



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



U.N.A.M. CAMPUS  
IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

VARIACION Y DETECCION DE RNA's DE DOBLE  
CADENA EN TIPOS MEXICANOS DE CHILE

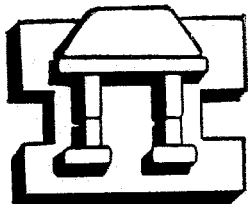
(*Capsicum annuum* L.)

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A :**

**PEDRO AGUSTIN MEZA ESPINOSA**



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

LOS REYES IZTACALA

JULIO 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El hombre, servidor e intérprete de la naturaleza, ni obra ni comprende más que en proporción de sus descubrimientos experimentales y racionales sobre las leyes de esta naturaleza; fuera de ahí, nada sabe ni nada puede.**

**Francis Bacon**  
*Novum organum* (1620)

## **Dedicatoria**

**A Reyna por ser el mejor ejemplo del trabajo y la perseverancia, por amar a sus hijos y ayudarme hasta el fin de este trabajo.**

**A Karla por estar siempre a la altura de las circunstancias, por ser la pareja mas comprensiva y por apoyarme en las malas y peores durante tantos años.**

### **Agradecimientos:**

**A mis hermanos Eduardo y Marco Antonio por apoyarme siempre, lo mismo que sus respectivas familias.**

**A la familia de mi tío Cosme Meza, incluyendo a Ana por brindarme su confianza e incluirme como parte de su familia.**

**A los amigos del correo, Paco, Elizabeth, Mateo, Gabriel, Irma, Raúl, Domingo y varios administradores por tantos años de apoyo. A SEPOMEX por brindarme empleo durante diez años.**

**A los compañeros de generación, Lalo, Félix, Maribel, Carmen, Laura, Adrián, Alejandra, Elba, Lupis, Víctor, Sandra, Antonio y Miguel. Por la amistad que ha perdurado desde que comenzamos la universidad.**

**Al Biólogo Alejandro Monsalvo quien participó enormemente en la elaboración de este trabajo y quien considero es un magnifico profesionista y amigo.**

**A los compañeros de laboratorio de microbiología Cilia, JÓse, Fabis por su gran amistad y valiosa ayuda.**

**Al laboratorio de Bioquímica Molecular por prestarme su equipo y reactivos para llevar acabo algunos experimentos y mediciones.**

**Al director de tesis Dr. Rodolfo De La Torre por la gran paciencia y todas sus enseñanzas.**

**A los profesores que revisarán y que enriquecieron este trabajo Dra. Martha Martínez, Dr. Diego Arenas, M. en C. Elias Piedra, Dr. Jorge Campos.**

**A todos mis profesores a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a la propia Universidad Nacional Autónoma de México por guiarme y formarme como persona y profesional.**

**A Elba por cuidar lo que mas amo en este mundo.**

**A la familia de Pedro y Filemón Fragoso por su amistad y por la impresión de esta tesis.**

**A todos muchas gracias.**

<b>INDICE</b>	<b>Pagina</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
Problemática del chile	3
Bajo rendimiento por diferencias tecnológicas	3
Plagas	4
Enfermedades	5
Hongos	6
Virus	7
Problemática de germinación	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>11</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
RNA dc en la naturaleza	12
RNA dc de alto peso molecular de 3 a 18 Kb	13
RNA dc de alto peso molecular asociado a (ECM)	15
RNA dc de alto peso molecular de 0.8 a 2.5 Kb	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
Análisis electroforético de RNAdc extraído de plantas cultivadas en invernadero	20
Análisis electroforético de RNAdc de plantas colectadas en campo	21
Purificación de RNA dc para tejidos de plantas	22
Electroforesis	23
Tinción de geles	24
Montaje de geles	24
<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
Resultados del análisis electroforético de RNAdc en muestras colectadas en invernadero	27
Resultados del análisis electroforético de RNAdc en muestras colectadas en campo	32
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

El chile (*Capsicum annuum* L.) en México ha sido cultivado y usado como alimento en la dieta de la población desde tiempos precolombinos. Actualmente nuestro país es el tercer productor mundial después de Nigeria y España por lo que es una fuente de ingresos importante. Las pérdidas en los cultivos y por consecuencia económicas se deben entre otros factores a enfermedades y plagas de las que destacan los hongos, nemátodos, bacterias, insectos como transmisores de virus y recientemente se sospecha de elementos genéticos de RNAdc de alto peso molecular que están involucrados con la reducción de la germinación en un fenómeno llamado esterilidad citoplásmica masculina, estos RNAdc pueden ser extraídos y analizados por medio de electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. En este trabajo se analizaron plantas de *C. annuum* cultivadas en invernadero y plantas de *C. annuum* de esta especie en parcelas comerciales. En estas plantas se encontraron especies de RNAdc de alto peso molecular con mucha variabilidad, de una a hasta ocho bandas en un rango de peso molecular de  $1 \text{ a } 3 \times 10^6$  Da, de las que se sospecha que pertenecen a los genomas de los virus crípticos. También en este análisis aparece otro grupo de bandas en un rango de  $1.5 \text{ a } 3 \times 10^6$  Da, estos elementos genéticos de RNAdc de alto peso molecular que aun no se han descrito en Chile y que se parecen a RNAdc de alto peso molecular encontrados en otras especies que causan esterilidad citoplásmica masculina o así también con otros RNAdc de alto peso molecular que se han descrito en el cloroplasto y la mitocondria y que algunas veces pueden homologar con el DNA de la planta. Sin embargo también se cree que estos elementos genéticos puedan dar origen a características agronómicas.

## INTRODUCCION.

En México el chile *Capsicum* ha sido cultivado y usado como alimento en la dieta de la población desde tiempos precolombinos, junto con el maíz, el frijol y la calabaza. Mesoamérica se le considera el centro de origen, principalmente de la especie *C. annuum*. El género cuenta con 13 especies y nueve tipos distintos o variedades (Higuera, 1979).

El chile se cultiva desde nivel del mar, hasta los 2,500 msnm en 24 diferentes estados siendo Zacatecas, Veracruz, Sinaloa, Guanajuato y San Luis Potosí los principales productores. México, en producción mundial ocupa el tercer lugar con 550 000 toneladas, Nigeria y España ocupan el primero y segundo lugar con 821 000 y 720 000 toneladas respectivamente (Mora, 1991).

En México se destina entre el 2.9 y 3.7 % de la superficie agrícola a la producción de hortalizas, con lo que se genera aproximadamente el 17.5 % del total de la fuerza de trabajo, así como el 18 % del valor de la producción y casi el 50 % de las divisas por la exportación agrícola (Velasco, 1999).

Entre los años de 1989 y 1998, el chile verde tuvo una participación en superficie agrícola nacional del 0.40 al 0.59%, y en la superficie hortícola del 11.79 al 17.17%. el chile seco



participó con el 0.14 al 36%, y con el 4.06 al 9.61% del total de la superficie agrícola nacional y hortícola, respectivamente (Velasco, 1999).

El consumo per cápita del chile en México se ha incrementado paulatinamente de 1925 a 1991, debido a que se ha hecho indispensable en la mayor parte de los guisos como saborizante y complemento en todos los estratos sociales, además de su consumo en los productos industrializados, mientras que el consumo de chile seco ha permanecido más o menos constante en los años mencionados, con un promedio de 0.45 Kg/por persona, debido a su característica de conservación y porque es sustituido por otros saborizantes artificiales (Velasco, 1999)

### **Problemática del chile.**

La producción de chile en México presenta diversas clases de problemáticas, las cuales afectan su cultivo, rendimiento y calidad de producción. Entre los principales factores involucrados en esta problemática, destacan el bajo nivel de utilización de tecnología, variedades de poca adaptación, plagas y enfermedades.

### **Bajo Rendimiento por diferencias tecnológicas**

El rendimiento de chile es frecuentemente bajo debido a las diferentes tecnologías de producción adaptadas a diferentes condiciones, enfermedades y patógenos. En las siembras comerciales del cultivo de chile en el país, se observan diferencias tecnológicas muy contrastantes; desde las altamente tecnificadas y sofisticadas de las regiones de Sinaloa y

Sonora, hasta las tecnologías rudimentarias y tradicionales de algunas regiones de Veracruz, La Huasteca Hidalguense y la Península de Yucatán, en donde la adopción de nueva tecnología es lenta debido al bajo nivel cultural y al escaso recurso económico de los productores (Laborde, 1984; Pozo, 1983).

Los cultivares nativos usados en la siembras comerciales del cultivo de chiles picantes, tienen carencias en el rango de adaptación, por lo tanto son de bajo rendimiento y de mala calidad debido a la mezcla de subtipos, variación morfológica y diversidad de formas de frutos, lo cual demerita la aceptación comercial e industrial del producto (Pozo, 1983).

### **Plagas**

A nivel nacional el barrenillo o picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano, es la plaga más generalizada. Se le encuentra presente durante toda la etapa de producción del cultivo y su combate aumenta el costo de producción, ya que es necesario hacer muchas aplicaciones de insecticidas para combatir esta plaga. En aquellos casos en que su control es deficiente puede significar la pérdida total de la cosecha (Laborde, 1984). ó si la plaga no se combate oportunamente también ocurre lo mismo. El periodo crítico de ataque al cultivo ocurre desde el inicio de la floración hasta el final de la cosecha y se observa por la caída prematura de botones florales y frutos inmaduros, las larvas se desarrollan dentro del fruto y se alimentan de la semilla en formación, al transformarse en adultos abandonan el fruto a través de un orificio que construyen y los frutos atacados caen, perdiendo así su valor comercial. La

dificultad para atacarlos con productos químicos radica en que las larvas y pupas viven dentro del fruto (López, 1996).

El pulgón verde (*Myzus persicae* Sulzer), es también una plaga importante a nivel nacional, se presenta durante todo el ciclo vegetativo del cultivo, además del daño que causa como insecto chupador, es uno de los transmisores primarios de las enfermedades virosas (Lozaya, 1993). La principal característica es el breve tiempo en que el pulgón las transmite a las plantas; Los alados son los mas peligrosos debido a su gran actividad y desplazamiento (Pontis, 1997).

