla en varios ciclos programados en un sistema, que permiten la desnaturalización, hibridación y elongación del ADN hasta obtener el número de copias deseado (Campbell y Farrell, 2004). Finalmente, para corroborar la amplificación del ADN se hace una separación de fragmentos de cadena de ADN mediante la técnica de electroforesis utilizando matrices de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica de electroforesis se basa en el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, hacia un electrodo con carga opuesta; como fase inmóvil se suele emplear papel, y en el más común de los casos se utiliza gel de agarosa; como fase móvil se utiliza una solución amortiguadora que facilite el movimiento de los fragmentos de ADN (Campbell y Farrell, 2004; Chen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Robles-Hernández *et al.*, 2011).

*Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*. Esta técnica se basa en la detección y medición de productos generados durante la PCR, de esta forma, es necesario disponer de un método que exprese la acumulación del producto de PCR y un aparato que registre los resultados durante los ciclos de la reacción; el proceso de amplificación y detección se produce de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de alguna acción posterior. Esta técnica emplea un sistema de detección por fluorescencia, por medio de esto, se puede medir la cantidad del ADN producido en cada uno de los ciclos de amplificación, dado que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN amplificado, permitiendo así su cuantificación; el número de ciclos que se necesitan para que la señal de fluorescencia alcance el nivel umbral se conoce como *Threshold cycle* ( $C_T$ , por sus siglas en inglés). Algunos hallazgos contribuyeron al desarrollo de la PCR en tiempo real; uno de ellos es que

la *Taq* polimerasa posee actividad de exonucleasa, y el otro es la construcción de sondas de oligonucleótidos con doble marcaje, basadas en el principio de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia o FRET (Costa, 2004). La técnica de PCR en tiempo real ha sido utilizada para la identificación de *Curtovirus* en cucurbitáceas como melón y calabacita (Chen *et al.*, 2009).

## Método de clonación de BCTV

Para poder multiplicarse, los virus requieren parcial o totalmente de la maquinaria de la célula, a partir de ésta se logran reproducir algunas proteínas virales o el genoma completo. Para la replicación de virus fitopatógenos se debe tener en cuenta el tipo de planta hospedera que se ha de utilizar, así como el tipo de vector, ya que algunos virus tienen una alta afinidad por esos hospederos y vectores (Chen *et al.*, 2010). La clonación molecular es una de las herramientas de mayor utilidad en ingeniería genética y demás áreas afines, ya que ha facilitado el análisis de cualquier genoma. La finalidad de esta técnica es la de producir grandes cantidades del genoma viral; la estrategia básica de la clonación consiste en transferir un gen o una región específica de un organismo a otro para observar su expresión en el organismo receptor (Madigan *et al.*, 2003). El proceso de clonación *in vitro* puede llevarse a cabo en varias etapas: primero, se hace el aislamiento y la fragmentación del ADN del organismo de interés, éste puede estar combinado con el ADN de otro organismo, que con la ayuda de los *primers* específicos en un proceso de PCR, se logra obtener una gran cantidad de ADN del organismo blanco. Posteriormente, se hace la unión de los fragmentos del ADN amplificado en un vector de clonación; estos vectores están generalmente diseñados para permitir la recombinación del ADN foráneo en un sitio de restricción que corta al vector sin afectar su replicación; como parte final del proceso de clonación, se hace la introducción y mantenimiento de un organismo receptor, en el

cual se introduce el ADN generado durante el proceso de amplificación (Madigan *et al.*, 2003). En el caso de los *Geminivirus*, algunas de las plantas que se usan como hospederos son *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis* spp. y *Nicotiana benthamiana*, inclusive se pueden utilizar plantas de los cultivos a los que ataca.

