



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN

PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

UNIDAD SINALOA



DEPARTAMENTO AGROPECUARIO

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA ENFERMEDAD MARCHITEZ
MANCHADA EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

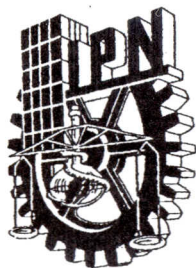
MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA:

MARÍA ALEJANDRA NUÑEZ LÓPEZ

GUASAVE, SINALOA

JUNIO 2008



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 4 del mes de Junio del año 2008, el (la) que suscribe María Alejandra Nuñez López alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B051585, adscrito al sexto semestre, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Sergio Medina Godoy y cede los derechos del trabajo intitulado Análisis Proteómico de la Enfermedad Marchitez Manchada en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas ó datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alejn77@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


María Alejandra Nuñez López

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sin. siendo las 12:00 horas del día 3 del mes de Junio del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis de titulada:

Análisis Proteómico de la Enfermedad Marchitez Manchada en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Presentada por el alumno:

Nuñez
Apellido paterno

López
Apellido materno

María Alejandra
Nombre(s)

Con registro:

B	0	5	1	5	8	5
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de: MAESTRIA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


Dr. Sergio Medina Godoy


Dr. Ignacio Eduardo Maldonado
Mendoza


Dra. Melina Lopez Meyer


Dr. Juan Carlos Sainz Hernández



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCIÓN


Dr. Angel Valdez Ortiz

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Jesús Méndez Lezano

El presente trabajo se realizó en el Departamento Agropecuario en el laboratorio de Ecología Molecular del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del Dr. Sergio Medina Godoy. Para la realización de este proyecto, se recibió financiamiento de Fundación Produce Sinaloa 2006-2007 (Proyecto No. 603), CECyT Sinaloa 2006 y SIP-IPN (Proyecto No. 20070409). El autor agradece el Instituto Politécnico Nacional por el apoyo en infraestructura y económico brindado a través de su sistema de becas, así como al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa por todo el apoyo durante la realización del presente trabajo.

Agradecimientos a:

Mis padres Jesús Aideé López y Guadalupe Antonio Núñez Muzquiz

Mis sobrinos: Maty, Juan Pablo, Jerónimo, Frida, Abel

A mis tíos Abel, Carmen Beatriz, Alberto, Tina, Adela, Joaquín.

A todos los chicos del laboratorio:

Bertha Leal, Ángela, Sarahí, Mercedes, Luz Isela, Alicia Fierro, Hugo, Juan Carlos, Arturo Fierro, Damián, Juan pablo, Viridiana, Alene, Luci Lucky

A los de medio ambiente Ana Elsi, a la Dra. Durga

A Gaby de biología molecular

A todos por su granito de arena por su apoyo, su tiempo, sus consejos o su amistad.

Dr. Sergio Medina Godoy por ser mi asesor

Dra. Melina López Meyer.

Dr. Eduardo Ignacio Maldonado Mendoza.

Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

M.C. Maria de Los Ángeles Verduzco, por permitirme trabajar en el laboratorio de suelos.

Al Dr. Máximo Turina y a Marina Ciuffo, Laboratorio de Virología vegetal, Torino Italia, por donarnos los anticuerpos para la detección del virus ToANV.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz UNAM FES-IZTACALA. Por su apoyo participación y asesoría.

Al Dr. Paredes López y al Dr. Andrés Cruz CINVESTAV y a Fátima Rosas y Silvia Luna, Irapuato. Por permitirme y ayudarme a hacer estancia en su laboratorio.

Al Dr. Angel Valdes, UAS Culiacán a Silvia, y a Lulú también por su ayuda.

En la vida, como en los cuentos de Mark Twain para llegar a la tierra prometida, a la isla segura, a la balsa flotante, a la bolita brillante y a la mermelada goteante, siempre hay que atravesar ríos, saltar la cerca de la tía, vencer al grandote del barrio, cruzar los círculos de fuego de nuestros miedos y dejar la piel en el camino pedregoso.

No habrá ni hay un carruaje que nos lleve sin enfrentar las luchas, ni un atajo para llegar más pronto o más fácil. Nadie nos puede llevar a cuestas, ni vivir la aventura por nosotros. Y ya que en la vida la lucha constante es inevitable, la mejor actitud es la del guerrero, jugando en "equipo" y asumiendo nuestro destino día a día, como una forma de vida, como una aventura sin la que nos aburriríamos y se oxidarían nuestras destrezas.