### **Otras plagas**

Otras plagas que se presentan en el cultivo del chile son: minador de la hoja (*Lirimyza munda*, Frick), araña roja (*Tetranychus schoenei*, Mc Gregor), pulga saltona (*Epitrix sp.*), mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*, West.) y (*Diabroticas spp.*) que no son tan generalizadas y que afectan sólo algunas regiones productoras (Pozo, 1983).

### **Enfermedades**

Un parásito importante es *Meloidodera mexicana* un nemátodo de la familia Heteroderidae, constituye el principal grupo dentro de los nemátodos que ocasionan daño a la agricultura, los síntomas son agallas o lesiones visibles, pero la hembras se encuentran totalmente dentro del tejido, esta especie induce una célula gigante que se localiza en el parénquima interno del cilindro vascular, entre el xilema y el floema, lo que produce un desplazamiento y

distorsión del tejido vascular, las alteraciones afectan en cultivo de *Capsicum annuum*, la mayoría de estos, causan daños severos que atroflan las raíces e interfieren con el buen funcionamiento. El efecto de la infección se refleja en las partes aéreas de la planta, como el amarillamiento, marchites y crecimiento retardado (Fuentes, 1995).

### **Hongos**

En 1920 Leonian encontró una nueva especie de *Phytophthora* atacando plantaciones de chile llamado *Phytophthora capsici* responsable de una de las enfermedades más importantes del cultivo de chile debido a las pérdidas económicas que ocasiona, enfermedad conocida comúnmente como “Marchites del chile”. Se estima que la incidencia de la enfermedad en la diversas zonas productoras del país fluctúa entre 10 y 30%, pero en regiones como el bajío, cuando las condiciones son favorables para el desarrollo del patógeno puede ser de 40-60% y en algunos casos hasta el 100% (Redondo, 1996). El control de esta enfermedad se ha intentado mediante la utilización de fungicidas, variedades resistentes y prácticas culturales, como hacer altos los surcos y regular el regado de la tierra. Recientemente se ha practicado la solarización que consiste en tapar los surcos con polietileno transparente para aumentar la temperatura y evitar que el hongo se desarrolle, este método ha tenido excelentes resultados (Chavez, 1994). En la actualidad se estudia el mecanismo que confiere resistencia a las plantas de chile contra la invasión de *P. capsici* y esta dado por la fitoalexina capsidiol compuesto antifungico que todavía no está bien estudiado (Redondo, 1986;Pozo, 1983).

## **Virus**

El género *Capsicum* presenta susceptibilidad a 43 patógenos de naturaleza viral, en forma natural la especie *C annuum* es infectada por 18 virus. En el cultivo del chile se han reportado mundialmente más de 35 enfermedades virales potenciales. Es probable que algunos virus reportados sean variantes del mismo patógeno y existan etiologías de tipo viral aun no identificadas (Mora, 1991).

Los síntomas virales observados en chile en condiciones de campo es muy variada. Estos incluyen mosaicos, distorsión foliar, detención del crecimiento, marchites letal, aborto de flores, necrosis apical, etc. Los síntomas dependen del genotipo de la planta, etapa de la planta al ser infectada, condiciones ambientales variantes y mezclas de virus. La diagnosis basada únicamente en este criterio es imprecisa para este cultivo y en general para muchas enfermedades virales en donde el hospedante tiene alta variación genética natural. Aunque se ha intentado asociar ciertos síntomas del chile con determinados agentes virales, la identificación se ha basado en plantas diferenciales, microscopia electrónica e inclusiones virales y recientemente con la técnica serológica de inmunoabsorbencia con enzimas conjugadas (Mora, 1991).

Las pérdidas causadas por virus en plantas de chile puede variar de 0 a 100%, tanto en calidad como en cantidad del producto, dependiendo principalmente del tipo de patógeno, si es uno o varios, del cultivar, presencia de vectores, condiciones metereológicas de antes o durante el desarrollo del cultivo y edad de la planta al infectarse (Lozaya, 1993).

La incidencia de un virus en una localidad determinada, es el resultado de una serie de factores tanto físicos como biológicos del medio y su diseminación ocurre de varias formas: por contacto directo durante el manejo del cultivo por el productor (Transmisión mecánica), injertos, implementos de labranza en el campo y algunos por agua de riego, cuando las partículas se encuentran en el suelo y son absorbidas por las raíces, por ultimo a través de semilla o polen (Rocha, 1987).

Se ha informado que casi un centenar de virus, son transmitidos por semilla en todas las especies. Sin embargo, como regla general, solo una pequeña cantidad (del 1 al 30 %) de las semillas que provienen de plantas infectadas lo transmiten, la mayoría de los virus transmitidos a través de la semilla, parece provenir principalmente del óvulo de plantas infectadas, pero se conocen varios casos en que el virus que se encuentra en la semilla proviene con la misma frecuencia del polen que fertilizó a la flor (Pontis, 1997; Vega, 1989).

Los virus transmitidos por polen pueden infectar no sólo a las semillas y plántulas que se desarrollan a partir de él, sino lo que es mas importante, que puede propagarse a través de la flor fecundada y descender hasta la planta madre e infectarla, esta polinización de las flores con polen infectado por un virus puede dar como resultado menor cantidad de frutos que la que se obtiene con el polen libre de virus, la transmisión de este tipo de patógeno de planta en planta a través del polen es bastante rara o se produce en unos cuantos virus (Agrios, 1995; Vega, 1989).

### **Problemática de la germinación**

Los cultivares nativos que se usan en la siembras comerciales de chiles picantes son de bajo rendimiento y de mala calidad, debido a la mezcla de subtipos, la variación morfológica y las diversas formas de fruto, además de la susceptibilidad a las enfermedades y plagas (Pozo, 1983). Por otro lado, se ha observado en campo baja germinación de la semilla de *C. annuum* en los almácigos que es de aproximadamente el 10 %, lo que obliga a los productores a poner mas semilla de lo normal, es decir en algunos casos la cantidad normal de semilla que se utiliza en una hectárea es de 2Kg la baja fertilidad obliga el productor a comprar 20 gr más de lo normal por lo que se sospecha que es debido a virus (De la Torre comunicación personal). Por otra parte puede ser por técnicas de siembra rudimentarias, en terrenos sin preparación adecuada o sin protección contra el frío, por no desinfectar el almacigo y por tener un mal manejo de agua de riego. Todo esto trae como consecuencia la perdida de plantas o el desarrollo de plantas débiles, lo cual eleva los costos de producción del cultivo.

Para explicar la reducción en la germinación, se propuso considerar que este fenómeno era debido a alteraciones del genoma del chile, esto es que pudieran existir mutaciones o alteraciones en el número cromosómico básico del genoma del chile. Sin embargo, los resultados de estudios citogenéticos en una colección de *Capsicum* que presenta una reducción de la germinación, no mostró ninguna alteración en el número cromosómico básico del genoma (Corona, 2000).

Por otro lado en un trabajo preliminar en donde se investigaron por análisis electroforético de RNAdc diferentes especies de hortalizas que incluyen tomate, frijol, calabaza, jitomate y chile en diferentes entidades de la republica mexicana Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos., Se pudieron identificar diferentes virus como el Virus mosaico del pepino (CMV), virus mancha anular del pepino (TRSV), en algunos casos RNA satelites asociados a CMV. Así como también RNAdc con pesos moleculares que variaron de 0.9 a 1.2 X10<sup>6</sup> Da que se encontraban frecuentemente en plantas de (*Capsicum annuum*) chile y que se cree que algunas bandas corresponden a virus crípticos y otras son de origen desconocido (Monsalvo, 2002).



## **JUSTIFICACIÓN**

Por mucho tiempo se pensó que la reducción en la germinación de la semilla de chile de múltiples variedades o tipos, se debía al ataque de patógenos o plagas que impedían la germinación normal, lo cual conduce a una baja densidad de plántulas disponibles para el transplante o establecimiento del cultivo. Este fenómeno se observa en siembras directas o bien con la producción de plántulas de chile en charolas, utilizando incluso el sustrato estéril de los almácigos, sin que se haya encontrado explicación sobre la pérdida o reducción de la germinación de la semilla. Aunque algunas evidencias sugieren que la presencia de RNAdc de alto peso molecular, pudiera estar relacionado no solo con la reducción de la germinación sino también con otras características.

En México no se han hecho trabajos sobre RNAdc de alto peso molecular en chile, este sería el primer paso para estudios posteriores en donde se involucre presencia de RNAdc con esterilidad masculina y reducción de la germinación.

## **OBJETIVO**

Detectar la presencia y variación de RNAdc de alto peso molecular en variedades de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivados en México.

## ANTECEDENTES

### **RNA de doble cadena (RNAdc) de alto peso molecular en la naturaleza**

El RNAdc fue descubierto por primera vez en 1963 por Montagnier y Sanders en encefalomiocarditis de células tumorales de ratón. El RNAdc fue inmediatamente relacionado con la replicación viral. Sin embargo, posteriormente se determinó la presencia de RNAdc en células aparentemente normales. El RNAdc ha sido detectado en algunas plantas, animales, hongos y bacterias como consecuencia de la infección de algunos virus, sin embargo, se ha logrado detectar la presencia de RNAdc de origen no viral, al que se le atribuyen diversas funciones, como son: 1.- la capacidad de inducir interferón, 2.- la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en eucariontes y la regulación de la expresión de los genes (Libonati *et al.*, 1980).

El RNAdc que se ha identificado en plantas, corresponde a la forma replicativa (RF) de los virus de RNA de cadena sencilla (RNAs) que las infecta. estos elementos genéticos pueden utilizarse como marcadores de diagnóstico de infecciones vírales en plantas (Doods et al, 1984a). También se pueden asociar con la esterilidad citoplásmica masculina (Grill and Ganger, 1981) y existe evidencia que los RNAdc como elementos genéticos, pueden modular la infección de hongos patógenos en algunas plantas (Castaño et al., 1978; Elliston, 1985).

Virus específicos de RNAdc son comúnmente originados en células con virus de RNAs, ese RNAdc es la forma replicativa (Morris and Doods, 1979), en el caso de los virus de RNAdc, el segmento genómico aparece también como RNAdc que en la planta es más estable, es posible extraer RNAdc no degradado de la planta, hacer una electroforesis y el tamaño y número de bandas varía de un grupo de virus a otro, este puede ser diagnosticado en base a los perfiles de RNAdc (Doods et al., 1984b; Valverde et al., 1986).