Chen *et al.* (2010) iniciaron el proceso de clonación de *Beet mild curly top virus* a partir de plantas de Chile con los síntomas característicos causados por este virus. El material genético del virus se extrajo, se hizo la clonación y posteriormente el producto se introdujo en plantas de *Nicotiana tabacum*, observándose que el análisis de secuenciación fue muy similar a los resultados de secuenciación obtenidos del material genético clonado proveniente de plantas de Chile (Chen *et al.*, 2010). Este tipo de técnicas resultan ser muy útiles, ya que se puede obtener de forma rápida una gran cantidad de material genético, el cual se puede utilizar para una identificación más segura de *Geminivirus*. Un trabajo similar fue realizado por Baliji *et al.* (2007) con el *Spinach curly top virus*, sólo que en este caso utilizaron *Arabidopsis* spp. como huésped para introducir el material clonado (Baliji *et al.*, 2007).

## Métodos de secuenciación

Mediante la secuenciación se puede obtener el orden exacto de monómeros, tanto de proteínas, como de ácidos nucleicos, con esto se puede secuenciar las proteínas de la cápside de un virus, así como también el genoma completo del virus (Kashina *et al.*, 2005). Mediante esta técnica se pueden realizar comparaciones del genoma, lo cual permite ubicar y obtener la filogenia de una especie, en este caso, de un virus. La secuenciación se lleva a cabo siguiendo un proceso similar al de PCR, el cual se programa a varios ciclos, los cuales incluyen desnaturalización, hibridación y elongación. La reacción se lleva a cabo en un tubo de PCR, el cual debe contener amortiguadores e iniciadores altamente específicos para la región que se desee secuenciar; una vez obtenida la secuencia de



nucleótidos, se hace uso de bases de datos (bancos genéticos) para comparar la secuencia de nucleótidos con las de otros organismos (Kashina *et al.*, 2007). Existen algunos métodos altamente sensibles que permiten una secuenciación eficaz y que han sido utilizados en múltiples investigaciones. Uno de los métodos es el de Maxam y Gilbert, en el que se determina la secuencia de una molécula de ADN utilizando productos químicos que cortan en posiciones específicas los fragmentos marcados en sus extremos 5'. El segundo método es el de Sanger, en donde se utiliza un templete de ADN de cadena sencilla, para sintetizar la hebra complementaria, la cual se utiliza en posiciones específicas. En ambos métodos, la secuencia de la molécula se determina por diferencia en los tamaños de los fragmentos generados (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977).

## Análisis filogenético

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, siglas en inglés), para establecer una clasificación confiable se deben considerar aspectos como la organización del genoma, propiedades biológicas, rango de hospederos y el tipo de vector de diseminación. El análisis filogenético consiste en comparar la secuencia genómica del virus BCTV y así poder establecer la relación con otras especies de curtovirus (Fauquet *et al.*, 2008; Yazdi *et al.*, 2008). Para el análisis filogenético, una vez que se obtiene la secuencia completa del genoma, se hace uso de bases de datos creadas por organizaciones especializadas que son de libre acceso y altamente confiables. Dichas organizaciones se encuentran en una constante actualización, recabando información de todas partes del mundo; estas bases de datos proporcionan la relación que hay con otras especies mediante porcentajes de similitud, número de secuencias iguales, entre otras. Existen varias metodologías para realizar el análisis filogenético con la secuencia de otros virus del mismo género, y así ver las similitudes y diferencias que puedan


existir para deducir si existe una secuencia en común con las otras especies (Yazdi *et al.*, 2008; Kerlan *et al.*, 2011).

## Conclusiones

La identificación y caracterización de *Beet curly top virus* implica un trabajo a profundidad, pues se tiene que iniciar desde su taxonomía, su importancia agrícola, su identificación mediante el uso de diversas técnicas serológicas y moleculares, así como su clonación, secuenciación y análisis filogenético a través de métodos modernos y de vanguardia. La información revisada y analizada en este documento muestra una panorámica general en trabajos con *Curtovirus* para técnicos e investigadores interesados en iniciar estudios que permitan aplicar las técnicas descritas en este documento para la identificación y caracterización de estos virus. Dicha información muestra el potencial para escalar a otros niveles de investigación que involucren estudios de las diversas proteínas que contiene el genoma, así como la relación que existe entre las especies de este virus con los vectores y sus hospederos.