Anónimo

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
GLOSARIO	vii
ABREVIATURAS Y UNIDADES	xi
RESÚMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Origen del tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	5
2.2. Enfermedades que afectan al cultivo del tomate	5
2.2.1. Enfermedades causadas por virus	6
2.2.1.1. Marchitez manchada en tomate	8
2.2.2. Superfamilia “Picornaviridae”	11
2.2.3. Problemática actual de la enfermedad marchitez manchada del tomate	11
2.2.4. Identificación de virus en plantas	13
2.2.4.1. Proteómica basada en espectrometría de masas para identificación de proteínas virales en plantas	14
2.2.4.1.1. Preparación de muestras	15
2.2.4.1.2. Electroforesis bidimensional	17
2.2.4.1.3. Espectrometría de masas	17
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27

6.1.	Estrategia general	27
6.2.	Materiales	28
6.2.1	Material biológico	28
6.2.2.	Anticuerpos	28
6.2.3.	Reactivos químicos	29
6.3.	Métodos	30
6.3.1.	Caracterización serológica de plantas colectadas	30
6.3.1.1.	Prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos (DAS-ELISA)	30
6.3.2	Prueba de inoculación con extracto de plantas de tomate con síntomas de marchitez manchadas y positivas con DAS- ELISA para el virus ToANV	32
6.3.3.	Análisis proteómico	32
6.3.3.1.	Optimización del método de extracción de proteínas	33
6.3.3.2.	Cuantificación de proteínas	35
6.3.3.3.	Electroforesis en gel desnaturizante (SDS–PAGE)	37
6.3.3.4.	Electroforesis bidimensional	37
6.3.3.4.1.	Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	37
6.3.3.4.1.1.	Acondicionamiento de las tiras IPG	38
6.3.3.4.2.	Segunda dimensión: Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	38
6.3.3.4.3.	Visualización de proteínas	38
6.3.3.4.4.	Fotodocumentación y análisis de geles	39
6.3.3.4.5.	Determinación del punto isoelectrónico y peso molecular de las proteínas de geles bidimensionales	39
6.3.4.	Detección inmunológica de las proteínas del virus ToANV (<i>Western blot</i>)	39
6.3.5.	Identificación de proteínas por huella peptídica de masas PMF	42
6.3.5.1.	Preparación de la muestra para espectrometría de masas	42
6.3.5.2.	Análisis bioinformático de los espectros de masas	44
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

7.1.	Sintomatología y caracterización serológica del material colectado	45
7.1.1.	Descripción de los síntomas de plantas de tomate colectadas	45
7.1.2.	Descripción de síntomas en hospederos alternos	45
7.1.3.	Detección del virus ToANV por DAS-ELISA en plantas de tomate con síntomas de marchitez manchada.	47
7.1.4.	Detección del virus ToANV por DAS-ELISA en hospedantes alternos con síntomas de marchitez manchada.	47
7.1.5.	Experimentos de infiltración en teresitas (<i>Catharanthus roseus</i>)	48
7.2.	Análisis de proteínas	51
7.2.1.	Optimización del método de extracción de proteínas y separación por isoelectroenfoque	51
7.2.2.	Análisis bidimensional comparativo	55
7.2.3.	Detección de las partículas del virus ToANV mediante <i>Western Blot</i> .	57
7.2.4.	Identificación de la proteína 1 diferencial mediante espectrometría de masas	60
VIII.	CONCLUSIONES	65
IX.	RECOMENDACIONES	66
X.	BIBLIOGRAFÍA	68
XI.	ANEXOS	76
	ANEXO 1	77
	ANEXO 2	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Agentes causales virales que producen enfermedad marchitez manchada en tomate	9
2	Resultados de la prueba DAS-ELISA para el virus ToANV obtenidas de plantas de tomate colectadas en campo para el análisis proteómico	47
3	Resultados de la prueba DAS-ELISA para el virus ToANV en hospederos alternos.	48
4	Resultado de la prueba DAS-ELISA para teresitas (<i>Catharanthus roseus</i>) inoculadas por infiltración con tejido de tomate positivo para el virus ToANV	49
5	Rendimiento de extracción de proteínas	51
6	Pesos moleculares y puntos isoeléctricos aparentes de las proteínas expresadas diferencialmente, resultante del programa Gelscape	56
7	Picos experimentales obtenidos del análisis MALDI de la proteína 1	60
8	Proteínas arrojadas por los programas ALDENTE y MASCOT	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Diagrama esquemático de familias y géneros de virus que infectan plantas	7
2	Síntomas típicos producidos por TSWV en tomate	10
3	Síntomas típicos producidos por ToANV en tomate	10
4	Síntomas típicos producidos por ToTV en tomate	10
5	Organización genómica de las familias <i>Picornaviridae</i> y <i>Sequiviridae</i>	11
6	Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	20
7	Diagrama básico de un espectrómetro de masas MALDI	21
8	Representación esquemática de Desorción /Ionización de Matriz Asistida por Láser (MALDI)	21
9	Estrategia general	27
10	Diagrama de flujo de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos (DAS-ELISA)	31
11	Diagrama de flujo de la extracción de proteínas por fenol modificado (Hurkman y Tanaka, 1986) y optimizado para hoja de tomate	34
12	Diagrama de flujo del método fluorométrico para la cuantificación proteína	36
13	Diagrama de flujo del ensayo de inmunodetección (<i>Western blot</i>)	41
14	Diagrama de flujo para la preparación de proteínas para espectrometría de masas	43
15	Síntomas de marchitez manchada en plantas de tomate colectadas	46
16	Teresita (<i>Catharanthus roseus</i>) con síntomas de virosis afectando parte aérea	46