### **RNA dc de alto peso molecular de 3 a 18 Kb**

Este RNAdc es enigmático porque se encuentra en plantas libres de virus y el origen y función biológica son desconocidas, algunas de las características que lo separan de otros grupos son: Ausencia de síntomas relacionados con infección viral visibles en la planta hospedera, transmitido por semilla o polen, el RNAdc se encuentra en todos los estados de desarrollo, no transmitido a través de inoculación mecánica o injerto, ausencia de partículas virales, una concentración constante en las células y algunas veces puede o no estar relacionado con algún organelo como, núcleo, mitocondrias y cloroplasto.

En una especie de arroz (*Oryza sativa L.*) se encontró RNAdc de 16Kb, toda la molécula es lineal, no se encontraron partículas virales, se encontró en todo el tejido y en todos los estados de desarrollo, la transmisión es vía semilla, sintomático, este RNAdc no complementa con el DNA celular y el autor afirma que el RNAdc no es un producto transcrito por DNA celular, pero es un RNA replicón que puede replicarse independientemente del DNA celular, se trató de homologar con otros RNAdc de otras sp

(Cebada *Hordeum vulgare* L., Centeno *Secale cereale* L. y algas verdes *Bryopsis* sp. y *B. maxima*) sin éxito, por último este RNA dc fue detectado en dos extracciones de *Oryza rufipogon* que es un antecesor de *O. sativa* (Fukuhara et al., 1993).

En 9 diferentes cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se ha descrito un RNAdc de 14.9 Kb este se homologó con el DNA de la planta hospedera y no párese estar asociado con infecciones virales u otras anormalidades tales como la esterilidad citoplasmica masculina en haba (*Vicia faba*). Se propone que este RNAdc esta asociado con el color de la cubierta de la semilla, no se encontraron partículas virales, se reportan algunas secuencias similares de DNA-RNA añadiendo que el origen y función no son claros y de origen controversial (Wakarchuk and Hamilton 1985).

En Chile (*C. annuum*) se encontraron cinco distintos patrones de RNAdc en 13 cultivares de 14 analizados, el mas comúnmente encontrado fue de 12Kb los restantes fueron de 1 a 2 Kb los cuales no homologaron con el de 12 kb, Tampoco se encontró relación con los RNA dc de espinaca, haba y otros RNAdc de cultivares de Chile, pero si se encontró en toda la planta; en el cloroplasto se encontró una considerable cantidad de RNAdc a diferencia del núcleo, citoplasma y fracción mitocondrial que fue pequeña o nula, intentaron transmitirlo de muchas formas sin lograrlo, no se observaron partículas virales, añadiendo que el origen y función de este RNAdc es desconocido (Valverde et al , 1990).

Wakarchuk y Hamilton en 1990 caracterizaron un RNA dc de 13-15 Kb de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Este RNAdc no homologó con el DNA de otras plantas a las que no se les detectó RNAdc, con el DNA de la planta de frijol sin que hubiera homología, ni con RNAdc extraído de chile y haba, homologando en una pequeña proporción con el fragmento que da origen a los ribosomas.

En tabaco (*Nicotiana tabacum*) se descubrió RNAdc por centrifugación diferencial en núcleo, citoplasma y cloroplasto en bajas cantidades, fue resistente a ribonucleasas A y RNAsa T1 en concentraciones altas de sal, pero fue sensible a los mismos tratamientos bajo desnaturalización, se estima que de igual forma en el cloroplasto y fracción nuclear se sintetiza RNAdc ya que la centrifugación diferencial así lo mostró y el autor opina que la doble cadena de RNA puede ser resultado de la transcripción de ambas cadenas del DNA sin embargo el tratamiento con actinomicina D mostró que los niveles de RNA cs fueron completamente inhibidos por el contrario los niveles de RNAdc se incrementaron, lo cual demuestra que el RNAdc no es dependiente de DNA (Ikegami and Fraenkel 1979).

### **RNAdc de alto peso molecular asociado a (ECM) esterilidad citoplásmica masculina.**

La esterilidad citoplásmica masculina (ECM) es un rasgo que se da por la introducción de RNAdc (episoma) en el DNA de la mitocondria, se caracteriza por la pérdida de viabilidad del polen, se ha encontrado en maíz, sorgo y arroz transmitido por semilla y polen. Un estudio de microscopia electrónica detectó partículas parecidas a virus en 447 líneas con ECM en

haba (*Vicia faba*) estas plantas muestran cuerpos esféricos de alrededor de 70 nm las cuales contienen una familia de moléculas de RNA dc de  $13 \times 10^6$  Da, sin síntomas citopatológicos visibles (Grill and Garger 198; Lafebvre et al., 1990).

Turpen en 1988, aisló DNA mitocondrial de plantas de haba (*Vicia faba*) con ECM y sin él, las digirió con enzimas y el resultado encontrado fue de pocas diferencias, también aisló el RNAdc y lo hibridó con la mitocondria, el 22% fue igual. Este rasgo de esterilidad puede ser restaurado haciendo cruza con plantas fértiles, finalmente el autor afirma que no se encuentran partículas de RNAdc en plantas restauradas.

En arroz (*Oryza sativa*) se encontró un RNAdc de 18 Kb relacionado con la mitocondria y la ECM, este RNAdc fue resistente a RNAsa pancreática A en altas concentraciones de sal pero no a bajas, resistente a DNAsa y sin partículas virales asociadas. El RNAdc fue evidenciado en geles de poliacrilamida, argumentando que se pudiera tratar de una reliquia de un virus del cual el origen y función se desconocen (Yang et al., 1989).

Pfeiffer en 1993 encontró una estructura de RNAdc detectada por experimentos de hibridación asociada a la ECM de *Vicia faba*, determinó que aproximadamente 4.5 Kb de las 16.7 son una estructura subgenómica, esta inusual estrategia de replicación por mecanismo de una cadena desplazada se compara con un virus defectuoso, siendo está relacionada con el rasgo de ECM.

## **RNAdc de alto peso molecular de 0.8 a 2.5 Daltons**

Este grupo de RNAdc de peso molecular entre 0.8 a 2.5 Da pertenecientes al genoma de los virus crípticos, teniendo las siguientes características: no inducen síntomas citopatológicos visibles en el hospedero, se encuentran en plantas superiores (cuadro 1), no se transmiten por inoculación mecánica o injerto, observados en toda la planta en bajas concentraciones y tienen altos rangos de transmisión por semilla y polen (Boccardo et al., 1985), con partículas isométricas alrededor de 30nm. (Abou et al., 1985; Accotto et al 1990).

Por otro lado 11 diferentes perfiles de RNAdc (bandas patrones) se obtuvieron de 51 cultivos de *C. chinense* y *C. annuum* después de haber analizado 80, la electroforesis mostró RNAdc entre 1 y 3 Kb de con mucha variabilidad, desde una banda hasta tres a diferentes niveles, argumentando que podrían ser los genomas de virus crípticos porque estos son multisegmentados, con pesos moleculares similares en electroforesis, comentando que la variación podría indicar una mezcla de semillas para más de un cultivar, una parcial infección de la semilla parte de un virus críptico, polinización cruzada o segregación de diferentes RNAdc, encontrando genomas parentales (Valverde et al., 1991).

Recientemente un virus Críptico de *C annuum* cv. Jalapeño, fue purificado. Este virus consiste en una partícula isométrica de 30 nm, dos componentes de RNAdc 0.85 y el otro de  $0.97 \times 10^6$  Da, siendo transmitido 100% maternamente, es decir cuando el óvulo de la

planta contenía RNAdc y el polen no y 30% a través de polen cuando este contenía RNAdc y el óvulo no (Arancibia et al., 1994).

Al parecer, la reducción de la germinación de muchas plantas como sorgo, maíz y haba es debido probablemente a la presencia de RNAdc, el único medio utilizado para la detección

**Cuadro 1** Componentes de virus crípticos

Número de componentes de RNAdc	Nombre del virus Críptico	Peso Mol de RNAdc 10 <sup>6</sup> Da	Referencia
2	Alfalfa	1.27, 1.17	Bocado et al., 1983
2	Trébol brincador	1.30, 1.07, 1.22, 1.17	Bocado et al., 1983
2	Trébol rojo	1.56, 1.51	Bocado et al., 1983
2	Centeno	1.03, 0.92	Bocado et al., 1983
2	Trébol blanco	1.26, 1.03, 1.59, 1.47	Bocado et al., 1983
2	Trébol blanco temperado	1.50, 1.25, 2.6, 1.75, 1.65	Natsuaki et al., 1984
3	Alfalfa temperado	1.58, 1.55, 1.48	Natsuaki et al., 1984
3	Clavel	1.04, 0.95, 0.84	Lisa et al., 1981
3	Rábano borde amarillo	1.30, 1.25, 1.21, 1.14, 1.09	Natsuaki et al., 1983
3	Espinaca temperado	1.31, 1.21, 1.10	Natsuaki et al., 1983b
3	Vicia	1.37, 1.26, 1.21	Abou, 1985
4	Remolacha	1.45, 1.28, 0.65, 0.56	Natsuaki et al., 1983b
5	Festuca	1.32, 1.27, 1.22, 0.95, 0.90	Bocado et al., 1983

Tomado de Abou et al., 1985



Otros virus crípticos caracterizados

4	Remolacha	1.36, 1.15, 0.94,0.87	Xie et al., 1993
2	Betabel	* 1740 y 1600	Antoniw et al., 1986
1	Alfalfa	2.70	Accotto et al., 1990
2	Chile	0.85, 0.97	Arancibia 1994

- Peso molecular en pares de bases

de estos en plantas, es mediante la técnica de extracción de RNA de doble cadena, partiendo principalmente de que el RNAdc de alto peso molecular ( $0.1 \times 10^6$  Da) no es detectado normalmente en plantas sanas, la presencia de formas de RNAdc de alto peso molecular sería interpretado como indicio de la infección de un virus (Morris and Dodds; Dodds, 1983).

El aislamiento y análisis de ácido nucleico viral, permite detectar indirectamente infecciones en donde participan varios virus, variantes dentro de un mismo grupo, infecciones latentes, infecciones por virus desconocidos, virus inestables o indetectables con otras técnicas de purificación comunes, RNA satélites, RNAdc de origen desconocido, viroides que por su bajo peso molecular solo ha sido posible determinarlos por el método de purificación y aislamiento de RNAdc (Morris, 1983; Morris et al., 1983b; Dodds et al., 1984b; Valverde et al., 1990; Gallitelli et al., 1991; Montasser et al., 1991; Habili, 1993).