## Literatura citada

- AGRIOS, G. 2005. Plant pathology. Fifth edition. ELSEVIER Academic Press. USA. 922 p.
- BALIJI, S., J. Sunter and G. Sunter. 2007. Transcriptional analysis of complementary sense genes in *Spinach curly top virus* and functional role of C2 in pathogenesis. *Molecular plant-microbe interactions* 20(2): 194-206.
- CAMPBELL, M.K. and S. O. Farrell. 2004. Bioquímica. Thomson. México, D.F. 775 p.
- CHEN, L.F. and R. L. Gilbertson. (2009). Curtovirus-cucurbit interaction: acquisition host plays a role in leafhopper transmission in a host-dependent manner. *Phytopathology* 99(1): 101-108.
- CHEN, L.F., E. Vivoda and R.L. Gilbertson. 2011. Genetic diversity in curtoviruses: a highly divergent strain of *Beet mild curly top virus* associated with an outbreak of curly top disease in pepper in Mexico. *Archives of Virology* 156: 547-555.
- CHEN, L.F., K. Brannigam, R. Clark and R.L. Gilbertson. 2010. Characterization of curtoviruses associated with curly top disease of tomato in California and monitoring for these viruses in Beet leafhoppers. *Plant Disease* 94: 99-108.
- COSTA, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22 (5): 299-305.
- CREAMER, R., H. Hubble and A. Lewis. 2005. Curtovirus infection of chile pepper in New Mexico. *Plant disease* 89(5): 480-486.
- DURRIN, J.S., O.V. Nikolaeva, C.A. Strausbaugh and A.V. Karasev. 2010. Immunodetection of two curtoviruses infecting sugar beet. *Plant Disease* 94(8): 972-976.

- FAUQUET, C.M., R.W. Briddon, J.K. Brown, E. Moriones, J. Stanley, M. Zerbin, and X. Zhou. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of virology* 153(4): 783-821.
- HULL, R. 2002. Matthews' Plant virology. Academic press. San Diego, California, USA 1001p.
- KASHINA, B.D., R.B. Mabagala, A.A. Mpunami, H. Jeske, and J. Jovel. 2007. Genetic analysis of geminiviral DNA from tomato yellow leaf curl diseased tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants from Tanzania. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 40(3): 176-182.
- KERLAN, C., O.V. Nikolaeva, X. Hu, T. Meacham, S.M. Gray and A.V. Karasev. 2011. Identification of the molecular make-up of the Potato virus Y strain PVY<sup>Z</sup>: Genetic typing of PVY<sup>Z</sup>-NTN. *Phytopathology* 101(9): 1052-1060.
- MADIGAN, M.T., J.M. Martinko y J. Paker. 2003. Biología de los microorganismos. Pearson Educación. Madrid, España. 1011 p.
- MAXAM, A. M. and Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(2), 560-564.
- NISCHWITZ, C. 2010, June. Curtoviruses in leafy greens in Arizona. In *Phytopathology* (Vol. 100, No. 6, pp. S89-S90). 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, MN 55121 USA: American Phytopathological Society.
- ROBLES-HERNANDEZ, L., A.C. González-Franco, E.M. Gill-Langarica. 2011. First report of *Beet severe curly top virus* in jalapeño pepper in Chihuahua, Mexico. *Plant disease* 95(6): 778.
- ROBLES-HERNÁNDEZ, L., A.C. González-Franco, E.M. Gill-Langarica, L. Pérez-Moreno y J.C. López-Díaz. 2010. Virus fitopatogénos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia Chihuahua* 4(2): 72-86.
- ROITT, I. M. and J.D. Peter. 2003. Inmunología. Editorial Médica Panamericana, Madrid España, 560 p.
- ROJAS, M. R., C. Hagen, W.J. Lucas and R.L. Gilbertson. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361-394.
- SANGER, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5467.
- TENG, K., H. Chen, J. Lai, Z. Zhang and F. Fang. 2010. Involvement of C4 protein of *Beet severe curly top virus* (family Geminiviridae) in virus movement. *PloS one* 5(6): e11280.
- VIDHYASEKARAN, P. 2004. *Concise encyclopedia of plant pathology*. Food Products Press.
- YAZDI, H. B., J. Heydarnejad and H. Massumi. 2008. Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus genes* 36(3): 539-545.
- ZITTER, T.A. 2001. El ápice rizado. Compendio de plagas y enfermedades del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 35-36 p.
- ZÚÑIGA-VEGA, C. y P. Ramírez. 2002. Los Geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 64: 25-33. 