17	Experimento de infiltración en teresitas (<i>Catharanthus roseus</i>)	50
18	Comparación electroforética entre los distintos métodos de extracción	53
19	Geles bidimensionales representativos de los distintos métodos de extracción evaluados	54
20	Geles comparativos en rangos de pH 4-7	56
21	Detección inmunológica de proteínas de la cápside del virus ToANV	59
22	Detección inmunológica de proteínas de la cápside del virus mediante <i>Western blot</i> en gel 2-D SDS-PAGE	59
23	Espectrograma resultante de la proteína 1, identificada por PMF en el equipo MALDI-TOF	61
24	Replicas experimentales de los geles de la condición marchitez 1 en rangos de pH de 4-7	69
25	Replicas experimentales de los geles de la condición marchitez 2 en rangos de pH de 4-7	69
26	Replicas experimentales de los geles de la condición sana 1 en rangos de pH de 4-7	69

GLOSARIO

Acrilamida: La acrilamida es un producto químico intermedio, (un monómero) empleado en la síntesis de poliacrilamidas. Se presenta como un polvo blanco cristalino. Es soluble en agua, etanol, metanol, dimetil éter y acetona; no es soluble en heptano ni benceno. Agente gelificante empleado en combinación del agente intercalante para la síntesis de geles empleados en la electroforesis.

Amino terminal: Parte de la proteína que en el extremo terminal tiene un grupo amino.

Buffer: Soluciones amortiguadoras de pH, ó solución tampón.

Clorosis: Color anormal de la planta, condición amarillenta, blanca o gris de partes de la planta que resulta de la destrucción incompleta de la clorofila.

Electroforesis: Es una técnica para la separación de moléculas, (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular y carga eléctrica. Para la separación se usa un gel de agarosa o poliacrilamida (agente que forma fibras cruzadas, como una malla). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, por la que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente.

Espectrometría: Es una técnica analítica donde se aplican fuerzas electro-magnéticas sobre partículas cargadas en el vacío.

Enfermedad: Alteración y desviación del estado fisiológico en una o varias partes del organismo.

Epidemiología: La epidemiología es la ciencia que estudia la frecuencia de aparición de la enfermedad y de sus determinantes en la población.

Espectro: La espectroscopía es el estudio del espectro luminoso de los cuerpos, con aplicaciones en química, física, y astronomía, entre otras disciplinas científicas.

Fenol: En forma pura es un sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH , y tiene un punto de fusión de $43\text{ }^{\circ}C$ y un punto de ebullición de $182\text{ }^{\circ}C$. El fenol es un alcohol. Puede sintetizarse mediante la oxidación parcial del benceno.

Gel: (Del latín *gelu* - frío, helado o *gelatus* - congelado, inmóvil) Es un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la discontinua es líquida. Los geles presentan una densidad similar a los líquidos, sin embargo su estructura se asemeja más a la de un sólido.

Genoma: Se denomina genoma de una especie al conjunto de la información genética, codificada en una o varias moléculas de ADN (Acido Desoxirribo Nucleico) (en muy pocas especies ARN), donde están almacenadas las claves para la diferenciación de las células que forman los diferentes tejidos y órganos de un individuo.

Hipersensibilidad: Existe una reacción de hipersensibilidad cuando se desarrolla una respuesta inmune dirigida contra elementos que no debieran ser considerados como extraños, o hacia elementos patógenos, pero de una forma inadecuada.

Marchitez: Falta de frescura y turgor y la inclinación de las hojas por falta de agua: una enfermedad vascular que impide la absorción normal de agua por la planta.

Modificaciones postraduccionales: Cambio químico ocurrido en una proteína después de su síntesis, el mecanismo más común es la proteólisis aunque también se presenta la derivatización de aminoácidos específicos.

Mosaico: La coloración no uniforme del follaje, con un patrón distinguido de color verde, verde amarillo o manchas amarillas.

Microscopía: La microscopía es la técnica de producir imágenes visibles de estructuras o detalles demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista.

Morfológicos: Que tiene que ver con la forma.

Monocatenario: Una sola cadena.

Necrosis: Muerte del tejido de la planta.

Patógeno: (Del griego *pathos*, enfermedad y *genein*, engendrar) es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal, vegetal, etc.) sensiblemente predispuesto.

Péptido: Son un tipo de molécula, que están formadas por varios aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

Pico: 1×10^{-12}

Pico base: Es el pico más intenso en el espectro de masas. Es usado como base para normalizar las intensidades de los otros picos. Al pico base se le asigna una intensidad relativa de 100%.

Poliproteína: Proteína que tiende a fragmentarse en otras más pequeñas, por medio de la proteólisis.

Proteólisis: Degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas proteasas o por medio de digestión intramolecular.

Proteoma: Es la totalidad de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones específicas de medioambientales y etapa de desarrollo, (o ciclo celular) específicas.

Reextraída: Que se volvió a extraer.

Ribosomas: Corpúsculo celular que utiliza las instrucciones genéticas contenidas en el ácido ribonucleico (ARN) para enlazar secuencias específicas de aminoácidos y formar así proteínas.