## MATERIALES Y METODOS.

### **Análisis electroforético de RNAdc extraído de plantas cultivadas en invernadero de 10 diferentes tipos de chiles criollos.**

En un almácigo que contenía una mezcla de agrolita y tierra negra estéril (1:2) se sembraron por separado semillas de 10 variedades de *C. annum* (cuadro 2) adquiridas en el mercado de la central de abastos de la Ciudad de México. Se seleccionaron plántulas con una altura de tres a cuatro cm, una vez obtenidas las plántulas se transfirieron a vasos de unicel de un L de capacidad (una planta por vaso), fertilizándolas cada tercer día hasta que alcanzaron una altura de 45 cm. De todas las plántulas tranferidas se seleccionaron solo 3 de cada tipo de *C annum* para realizar la purificación y electroforesis del RNAdc.

Cuadro 2, Diferentes materiales criollos sembrados en invernadero

---

1.- Árbol	4.- Guajillo	7.- Piquin
2.- Catarina	5.- Ancho	8.- Serrano
3.- Cascabel	6.- Pinguica	9.- Árbol japonés
		10.-Árbol picante

---

En algunos casos dado que no se detectó RNAdc se decidió tomar otra plántula de la misma variedad hasta obtener RNAdc. Este procedimiento fue completamente al azar (cuadro3).

Cuadro No 3 Deteccion de RNAdc en variedades de *C. annuum*.

Variedad	Con RNAdc	Plantas probadas	Sin RNAdc
Árbol	3	5	2
Ancho	3	3	0
Pinguica	3	4	1
Catarina	3	6	3
Piquin	3	3	0
Cascabel	3	4	1
Serrano	3	4	1
Guajillo	3	4	1
Árbol japonés	3	5	2
Árbol picante	3	4	1

#### **Análisis electroforético de RNAdc extraído de plantas colectadas en campo**

Con el objeto de comparar con las plantas de Chile cultivadas en invernadero se colectaron 21 plantas de Chile en cultivos de parcelas comerciales de los estados de Puebla, Hidalgo y Tlaxcala, durante 1998. Se seleccionaron individuos con síntomas de probable origen viral y sin ellos, las plantas pertenecen a diferentes tipos o variedades criollas de cada región, las cuales son conocidas con diferentes nombres, pero todas pertenecen al género y especie *C. annuum* (Cuadro 4). Las plantas colectadas se empacaron y etiquetaron en bolsas de plástico, se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para realizar posteriormente la extracción y electroforesis de RNAdc.

Cuadro 4, Total de las muestras (*C. annuum*) colectadas en 3 diferentes estados del centro de la republica

Nombre local	Lugar de procedencia	Nombre local	Lugar de procedencia
1.- Parabólica	Actopan Hidalgo	12.- Poblano	Atlixco Puebla
2.- Serrano	Actopan Hidalgo	13.- Jalapeño	Atlixco Puebla
3.- Serrano	Actopan Hidalgo	14.- Jalapeño	Atlixco Puebla
4.- Serrano	Actopan Hidalgo	15.- Jalapeño	Atlixco Puebla
5.- Parabólica	Acato pan Hidalgo	16.- Poblano	Sn Baltasar Tlaxcala
6.- Serrano	Actopan Hidalgo	17.- Poblano	Sn Baltasar Tlaxcala
7.- Guajillo	Tecamachalco Puebla	18.- Loco	Sn Baltasar Tlaxcala
8.- Guajillo	Tecamachalco Puebla	19.- Poblano	Sn Baltasar Tlaxcala
9.- Poblano	Sn Martín Tex. Puebla	20.- Loco	Sn Baltasar Tlaxcala
10.- Poblano	Sn Martín Tex. Puebla	21.- Poblano	Sn Mateo Tlaxcala
11.- Poblano	Atlixco Puebla		

### Purificación de RNAdc para tejidos de plantas.

La extracción de RNAdc se realizó macerando 3.5 g de material vegetal en un mortero con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. El tejido macerado fue transferido a un tubo de centrifuga de 50 ml y se agregó 8.0 ml de STE 1X (NaCl 0.1 M, Tris 0.05 M, EDTA 0.001M, pH 6.8), más 0.5 ml de una suspensión de bentonita al 2% p/v y finalmente 1 ml de SDS 10% más 9 mL de fenol preequilibrado con STE 1X. El tubo bien tapado se agitó por 30 min, después se centrifugó a 8000 g por 15 min Se recuperaron 10 ml de la fase acuosa superior y se le adicionaron 2.1 ml de etanol al 95%. La mezcla fue almacenada a 4 °C durante 12 h.

Se llevaron a cabo dos ciclos de cromatografía en columnas de celulosa (CF-11) para eliminar todo el RNACs, DNA, polisacaridos y proteínas contaminantes. Las columnas de

celulosa se prepararon con 1gr de celulosa CF-11 suspendida en 25 ml de STE 1x- etanol 16% (v/v) fue vertida en una columna hecha con un tubo de jeringa de plástico de 20 ml taponada con papel filtro, permitiendo el drenado de todo el líquido. La muestra se adicionó a la columna y una vez que se drenó el líquido se realizaron dos lavados con 40 mL de STE 1x -etanol 16 %. Después se agregaron 2.5 mL de STE 1x a la columna y se permitió su elusión. Finalmente se adicionaron 10 ml de STE 1x y se colectaron en un tubo de centrifuga de 50 ml, agregando 2.1 ml de etanol 96%.

El segundo ciclo de cromatografía se realizó de igual forma que el anterior y al final se agregaron y colectaron 6 ml de amortiguador STE 1X. El eluido fue precipitado con 0.5 ml de Acetato de sodio 3M y 20 ml de etanol frío al 96% y se almacenó durante 12 h a 20 °C.

Las muestras con etanol y Acetato de sodio fueron centrifugadas a 8000 g por 25 min. El etanol se desechó y el tubo se colocó sobre papel secante en forma invertida durante 20 min. El RNAdc fue resuspendido en 200 µl de agua bidestilada-desionizada para su posterior utilización en la electroforesis (Valverde et al. 1990).

### **Electroforesis.**

La electroforesis se llevo a cabo en geles (1mm x 7cm x 8 cm.) de poliacrilamida al 6%, usando en una minicámara miniproten de BioRad, a cada pozo del carril se le agregaron 30 µL de la muestra mas 10µL de EG(bofer de carga de la muestra) el tiempo estimado de corrida fue de 2.5 hr a 100 volts. Se utilizó como marcador de peso molecular al virus

mosaico del pepino (CMV) con 2.3, 2.0, 1.4, y 0.5 KDa. Las enzimas RNAsa pancreatica bovina y DNAsa I (Sigma) fueron utilizadas a una concentración de 0.1 µg por µl. Se agregó 1µl de enzima por cada 40µl de muestra, permaneciendo en incubación a temperatura ambiente durante 24 hrs para el posterior corrimiento en gel y observar si se trata de RNA o DNA (Libonatti et al., 1980).

### **Tinción de geles**

El gel se mantuvo por 20 min en agitación con una mezcla de 10% de alcohol etílico y 2% de ácido acético, posteriormente se lavo tres veces con agua estéril. La tinción se llevó a cabo con una solución de nitrato de plata al 0.011M, dejando el gel 20 min en agitación suave, nuevamente se lavo el gel con agua estéril tres veces, para luego revelarlo con una solución que contenía 3% de hidróxido de sodio y 2% de formaldehído, se agregó al gel hasta que las bandas tuvieron la intensidad deseada. Para detener la reacción solo se agregó agua y se lavó el gel por tres veces con agua, para tomarle las fotografías o digitalizar las imágenes.

### **Montaje de geles**

El gel se puso a deshidratar con papel celofán, colocándolo en un marco y sobre un restirador por 48 hr a temperatura ambiente para conservarlo permanentemente.

El peso molecular de las bandas se obtuvo por medio de un digitalizador de imágenes Alpha Innotech Corporation Modelo TM-20 U.S.A. y el software Alpha Imager Versión 2000.

## RESULTADOS

El tratamiento con las enzimas RNAasa y DNAasa, de los extractos de ácido nucleico obtenido de las distintas muestras de Chile analizadas en el presente trabajo, demostró la presencia de alguna clase de RNAdc y no de DNA, como se puede observar en la Figura 1. En el carril D se muestra el tratamiento con RNAasa donde se observa un barrido, en el carril A tenemos CMV como marcador, en el carril B una muestra extraída de *Capsicum annum* sin ningún tratamiento enzimático (testigo), en el carril C tenemos la misma muestra de RNAdc que en el carril B más la enzima DNAsa la cual no presentó ninguna modificación, en el carril E se incluye DNA producto de PCR sin tratamiento alguno, en el carril F tenemos DNA (mismo que el carril E) producto de PCR más la enzima DNAsa que se utilizó en el carril C demostrando que la enzima DNAsa estaba activa y por último nuevamente CMV como marcador. Demostrando así que en el carril D la muestra fue digerida en su totalidad por la enzima RNAsa pancreática bovina.

La extracción y el análisis electroforético de ácidos nucleicos procedente de muestras de diferentes tipos criollos de *C. annum* de materiales cultivados en invernadero, así como cultivados en parcelas comerciales de los estados de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, permitió la detección de RNAdc de alto peso molecular.



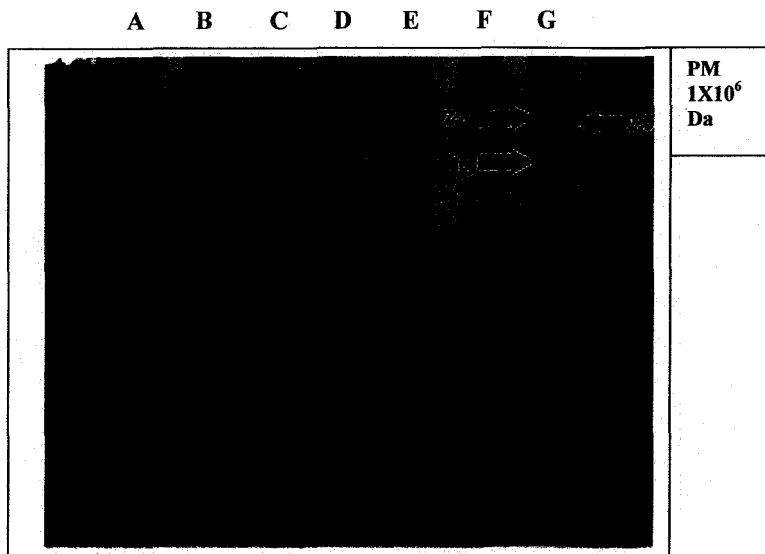


Figura 1.- Tratamientos con enzimas. Carril A y G marcador CMV, carril B RNAdc de Chile sin tratamiento, carril C muestra anterior con DNAsa, carril D muestra anterior con RNAsa, E producto de PCR, F producto de PCR anterior mas DNAsa utilizada en carril B.