Este artículo es citado así:

Robles-Hernández, L., L. C. Chavira-Sáenz, M. T. Sáenz-Gutiérrez y A. C. González-Franco. 2014. Técnicas serológicas y moleculares utilizadas para la identificación y caracterización de *Beet curly top virus*. *TECNOCENCIA Chihuahua* 8(1): 7-16.

## Resumen curricular del autor y coautores

**LORETO ROBLES HERNÁNDEZ:** Título de Ingeniero Fruticultor (1992) y grado de Maestro en Ciencias de la Productividad Frutícola (1998) por la Universidad Autónoma de Chihuahua y grado de Doctor en Fitopatología (2004) por la Universidad de Idaho, USA. Es profesor investigador en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realiza investigación en el estudio de enfermedades de cultivos hortícolas. Imparte los cursos de Fitopatología, Microbiología, Control Biológico y Fisiología y Tecnología de Poscosecha. Ha realizado varios proyectos de investigación con financiamiento externo. Ha dirigido y concluido varias tesis de maestría y licenciatura. Ha publicado varios capítulos de libros, artículos científicos y resúmenes en memorias de congresos nacionales e internacionales. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (S.N.I.), cuenta con el nombramiento de Perfil Deseable por la SEP-PROMEP y tiene dos primeros lugares por la presentación de los mejores trabajos de investigación, otorgados por la Sociedad Mexicana de Fitopatología y la Asociación Mexicana de Microbiología, respectivamente. Es responsable del área de diagnóstico de enfermedades de plantas en el laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología de Poscosecha en La Facultad de Ciencias Agrotecnológicas.

**ANA CECILIA GONZÁLEZ FRANCO:** Título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1992 y grado de Maestro en Ciencias de la Productividad Frutícola en 1995 por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Obtuvo su Doctorado en Microbiología, Biología Molecular y Bioquímica (2004) en la Universidad de Idaho, USA. Es profesor investigador en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realiza investigación en el Control Biológico de Enfermedades y en la Interacción-Microorganismo-Planta. Imparte las cátedras de Interacción-Microorganismo-Planta, Bioquímica, Química y Biotecnología. Ha realizado varios proyectos de investigación con financiamiento externo. Ha dirigido y concluido varias tesis de maestría y licenciatura. Ha publicado varios artículos científicos y resúmenes en memorias de congresos nacionales e internacionales. Cuenta con el nombramiento de Perfil Deseable por la SEP-PROMEP y tiene dos primeros lugares por la presentación de los mejores trabajos de investigación, otorgados por la Sociedad Mexicana de Fitopatología y la Asociación Mexicana de Microbiología, respectivamente.

**LUIS CARLOS CHAVIRA SÁENZ:** Título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2008 con mención especial por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realizó su tesis para obtener el título de licenciatura titulada "Efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano *Lippia berlandieri* en bacterias patógenas del tracto respiratorio superior. Publicación del abstract "Antimicrobial Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri*) Essential Oil Against Upper Respiratory-Tract Pathogenic Bacteria" en la American Society For Microbiology. Ha participado en Jornadas de investigación en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Actualmente cursa la Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua con el tema de investigación titulado, Identificación y caracterización del Beet curly top virus en cultivos hortícola de interés económico para el estado de Chihuahua.

**MARÍA TERESA SÁENZ GUTIÉRREZ.** Es profesora investigadora de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Obtuvo su maestría y licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Actualmente conduce su investigación sobre Manejo Integrado de Plagas, y Estudios de Efectividad Biológica de Insecticidas. Imparte las materias de Entomología, Manejo Integrado de Plagas y Uso y Manejo de Insecticidas. Asesora estudiantes tanto de la licenciatura en Ingeniero en Producción y Comercialización Hortícola como en la Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola. Es responsable del Laboratorio de Entomología y Manejo Integrado de Plagas de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Campus Cuauhtémoc.