Síntomas: Fenómeno revelador de una enfermedad. Signo que concurre con una enfermedad.

Sobrenadante: Líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producida la sedimentación.

Sharka: Enfermedad, causada por el Plum Pox Virus (PPV), de mayor relevancia a nivel mundial en frutales de hueso.

Sacbrood: Enfermedad en larvas de abejas causada por el virus (SBV).

Sistémicamente: En todo el sistema.

Virus: (Del latín, 'veneno'), entidades orgánicas compuestas tan sólo de material genético, rodeado por una envuelta protectora proteica. Carecen de vida independiente pero se pueden replicar en el interior de las células vivas, perjudicando en muchos casos a su huésped en este proceso.

ABREVIATURAS Y UNIDADES

A continuación se listan las abreviaturas y unidades más utilizadas en este trabajo. Para las abreviaturas, en algunos casos se indica sólo su significado en inglés y en otros casos su significado en inglés y su traducción al castellano.

aa	Aminoácido
Acc. N°	<i>Accession Number</i> (número de acceso en el <i>GenBank</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (persulfato de amonio)
ARN	Ácido ribonucleico
kDa	Kilodalton
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
cm	Centímetros
col.	Colaboradores
D.O.	Densidad óptica
dd	Desionizada
dpi	Días post inoculación
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethilen-diamine-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensayo inmunoenzimático)
°C	Grados centígrados
g	Gramos
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
IEF	<i>Isoelectric focusing</i>
IPG	<i>Focused immobilized pH gradient</i>
ICTV	<i>International Comitee for Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Inmunoglobulina G
λ	Longitud de onda
log10	Logaritmo en base 10

µg	Microgramos
mA	Miliamperes
mM	Milimolar
mg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitro
min	Minutos
M	Molar
ng	Nanogramos
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i> azul de tetrazolio
nsP	<i>Non structural protein</i> (proteína no estructural)
ORF	<i>Open reading frame</i> (marco de lectura abierto)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
pH	Potencial de hidrogeno
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
PVDF	<i>Polivinildiel difluoride</i> .
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
rev/min	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Sodio-dodecil-sulfato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
T amb	Temperatura ambiente
TN	Tris-NaCl
TNE	Tris-NaCl-EDTA
u	Unidad
UI	Unidades internacionales
UTR	<i>Untranslated region</i> (región no traducida)
V	Voltio
VH	Volts/Hora

VLP	<i>Virus-like particle</i> (partícula parecida a un virus)
VP	<i>Viral protein</i> (proteína vírica, normalmente estructural)
v/v	volúmen/volúmen
WB	Western blot
MW	Molecular weight (Peso molecular)

RESÚMEN

En México, el cultivo de tomate es un importante generador de divisas y de empleos (Hernández-Martínez y col., 2004). Sin embargo, los rendimientos de los cultivos se ven mermados por diversas enfermedades entre las cuales las de origen viral causan pérdidas importantes. En años recientes, en la región agrícola del noroeste de México se identificó una enfermedad que afectaba al cultivo de tomate y para la cual no se pudo detectar el agente causal por las técnicas convencionales para los patógenos que causan marchitez manchada en tomate, que fue la sintomatología observada en campo. Bajo la hipótesis de que el agente causal era de origen viral y con el objetivo de identificar a dicho patógeno se propuso como estrategia la utilización de proteómica comparativa para identificar a la proteína de la cápside del probable virus, así se detectaron proteínas diferenciales entre plantas de tomate sintomáticas contra asintomáticas. En el transcurso de la realización de estos experimentos, se publicó un trabajo en el que se caracterizó parcialmente a un agente de origen viral, que causaban síntomas de marchitez manchada en tomate en la región, el cuál se llamó virus de la necrosis apical del tomate (ToANV) (Turina y col., 2007).

Utilizando anticuerpos anti-ToANV por DAS-ELISA se detectó a un hospedero alterno de este virus en el estado de Sinaloa, *Catharanthus roseus*. También se analizaron por DAS-ELISA las plantas de tomate utilizadas para el análisis proteómico y los resultados fueron positivos para las plantas sintomáticas y negativos para las plantas asintomáticas. En base a esto y mediante *Western blot* se visualizó una proteína en el extracto proteínico de una planta sintomática. Mediante aproximación por afinidad, se logró detectar a la proteína de 28 kDa en geles 2-D que fue reactiva al anticuerpo anti-ToANV. Esto sugirió fuertemente que esta proteína correspondía a una proteína de la cápside del virus causante de la sintomatología. Dicha proteína fue analizada por espectrometría de masas, la proteína no se pudo identificar en las bases de datos, debido a que el genoma del organismo al que pertenece no está completamente caracterizado, en su lugar se obtuvo una caracterización por homología a proteínas de la cápside de virus de ARN de cadena positiva con dominios conservados RdRp. Sugiriendo su posible clasificación dentro de la superfamilia *Picornaviridae*.