### Resultados del análisis electroforético de muestras cultivadas en invernadero.

Del total de 42 plantas que pertenecen a diez variedades de Chile analizadas, solo 30 plantas se les encontraron perfiles electroforéticos y en 12 no.

Los RNAdc visualizados electroforéticamente en los geles de poliacrilamida provenientes de la extracción de plantas de Chile cultivados en invernadero, permitieron detectar diferentes números de bandas o perfiles electroforéticos. Considerando el gran número de perfiles electroforéticos encontrados y que varios de ellos eran semejantes, fueron reclasificados

como "Tipos", de acuerdo al número de bandas, por ejemplo: Perfil Tipo "a", cuando aparecía una sola banda, de tipo "b" para dos bandas, para el perfil "c" con tres bandas y así sucesivamente. Sin embargo también, en algunos casos se encontraron perfiles con el mismo número de bandas, pero con distinto peso molecular, los cuales se clasificaron con la letra a, b, c, etc para indicar el número de bandas, pero cuando hubo variedad en los pesos moleculares se les agregó un número romano ejemplo: a-I, a-II, a-III, etc y así para todos los subtipos de perfiles (cuadro 5).

Los perfiles electroforéticos de RNAdc de las muestras cultivadas en invernadero se pueden ejemplificar en la figura 2 observándose en el carril A perfil de tipo (g), en el carril B perfil de tipo (f), en el carril C perfil (d), en el carril D perfil de tipo (e), carriles E y F perfiles de tipo (e), carril H perfil de tipo (d), carril I marcador CMV y finalmente en el carril J perfil de tipo (b).

En esta figura se observa que la diferencia entre el carril F y C, es la banda superior del carril C que constantemente apareció en algunas muestras, abriendo la posibilidad que sea una mezcla de perfiles. También se puede observar en el carril H que aparecen cuatro bandas de RNAdc, dos más intensas que las superiores, indicándonos la posibilidad de que puedan existir combinaciones, ya que un par de bandas se expresan más que las otras, pudiéndose tratar de una copia defectuosa, una copia más larga o dos RNAdc de diferente especie, finalmente apreciamos en el carril A más de ocho bandas que pertenecería a un perfil de tipo

(g), como ya se mencionó en donde se presume que pudieran existir combinaciones de otros virus, incluso RNAdc satélites, copias defectuosas de otros RNAdc (Abou et al 1995).

A B C D E F G H I J

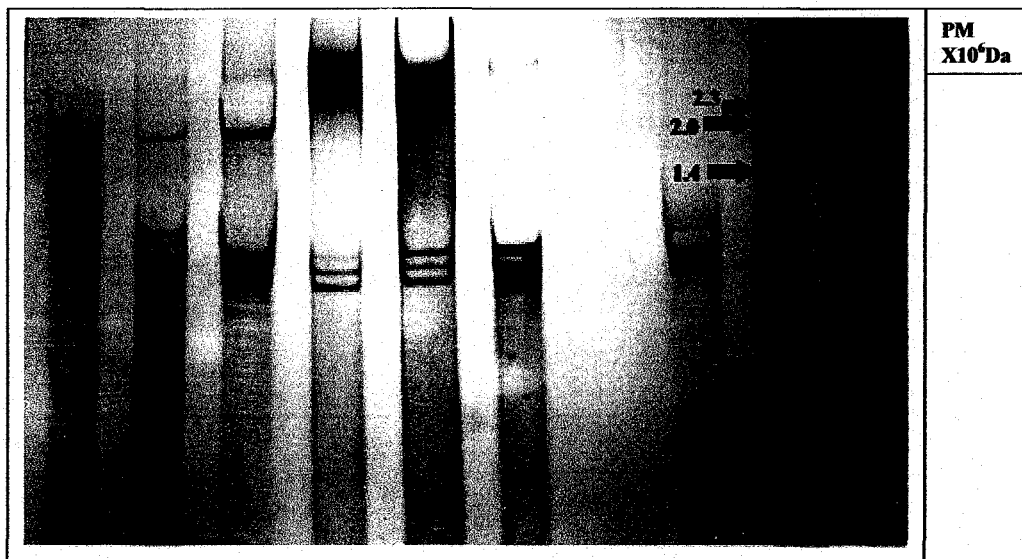


Figura No 2.- Diversos perfiles encontrados en Chile (*Capsicum annuum*) en muestras de invernadero., Pesos moleculares  $\times 10^6$  Daltons, Carril A perfil (g), carril B perfil (f), carril C perfil (d), carril D perfil (c) con RNAdc de alto peso molecular, carriles E y F perfil (c), carril H perfil (d) o posible combinación 2 (b) y carril I marcador CMV.

Entre variedades de Chile se encontraron diferentes perfiles electroforéticos de RNAdc de alto peso molecular, incluso dentro de una misma variedad se encontraron diferencias entre perfiles electroforéticos y pesos moleculares (cuadro 5).

Cuadro 5, Resultados de invernadero, *C. annum* sembrados en invernadero durante la primavera de 1999.

Nombre del Organismo	Pesos moleculares encontrados en muestras de invernadero (Todos $1 \times 10^6$ Daltons)						Tipo de perfil	Subtipo
Árbol	2.179	0.9228					b	I
Árbol	0.6479	0.6006	0.3779				c	I
Árbol	0.92	0.85	0.79				c	II
Catarina	0.9385	0.8202	0.7863				c	III
Catarina	1.99	1.17	1.074	0.872			d	I
Catarina	2.198	1.057	0.724				c	IV
Cascabel	2.174	1.054	0.9124				c	V
Cascabel	2.403	0.9974	0.844				c	VI
Cascabel	1.115	0.9754	0.844	0.0395			d	II
Guajillo	1.149	0.9971					b	II
Guajillo	2.729	1.274					b	III
Guajillo	2.508	1.579	0.872				c	VII
Ancho	2.505	1.083	0.886	0.7781			d	III
Ancho	2.124	0.8773	0.7863				c	VIII
Ancho	0.7413	0.637					b	IV
Pinguica	2.657	1.977	0.955	0.6872	0.5905		e	I
Pinguica	0.9434	0.7808					b	V
Pinguica	0.6892	0.6589	0.5204				c	IX
Piquin	0.8538						a	I
Piquin	2.75	0.92	0.83	0.79			d	IV
Piquin	2.772	2.527	1.776				c	X
Serrano	2.16	1.92	1.08	1.02	0.91	0.89-0.80	g	I
Serrano	0.94	0.86	0.78				c	XI
Serrano	2.723	1.9772	0.433				c	XII
Árbol japonés	0.9399	0.8061					b	VI
Árbol japonés	0.8061	0.6996					b	VII
Árbol japonés	0.9742	0.7274	0.672				c	XIII
Árbol picante	2.75	0.94	0.86	0.79			d	V
Árbol picante	1.14	1.05	0.93	0.84			d	VI
Árbol picante	2.079	0.844	0.7636				c	XIV

Las variedades de chiles que se sembraron en invernadero tenían una apariencia normal, es decir no presentaron síntomas con los que se sospechara de la existencia de alguna infección por virus. Así también los frutos que se obtuvieron del cultivo en invernadero no presentaron evidencias del algún tipo de enfermedad. Como se muestra en la figura 3

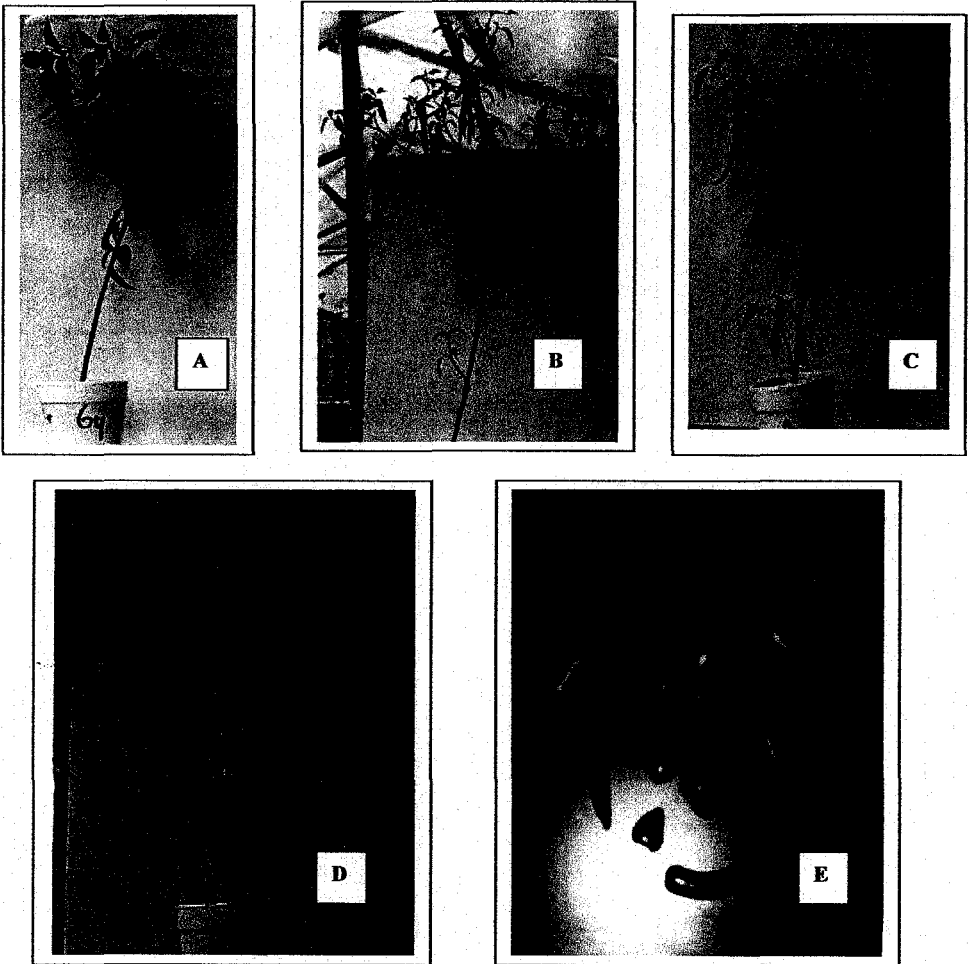


Figura 3. Plantas y frutos de chile. A chile ancho, B arbol picante, C chile serrano, D chile cascabel y E frutos obtenidos.