ABSTRACT

In Mexico, and particularly in Sinaloa state, tomato crops is a major generator of profits and jobs (Hernández-Martínez et al., 2004). However, crop yields are affected by a variety of illness. Some of them are caused by viral diseases. Recently, in the agricultural region of Northwestern of Mexico it has been detected a new disease infecting tomato, which is associated to spotted wilt (marchitez manchada) in tomato, and for which it was not possible to identify an apparent causal agent by the conventional techniques used for pathogens that cause the symptoms of spotted wilt in tomato observed in the field. Based on the hypotheses that the causal agent has a viral origin, a proteomic comparative strategy was used to try to identify its coat protein comparing symptomatic vs. asymptomatic plants. In the course of this work, it was published the partial characterization of the viral agent that caused symptoms of “marchitez manchada” in tomato. This virus was named *Tomato Necrosis Apex Virus* (ToANV) (Turina y col., 2007).

Employing anti-ToANV antibodies in DAS ELISA assays, a positive signal was detected for the natural host *Catharanthus roseus* for ToANV. Tomato plants used for the proteomic analysis were also tested by DAS ELISA. Symptomatic plants resulted positives, whereas asymptomatic plants were negative for the virus ToANV. These results ruled out other common tomato diseases from the region of Sinaloa state. Through an affinity approach, we were able to detect a 28 kDa protein in 2D gels, which was reactive to anti-ToANV. This strongly suggests that this protein correspond to a capsid protein of the virus that is causing the symptoms. This protein was analyzed by mass spectrometry, and the protein could not be identified in databases, because the genome of the organism to witch it belongs is not yet fully characterized. However, a characterization by homology to other virus capsid proteins was done. This analysis showed that the 28 kDa protein presented homology to capsid proteins of strain positive RNA viruses, and specifically to RdRp conserved regions. This suggests a possible classification on within the superfamily *Picornaviridae*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el tomate forma parte de la dieta alimenticia de varias culturas a nivel mundial. En México, su cultivo es un importante generador de divisas y de empleos (Hernández-Martínez y col., 2004). Aun que la producción nacional de tomate ha tenido altibajos, su tendencia histórica ha sido creciente, ocupando México, el noveno lugar como productor y tercero como comercializador a nivel mundial. México aportó aproximadamente el 85% de tomate fresco a los EE.UU., seguido por otros países como Canadá e Israel (Cook, 2007). A nivel nacional, el estado de Sinaloa, es considerado como el mayor productor, habiendo logrado, el 38% de la producción nacional de tomate (CAADES, 2007).

La importancia del tomate mexicano en el mercado estadounidense, se relaciona con la cercanía geográfica, competitividad en precio, calidad, buen sabor y larga vida de anaquel. En México, las exportaciones de hortalizas frescas incluyendo el tomate y la alta dependencia del mercado internacional, han motivado diversas investigaciones sobre la competitividad de estos cultivos (Matus y Puente, 1993).

De las exportaciones de tomate fresco de México a EE.UU., más del 60% provienen de cultivos a cielo abierto (Cook, 2007), en los que la presión de las enfermedades es muy fuerte, sobre todo, en los estados de Baja California y Sinaloa, dónde se han encontrado una gran diversidad de virus fitopatógenos como los geminivirus (Idris y Brown, 2006), crininivirus, (Álvarez y col., 2007), y tospovirus (De la Torre- Almaráz, y col., 2002).

En el 2003, en la región noroeste de México, apareció una enfermedad que los agricultores de la región llamaron marchitez manchada del tomate debido, a los síntomas presentados por las plantas. Tales como anillos necróticos en hojas y frutos, con algunas variantes en síntomas a la marchitez manchada tradicional producida por el virus *Tomato Spotted Wilt Virus* TSWV, causando confusión entre los investigadores y los agricultores. Se consideró entonces, que esta enfermedad, podría ser causada por el *Tomato Torrado virus* (ToTV) de reciente aparición en España, ya que la sintomatología presentada por las plantas era muy similar (Verbeek y col., 2008), pero no se detectó este virus con primers específicos para este virus (Verbeek, y col., 2008). Se consideró que esta enfermedad era causada, por una variante del virus TSWV, un

virus nuevo en la región o dos virus conjuntos, afectando al cultivo de tomate, sin embargo al hacerse los análisis pertinentes, esto también se descartó (Turina y col., 2007). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue encontrar proteínas de la cápside en tomate, para identificar y caracterizar al probable agente causal de la enfermedad marchitez manchada.

II. ANTECEDENTES

2.1. Origen del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

El antecesor comúnmente aceptado del tomate cultivado es *Lycopersicon lycopersicum* var. cerasiforme, llamado tomate cherry. Este es originario de la región Andina, de donde fue dispersado hacia otros lugares del continente americano y del mundo. La mejor aproximación acerca del sitio de domesticación es el área de Mesoamérica (Rick y Holle, 1990). En México, la forma silvestre del tomate se encuentra distribuida generalmente en las regiones tropicales y/o en lugares con humedad disponible y sin problemas severos de heladas. Las formas cultivadas en las zonas productoras más importantes como Sinaloa, Baja California, Nayarit, Jalisco y Michoacán corresponden a variedades mejoradas, mientras que las variedades autóctonas sólo es posible encontrarlas en algunas regiones de Oaxaca, Guerrero y Veracruz.

2.2. Enfermedades que afectan al cultivo del tomate

En promedio el cultivo el tomate puede ser afectado por un centenar o más de enfermedades. Las plantas presentarán enfermedad cuando una o varias de sus funciones sean alteradas por los organismos patógenos o por condiciones del medio. Los procesos específicos que caracterizan las enfermedades, varían considerablemente según el agente causal y a veces según la planta misma. Hay decenas de miles de enfermedades que afectan a las plantas cultivadas. Y cada grupo de patógenos puede atacar desde una, hasta varias docenas de variedades e incluso cientos de especies vegetales (Agrios, 2006). Distintos criterios pueden utilizarse como base para la clasificación de las enfermedades de las plantas (Agrios, 2006). Sin embargo, el criterio más útil en la clasificación de una enfermedad, es el tipo de agente patógeno que la ocasiona (Figura 1). Esta clasificación, tiene la ventaja de que indica la causa de la enfermedad, lo cual permite prever su probable desarrollo y diseminación, así como posibles medidas de control.

El cultivo del tomate es afectado por enfermedades bióticas y abióticas, entre las enfermedades bióticas, están las que son causadas por hongos como: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium*, entre otros (Jones y col., 1991), bacterias (*Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, entre otras) virus

(TSWV, ToRSV, entre otros), nemátodos (*Meloidogyne incognita* sp.) plantas parásitas, y de entre las abióticas el tomate es susceptible a las heladas, nutrición deficiente, etcétera (Jones y col., 1991).

2.2.1. Enfermedades causadas por virus

Las enfermedades virales en plantas producen una gran variedad de síntomas, los cuales dependen de la variante del virus, hospederos, estado de crecimiento de la planta y condiciones medioambientales (Jones y col., 1991), los virus causan en tomate importantes enfermedades, las plantas infectadas muestran un rango de síntomas como pueden ser mosaicos, amarillamientos, deformación en las hojas, necrosis, anormalidades en flores o formación de frutos. Algunas veces los virus no producen síntomas visibles o se limitan a algunas partes de las plantas, causando una infección local, pero otras veces se extienden a toda la planta, causando una infección sistémica, algunos virus se han especializado en una o varias especies de plantas, y otros se han adaptado a sobrevivir en muchas especies de plantas.

La distribución de patógenos sobre un hospedero y la distribución de diferentes patógenos hacia especies de hospederos, pueden afectar la frecuencia de infecciones múltiples de un hospedero, por diferentes patógenos. La infección múltiple puede tener consecuencias importantes para el hospedero infectado, para el patógeno y para la co-evolución hospedero-patógeno (Read y Taylor, 2001; Woolhouse y col., 2002).

Los virus, se diferencian de otros organismos por presentar una única especie de ácido nucleico constitutivo, que puede ser de ADN o ARN, monocatenario o bicatenario con estructura de doble hélice, cubiertos por proteínas que conforman la cápside una de las funciones de las proteínas es determinar la forma del virus (Figura 2). Todos los virus descritos en plantas son de tamaño pequeño, la mayoría presentan de cuatro a diez genes en su genoma, el grupo principal de virus lo conforman los virus de RNA, de los cuales, la mayoría presentan RNA de cadena sencilla con polaridad de RNA mensajero (o positiva, +ss RNA), otros poseen RNA de cadena complementaria (o negativa, -ssRNA), RNA de polaridad tanto negativa como positiva (ambisentido) o RNA de doble cadena (dsRNA) y como grupo minoritario están los virus que presentan DNA de cadena sencilla o doble como genoma (Murphy y col., 1995).