### Resultados del análisis electroforético de RNAdc en muestras colectada en campo.

Se seleccionaron 21 muestras de *C. annuum* en parcelas comerciales de diferentes estados de la republica (cuadro 4), algunos presentaban indicios de infecciones por virus y otros no figura

4.

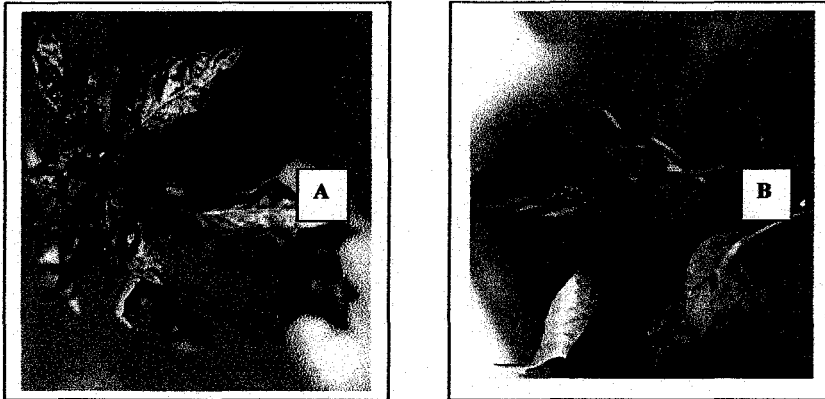


Figura 4 Plantas colectadas en campo de *C. annuum* con diferentes síntomas. A Clorosis y deformación de hojas, B marchitamiento.

De las muestras colectadas en campo, se purificó el RNAdc de alto peso molecular y los perfiles electroforéticos que se observaron se muestran en la figura 5. Carril A perfil de tipo (b), carril C perfil (e), carril D perfil (a), carril E marcador CMV, carril G perfil (f), carril H perfil (e) y carril J perfil (b). En una mezcla experimental los carriles A y J se sometieron a electroforesis en las mismas condiciones y dieron origen a un perfil de cuatro bandas sin que hubiera alteración en los pesos moleculares (dato no mostrado).

A B C D E F G H I J

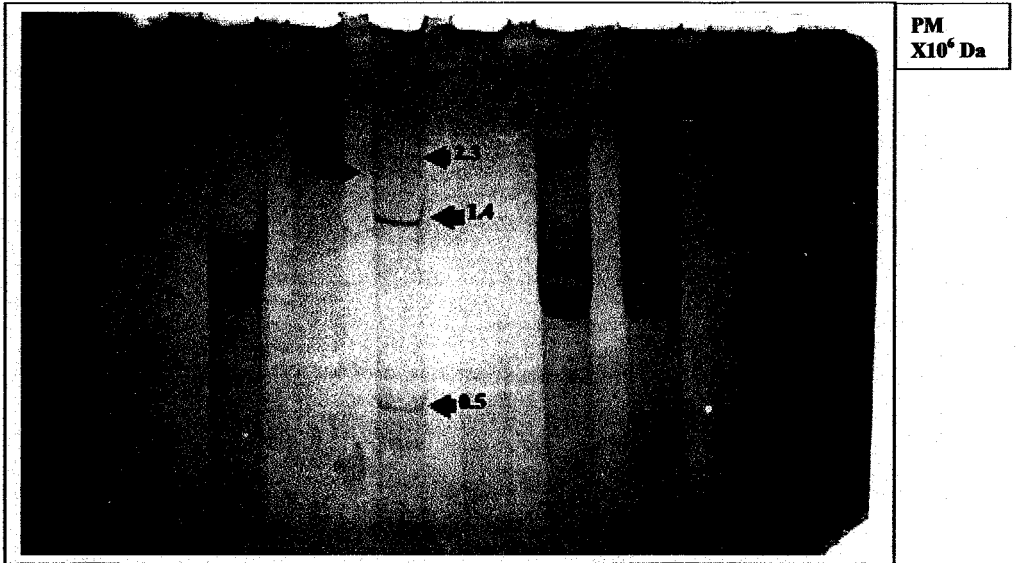


Figura No 5. Diferentes perfiles obtenidos de muestras de chile (*Capsicum annuum*) en campo. Carril A Perfil (b), carril C Perfil (e), carril D Perfil (a), carril E Marcador CMV, carril G Perfil (f), carril H Perfil (e) y J Perfil (b).

Otros perfiles electroforeticos de RNAdc encontrados en muestras de colectadas en campo se pueden observar en la figura No 6, Carril A perfil de tipo (c), Carril J marcador, carril B perfil de tipo (a), carril D perfil de tipo (d), carril E perfil de tipo (a), carril F perfil de tipo (b) carril G perfil tipo(c), carril H perfil de tipo (e). Se puede observar que si mezcláramos el carril E y F se formaría el carril G o bien la combinación del carril A y B se formaría el carril D. Por lo que no se descarta la posibilidad de que pudieran haber mezclas de perfiles de RNAdc.

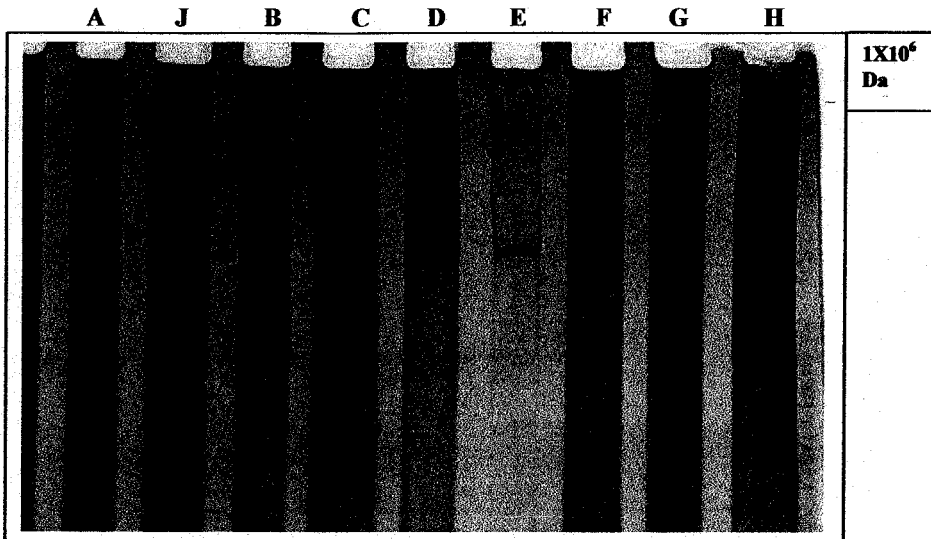


Figura No 6.- Diferentes perfiles electroforéticos encontrados en muestras seleccionadas de Chile (*Capsicum annuum*) en campo. Carril A Perfil (c), J Marcador, B Perfil (a), D Perfil (d), E Perfil (a), F Perfil (b), G Perfil (c), H Perfil (e).

Con el perfil que se le designó arbitrariamente, según número de bandas encontradas se trató de relacionar síntomas de las plantas de Chile, con el perfil electroforético de RNAdc, sin que fuera posible encontrar relación, ya que para cada síntoma no se encontró un perfil constante. En este mismo sentido las plantas aparentemente sanas colectadas en campo presentaron perfiles electroforéticos también no constantes.



Cuadro No 6. Nombre comun de los organismos recolectados en campo, pesos moleculares encontrados por electroforesis y el perfil que presentaron.

Nombre del organismo	Pesos moleculares $1 \times 10^6$ Daltons						Perfil de tipo	Subtipos
Parabólica	2.657	1.101	1.026				c	I
Serrano	2.18	1.20	1.11	1.01	0.94	0.87	f	I
Serrano	1.78	1.01	0.92				c	II
Serrano	2.228	1.171	1.017	0.9152			d	I
Parabólica	0.85	0.93					b	I
Serrano	0.98	0.87					b	II
Guajillo	2.752	0.9734	0.8307				c	III
Guajillo	2.85						a	I
Poblano	1.67	0.97	0.91	0.84			d	II
Poblano	2.103	1.143	1.086	1.0	0.9504	0.8891	f	II
Poblano	2.26	1.068	0.9917	0.9058			d	III
Poblano	1.00	0.94	0.85				c	IV
Jalapeño	2.23	0.93					b	III
Jalapeño	1.26	1.30	1.23	1.11	1.02	0.95	f	III
Jalapeño	2.773						a	II
Poblano	2.022	1.141	0.9233	0.7949			d	IV
Poblano	1.05						a	III
Loco	2.87	1.025	0.8764				d	V
Poblano	2.18	1.85	1.09	0.93	0.86		e	I
Loco	2.049	1.131	1.058	0.9263	0.8534		e	II
Poblano	2.75						a	IV

Comparando los perfiles electroforéticos de la totalidad de las muestras se aprecia que no hubo diferencias entre plantas cultivadas en invernadero y las cultivadas en campo con y sin síntomas. En todos estos perfiles se forman tres grupos distribuidos horizontalmente: uno en donde los pesos moleculares se encuentran alrededor de  $1 \times 10^6$  Daltons, y otro grupo donde el rango varía de 1.5 a  $2.0 \times 10^6$  Da y el tercero que va de 2.5 a  $3 \times 10^6$  Da (Figura 9).

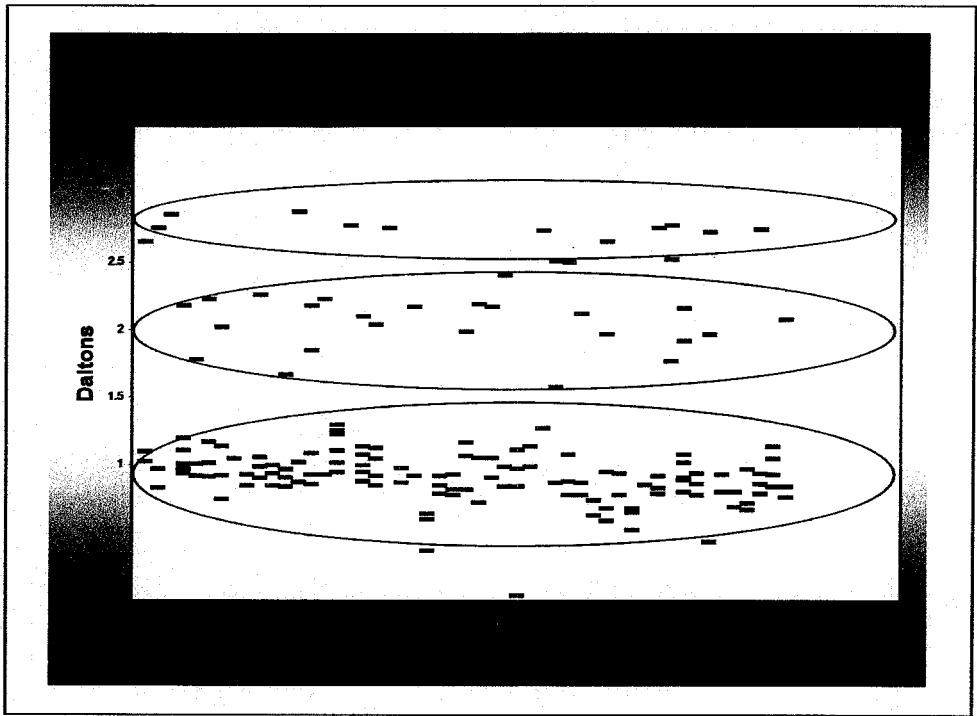


Figura 9. Pesos moleculares del total de las muestras. Cada línea corresponde el peso molecular de cada una de las bandas encontradas en muestras de campo e invernadero. En donde se pueden apreciar tres grupos, uno alrededor de  $1 \times 10^6$  Da y el otro menos compacto de 1.5 a  $2.5 \times 10^6$  Da, y el tercero de 2.5 a  $3 \times 10^6$  Da

A la figura 9 se le agregaron líneas transversales para observar mejor el parecido de cada una de las bandas en cuanto a peso molecular, observándose que una gran cantidad se encuentra al mismo nivel o muy cercanas, incluso los puntos remarcados indican que algunos pesos moleculares se sobrepone, aunque los perfiles completos no lo hagan, lo cual podría

indicar que están muy relacionadas. Los pesos moleculares aquí representados, se encuentran mas ampliamente descritos en los cuadros 4 y 5 (Figura 10).

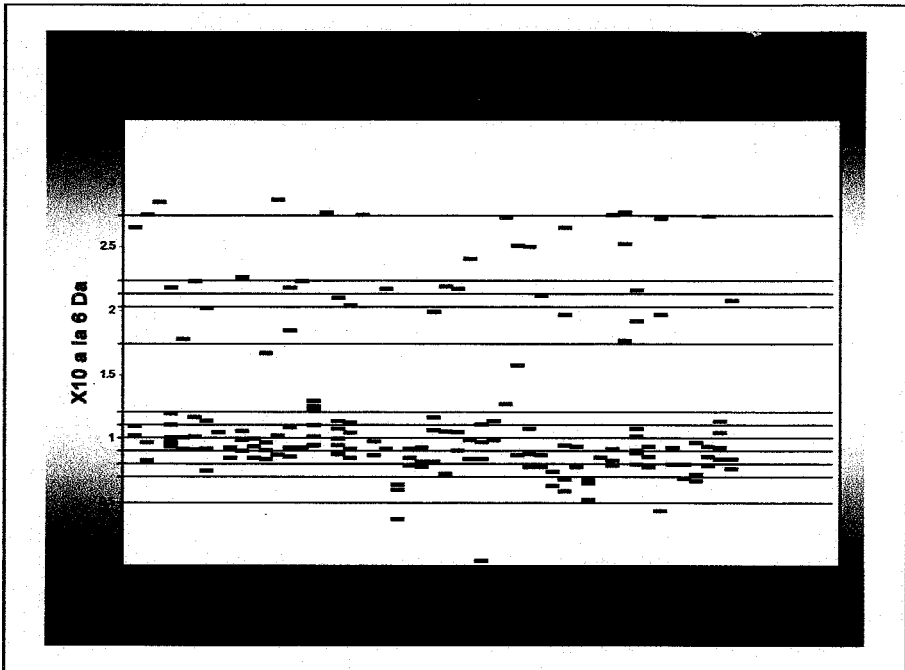


Figura 10. Similitud en cuanto a pesos moleculares de RNAdc encontrados en plantas de chile (*Capsicum annuum*)

## DISCUSIÓN

La frecuente aparición de RNAdc en muestras de Chile, y la incógnita de que estos RNAdc no son parecidos a los virus de RNA conocidos, motivó la realización de este trabajo, en el cual fue muy frecuente encontrar RNAdc formando patrones electroforéticos en variedades de Chile (*C. annuum*) de plantas cultivadas en invernadero y en plantas cultivadas en campo.

Se observaron perfiles de una hasta ocho bandas, encontrando que algunos de ellos podían ser mezclas y formar un perfil a partir de otros. Por otro lado ningún perfil fue igual, lo que indica que existe una variación fuerte entre estos elementos de RNAdc. Sin embargo existen bandas con pesos moleculares muy parecidos, pero con perfiles diferentes.

En cuanto a los grupos formados horizontalmente por los RNAdc encontrados en plantas de Chile de peso molecular entre de 2.5 a  $3 \times 10^6$  Da podría tratarse de RNAdc de origen celular perteneciente a las funciones que desempeña la célula o del RNAdc que se ha encontrado en arroz, frijol y haba que en el caso de frijol únicamente híbrida con el DNA celular y que no está relacionado con la ECM como lo indican Fukuhara et al., 1993; Wakarchuk and Hamilton 1985, 1990; Valverde et al., 1990; Ikagami and Fraenkel-Conrat 1979. También, este mismo grupo se puede relacionar con aquel RNAdc encontrado en haba y arroz que está íntimamente relacionado con la esterilidad masculina. (Grill and Garger, 1981; Lafebvre et al., 1990; Yang et al., 1989).



U.N.A.M. CAMPUS  
IZTACALA

El segundo grupo formado por los pesos moleculares de los RNAdc de *C. annuum* que van de  $1.5$  a  $2.5 \times 10^6$  Da, solo se tiene como referencia que Pfaffner en 1993 encontró una estructura subgenómica que pertenecía a un RNAdc de mayor peso molecular en haba que estaba relacionado con la esterilidad masculina en haba, estos elementos en Chile no han sido descritos.

El tercer y último grupo que es el más abundante, que se encuentra en el intervalo de pesos moleculares de  $0.5$  a  $1.5 \times 10^6$  Da y que se cree que pertenece a un grupo de virus llamado Crípticos por que el genoma de estos también se encuentran en este mismo rango, además de ser multisegmentados. No se han encontrado asociados a otro tipo de RNAdc de mayor peso molecular se han encontrado en otras especies como; Alfalfa, trébol, centeno, clavel, rabano, espinaca, haba y uno descrito por Arancibia en 1994 en Chile. Los cuales varían entre  $0.8 \times 10^6$  Da en clavel y  $2.70 \times 10^6$  Da en alfalfa. (Abuo et al., 1985; Xie et al., 1993; Antoniwi et al 1986; Accotto et al., 1990).

Respecto al grupo anterior en 1991 Valverde y Fantenot realizaron una investigación en E.U.A. en 80 cultivares donde se involucraron tres especies de *C. capsicum* encontrando perfiles de uno, dos, y tres bandas máximo en donde el autor menciona que estos RNAdc pudieran ser los genomas de virus crípticos o RNAdc de origen y función desconocida. Comparando los resultados de esta tesis de investigación en donde solo se analizó una especie

*C. annuum* se encontraron hasta ocho bandas observándose más diversidad de perfiles de RNAdc, además de formar perfiles electroforéticos con RNAdc de mayor peso molecular.

En muestras de campo correspondientes a la zona centro de México (Tlaxcala, Hidalgo y Puebla) fue muy frecuente encontrar perfiles electroforéticos parecidos a los de invernadero. Sin embargo las plantas cultivadas en invernadero presentaron patrones electroforéticos con un mayor número de bandas correspondientes a RNAdc, esta variación podría deberse a que el origen de semillas provino de diferentes zonas agrícolas de México.

Por otro lado se descarta la posibilidad de que estos RNAdc fueran RNA-mensajero, ribosomal o de transferencia, si fuera de esa manera aparecerían invariablemente bandas a un mismo nivel en todas las muestras, por otro lado obtener RNA de este origen y por este método es complicado ya que son muy sensibles a la degradación (Lewin, 1994).

Las plantas de campo que se colectaron con síntomas de indicios de virus presentaron perfiles electroforéticos parecidos a las muestras de campo que no tenían síntomas en estas últimas se encontraron perfiles electroforéticos de RNAdc, lo que indicaría que los RNAdc podrían no ser los responsables de tales síntomas. éstos síntomas pueden ser originados por diferentes factores como: un virus de DNA, por algunas deficiencias en los nutrientes, infecciones bacterianas, o aspectos a nivel ecológico como clima, altura, factores edáficos etc. (Velasco, 1999; Chavez, 1994 ; Perez, 1985; Agrios, 1995; Garzón 1987).

El tamaño de la matriz del gel utilizado en este estudio solo permitió ver determinado rango de RNAdc, posiblemente algunos RNAdc vistos en este trabajo pudieran ser un segmento subgenómico de otros de mayor tamaño (Duliue et al., 1988; Pfeiffer et al., 1993; Grill and Garger, 1981; Yang et al., 1989), aunque Abou et al., 1985 indica que en líneas mantenidas con ECM de Haba (*Vicia faba*) no se encontraron partículas RNA dc perteneciente a virus crípticos.

Los RNAdc encontrados en Chile parecen ser similares a otros descubiertos en otras especies de cultivos económicamente importantes. Los estudios propuestos en perspectivas de este trabajo podrían servir para reunir más información sobre la fisiología de las moléculas de RNAdc encontradas en Chile y México.