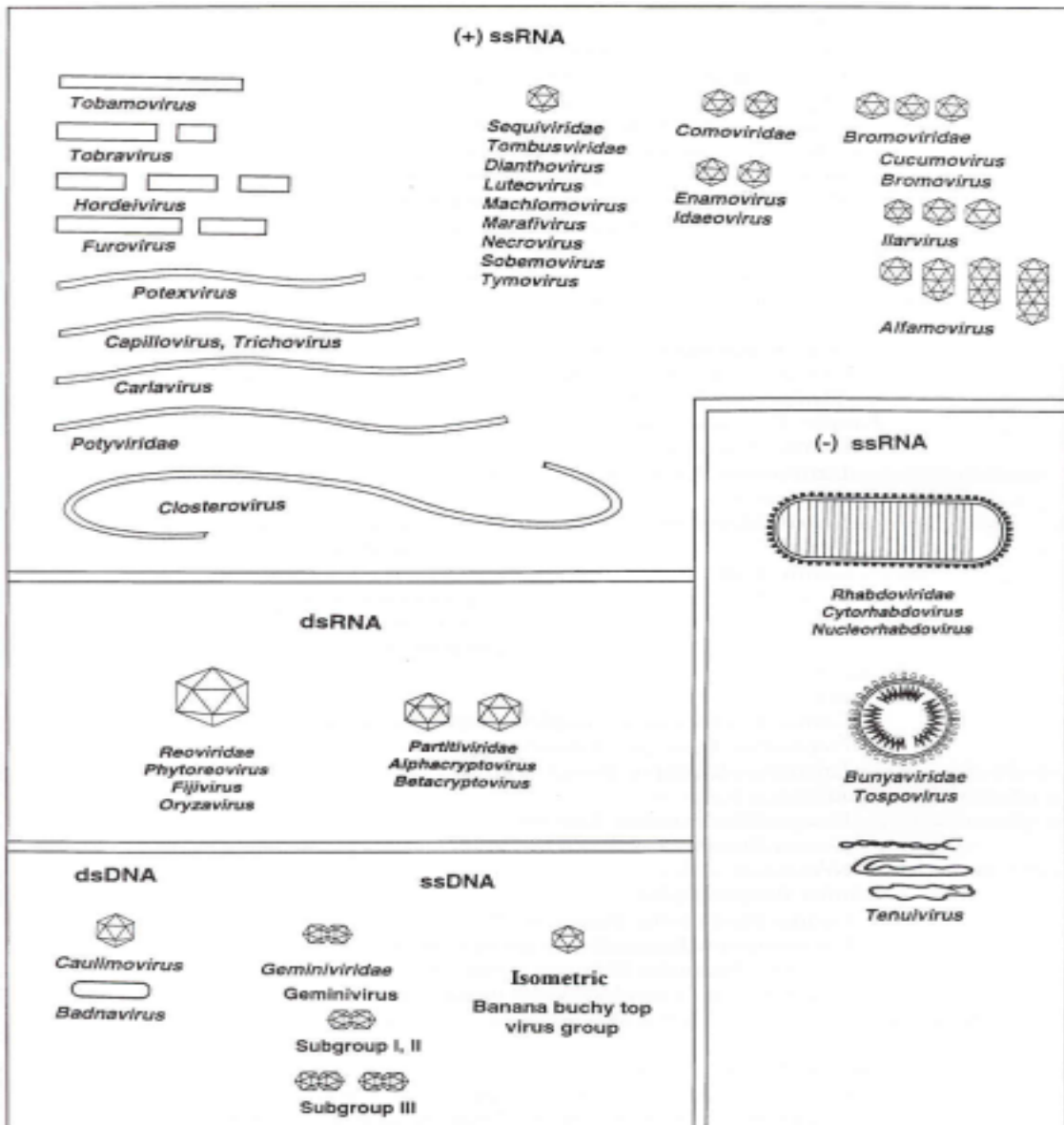


Figura 1. Diagrama esquemático de familias y géneros de virus que infectan plantas (Tomado de Murphy, 1995)

Los virus no pueden ser controlados directamente por pesticidas u otros químicos. Muchos de los virus son transmitidos por organismos vectores, o durante las operaciones culturales, unos pocos virus son transmitidos a través del polen a la semilla (Jones y col., 1991), algunos pueden infectar sistémicamente las flores y frutos, provocando serios daños fisiológicos a las plantas hospederas y grandes pérdidas económicas a los países exportadores de fruta fresca (Herrera y Mandariaga, 2002).

Los virus emergentes de plantas pueden ser nuevos (no previamente conocidos) o virus bien conocidos. Sin embargo, ellos tienen la característica común de ocupar y/o dispersarse a nuevos nichos (Roossinck y col., 2008). Hay factores que dirigen la emergencia de los virus en plantas, ellos incluyen variabilidad genética en los virus, cambios en las prácticas agrícolas, incremento en la población y/o distribución de insectos vectores y el transporte por grandes distancias de material vegetal (Roossinck y col., 2008). En años recientes, virus individuales y grupos enteros de éstos han emergido involucrando una gran variedad de mecanismos, dependiendo del virus que se trate y del medio ambiente. Un ejemplo notorio, lo constituyen los geminivirus transmitidos por mosquita blanca, tospovirus y otros ejemplos que incluyen la reciente emergencia de nuevos virus (Roossinck y col., 2008) como el ToANV, el ToMarV y el ToTV todos pertenecientes al orden de los picornavirales (Turina y col., 2007; Verbeek y col., 2008).

2.2.1.1. Marchitez manchada en tomate

La enfermedad marchitez manchada es llamada así por los agricultores y personal que trabaja en el campo, el nombre describe en general el aspecto de la planta cuando está enferma, ya que presenta pérdida de turgencia (marchitez) y necrosis en las hojas y/o frutos, lo que se observa a simple vista como un manchado. En la actualidad hay dos virus relacionados que aparecieron en México, el *Tomato Apex Necrosis Virus* (por sus siglas en inglés) (Turina y col., 2007) y el *Marchitez Tomato Virus* (por sus siglas en inglés) (ToMarV) (Verbeek y col., 2008) sumándose al comúnmente encontrado TSWV que son capaces de producir una sintomatología similar de marchitez manchada en tomate.