## CONCLUSIONES:

Fue común encontrar perfiles de RNAdc de una hasta ocho bandas en geles de poliacrilamida extraídas de *C. annuum* en muestras de campo y de plantas cultivadas en invernadero, provenientes de materiales criollos de México.

Se observaron diferentes patrones de RNAdc y en algunos casos se observó la posible mezcla de varios de ellos.

Se encontraron tres grupos de RNAdc en plantas de Chile (*C. annuum*) de los cuales el origen y función son desconocidos.

No se encontró ninguna relación entre síntomas de plantas de *C. annuum* provenientes de campo y los perfiles obtenidos de RNAdc, así como tampoco se encontraron perfiles electroforéticos de virus conocidos.

En México se encontraron perfiles electroforéticos más diversos que los encontrados en E.U.A.



## **PERSPECTIVAS:**

Se trataría de analizar para *C. annuum* RNAdc de alto peso molecular de 12 a 18 Kb con las técnicas que han utilizado Yang et al., 1989; Grill and Garger 1981. Para investigar si existen RNAdc de alto peso molecular mayor que el que se observó en este trabajo.

Separar organelos por centrifugación diferencial y probar si estos contienen algún RNAdc. Para saber si están asociados con los diferentes organelos o al citoplasma y núcleo.

En caso de contener RNAdc hacer sondas para DNA celular.

Para los RNAdc encontrados en este trabajo faltaría por hacer:

Inoculación mecánica, inoculación por injerto y por insecto.

Microscopia electrónica para ver si existen capsides.

Mantener una línea con un solo perfil de RNAdc y hacer cruces con otras que no contengan, para tratar de transmitir el polen con estos elementos genéticos o con óvulos que contengan y contabilizar un porcentaje de transmisión por las dos vías.

Revisar si toda la planta contiene RNAdc, en raíz, tallo, hojas y frutos.

Hacer clonación, posteriormente secuenciación y comparar en un banco de genes.

Para saber si es uno o una combinación de estos elementos genéticos se podría hacer una prueba de ELISA para ver si existen otros virus como el virus mosaico de la alfalfa (AMV), virus mosaico del tabaco (TMV) o virus mosaico del pepino (CMV), los cuales se transmiten por semilla.

En caso de que no den positivo para ELISA hacerlo por el método de secuenciación para ver si es uno o una combinación de RNAdc.

## BIBLIOGRAFIA:

Abou A.M. Jones A.T. and Mayo M.A. (1985) Detection of dsRNA in particles of *Vicia faba* tissue and protoplast. Journal of General Virology 66: 2453-2460.

Agrios N.G. (1995) Fitopatología, Uthea. 2 ed. Editores Noriega p.838.

Antoniw J.F, Linthorst H.J, White R.F, Bol J.F.(1993). Molecular Cloning of the double-stranded RNA of Beet Cryptic Viruses. J. gen. Virol. 67,2047-2051.

Arancibia R.A., Valverde R.A. and Can F. (1994) Properties of a cryptic virus from pepper (*Capsicum annum*). Plant Pathology 43:000-000 paper 270.

Chávez A.J. (1994) Control integrado de la marchites del chile (*Capsicum annum*) Ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* L. en la región del valsequillo Pue. Tesis de Maestría, Colegio de postgraduados, Texcoco Mex.

Corona T.T. (2000) Diversidad morfológica, isoenzimática y de contenido de ADN nuclear en chile (*Capsicum annum* L. Y C. *Chinense* Jacq) de México, Tesis de doctorado, Colegio de postgraduados, Texcoco, Mex

Dodds J.M., Jordan J.A., Heick and Tamaki S.J.(1984b) Double-stranded RNA of diagnosis of citrus and avocado viruses. Rprinted from Proceedings of Ninth IOCV Conference 1984.

Dulieu P., Penin F., Dulieu H. and Gautheron D.C. (1998) Purification of virus-like particles from male sterile *Vicia faba* and detection by elisa in crude leaf extracts. Plant Science. 56:9-14

Elliston J. E. (1985) Characteristic of dsRNA-free y dsRNA containing strain of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. Phytopathology. 75,151-158

Fuentes C.C. (1995) Evaluación de daño en chile (*Capsicum annum* L.) y la gama de hospedantes de *Meloidodera mexicana* cid del prado. Tesis de maestría, Colegio de postgraduados, Texcoco Mex.

Fukuhara T., Moriyama H., Yong Pak J., Hyakulake H. and Nitta T. (1993) Enigmatic double-stranded RNA in japonica rice. Plant Molecular Biology 21:1121-1130.

Gallitelli D., Voulas C., Martelli A., Montasser M. S., Tousignant M.E. and Keper J.M. (1991) Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus:II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant Disease* 75: 93-95.

Garzon T. J. (1987) *Temas en virología II*, sociedad mexicana de fitopatología.

Grill K.L. and Garger S.J. (1981) Identification and characterization of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proceeding of National Academy of Science* 78:11, 7043-7046.

Habili N. (1993) Detection of Australian field isolated of citrus tristeza virus by double stranded-RNA analysis. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 138: 308-316.

Higuera C. P. (1979) Fenología de la floración en tres tipos de chile ancho, mulato y pasilla (*Capsicum annuum*) subespecie *grossum* y *longum*, bajo condiciones de invernadero, Tesis ITESM unidad Querétaro.

Ikagemi M. and Conratt F. (1979) Characterization of double-stranded ribonucleic acid in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Science* 76:8:3637-3640.

Laborde J.A. (1984) Presente y pasado del chile en México. Folleto de investigación. S.A.R.H. 8-77

Lafebvre A., Scalla R. and Pfeiffer P. (1990) The double-stranded RNA associated with the 447 cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* is packaged together with its replicase in the cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Molecular Biology*. 14:477-490.

Lewin B. (1994) *Genes IV.*, Oxford University Press, U.S.A. pp.1272

Libonati M., Carsana A. and Furia A. (1980) Double-stranded RNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 31:147-164

Lozaya S. H. (1993) Bases fisiológicas en la eliminación de virus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 11:19-23.

López T.M. (1996) Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones de campo de adultos del barrenillo del picudo del chile *Anthomus eugeni Cano* (Coleoptera:Curculianidae) procedentes de San Luis Potosí, México, Tesis de maestría, Colegio de postgraduados, Texcoco Mex.

Montasser M.S. Tousignant M.E. and Kaper J.M. (1991) Satellite-Mediated Protection of tomato against cucumber mosaic virus: I greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Disease* 75: 86-92

Monsalvo R.A. (2002) Diagnóstico de infecciones virales en diversos cultivos por análisis electroforético de ARN de doble cadena, Tesis de Licenciatura, F.E.S. Iztacala, U.N.A.M.

Mora A.G. (1991) Epidemiología de un complejo viral de Chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de maestría, Colegio de postgraduados, Texcoco, Méx.

Morris T.J. (1983) Virus-specific double-stranded RNA: Functional role in the RNA virus infection plant agents. *Current communications in molecular biology*. Cold Spring Harbor Lab. 1983. p 80-83

Morris T. J., Dodds A J., Hillman B., Jordan R. L. Lommel A. S. and Tamaki S. J. (1983b) Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification, *Plant Molecular Biology* 44, 27-30.

Morris T.J. and Dodds J.A. (1979) Isolation and analysis of double stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.

Pfeiffer P., Jung J.L., Heitzler J. and Keith G. (1993) Unusual structure of the double-stranded RNA associated with the "447" cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* *Journal General Virology*. 74:1167-1173.

Pozo C.O. (1983) Logros y aportaciones de la investigación agrícola en el cultivo de Chile. Boletín informativo. S.A.R.H. y I.N.I.A., Publicación 99.

Pontis A. T. (1997) Fitopatología, Curso moderno III, editorial hemisferio sur. pp.158-187.

Pérez M. L. (1985) Herencia de la resistencia a la marchitez causada por tres cepas y su mezcla de hongos *Phytophthora capsici* Leo. En cuatro materiales de Chile *Capsicum annuum* L., tesis de maestría, colegio de postgraduados, Montesilló Texcoco Mex.

Rocha P.A. (1987) Aspectos ecológicos en la disseminación de enfermedades virales. Folletos de investigación. I.N.I.A., C.I.A.G. Norte, Campo Agrario Experimental General Teran.

Redondo J.E. (1986) Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici* L. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Texcoco Mex.

Turpen T., Garger S.J. and Grill K.L. (1988) On the mechanism of cytoplasmic male sterility in the 447 line of *Vicia faba*. Plant Molecular Biology. 10:489-497.

Valverde R.A. Nameth S., Abdallah O., Musa A.O. Desjardins P., Dodds A. (1990) Indigenous Double-stranded RNA from papaya (*Capsicum annuum*. Plant Science 67:195-201.

Valverde R.A., Fontenot J. F. (1991) Variation in double-stranded Ribonucleic acid among pepper cultivars. Journal American Society Horticultural Science. 116 (5):903-905

Valverde R.A., Dodds J.A. and Heick J.A. (1986) Double-Stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. Phytopathology 76:459-465

Vega P.A. (1989) Transmisión de un virus en semilla de Chile (*Capsicum annuum* L.) Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mex.

Velasco V.V. (1999) Influencia de N.P.K. y Si en la tolerancia al virus jaspeado del tabaco en plantas de Chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). Tesis de doctorado, Colegio de postgraduados, Texcoco, Mex.

Wakaichuk A.D. and Hamilton R.I. (1990) Partial nucleotide sequence from enigmatic dsRNA in *Phaseolus vulgaris*. Plant Molecular Biology 14:637-639.

Wakarchuk D.A. and Hamilton R.I. (1985) Cellular double stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. Plant molecular Biology 5:55-63.

Wang, Z-W., Zheng, F.Q., Guo, X.L. and Hong, M.M (1990) Double stranded RNA and male sterility in rice. Theor Appl. Genet.

Xie W.S, Antoniw J.F, White R.F, Woods R.D. (1993) A transcribed cryptic virus in beet (*Beta vulgaris*) Plant Pathology 42, 465-470.

Yang Z.W., Fei-Quin Z., Xiao G. and Men-Ming H. (1989) Occurrence and partial characterization of RNA species in rice mitochondria. Plant Science 16:227-234.