Los aspectos de la planta de tomate, que le dan el aspecto marchito y manchado son a *grosso modo* los síntomas principales de esta enfermedad, sin embargo cada agente

causal produce en la planta particularidades en estos dos síntomas. Por ejemplo, el virus TSWV produce en las hojas manchas foliares necróticas, hojas curvadas hacia arriba y reducción del crecimiento de éstas, en el fruto produce manchas irregulares ó en forma de anillos que pueden ser amarillos o cafés, la rayadura en el tallo es frecuente (Figura 2), el virus ToANV, produce marchitamiento en la parte apical, causando muerte regresiva, las manchas en fruto son café en anillos comenzando en la parte basal del fruto, no es muy frecuente encontrar rayadura en el tallo (Figura 3) y el virus ToMarV en las hojas produce necrosis rodeada por amarillamientos o áreas verde claro, y en fruto anillos necróticos y manchas (Figura 4).

Tabla 1. Agentes causales virales que producen enfermedad marchitez manchada en tomate

Virus	Taxonomía	Dispersión e impacto	Identificación	Partes de la planta afectada	Rango de hospederos
TSWV	Familia: <i>Bunyaviridae</i> , Género: <i>Tospovirus</i>	Serios impactos alrededor del mundo	Anticuerpos comerciales; oligonucleótidos específicos reportados	Necrosis hoja, fruto, rayadura tallo	Amplio rango de hospederos
ToANV	Familia: "Sequiviridae"	Serios impactos Noroeste de México (Culiacán y Obregón) 2003-2007	Anticuerpos no comerciales; No hay reportes oligonucleótidos puedan amplificar el virus	Necrosis hoja, fruto, rayadura tallo poco común	<i>Solanaceae</i> , <i>Apocynaceae</i>
ToMarV	Familia: <i>Picornaviridae</i>	Sinaloa, México 2003-2007	Oligonucleótidos específicos reportados	Necrosis hoja y fruto	<i>Solanaceae</i>

Fuente: De la Torre-Almaráz, 2002; Turina y col., 2007; Verbeek y col., 2008.

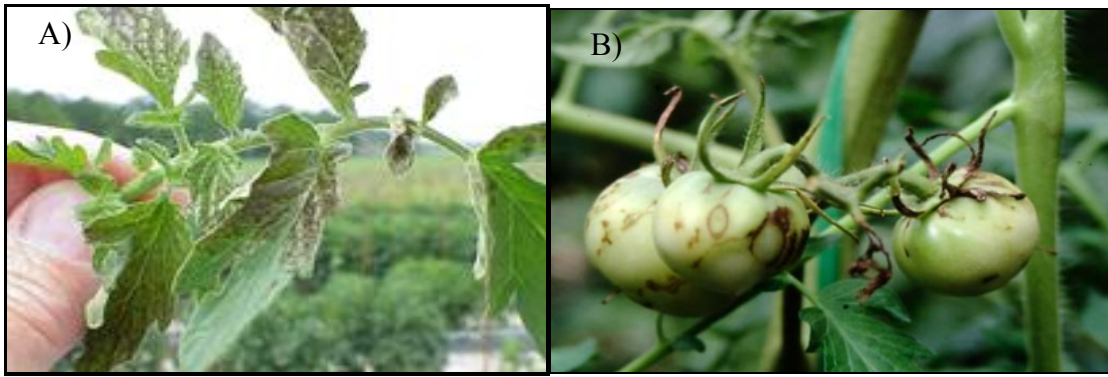


Figura 2. Síntomas típicos producidos por TSWV en tomate. A) Necrosis en hoja, B) Necrosis en fruto (Tomado de Okuda, 2005).

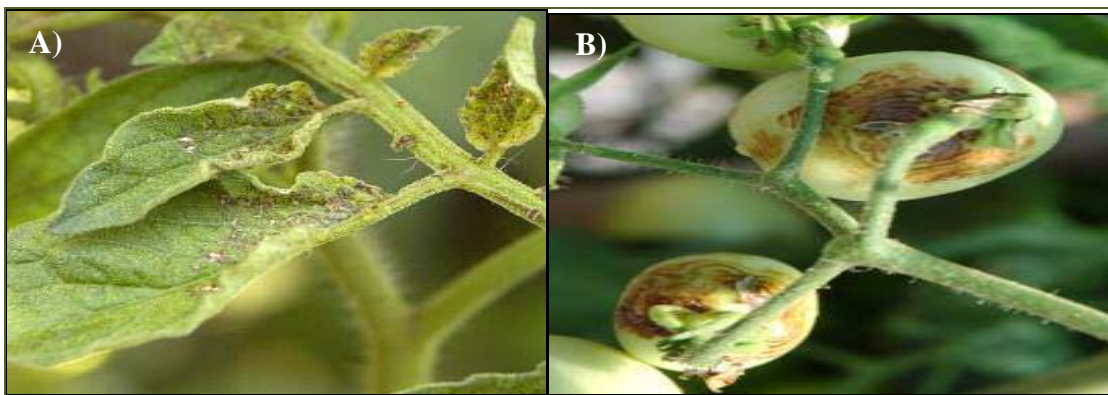


Figura 3. Síntomas típicos producidos por TOANV en tomate. A) necrosis parte basal de la hoja, B) necrosis fruto (Tomado de Turina y col., 2007).

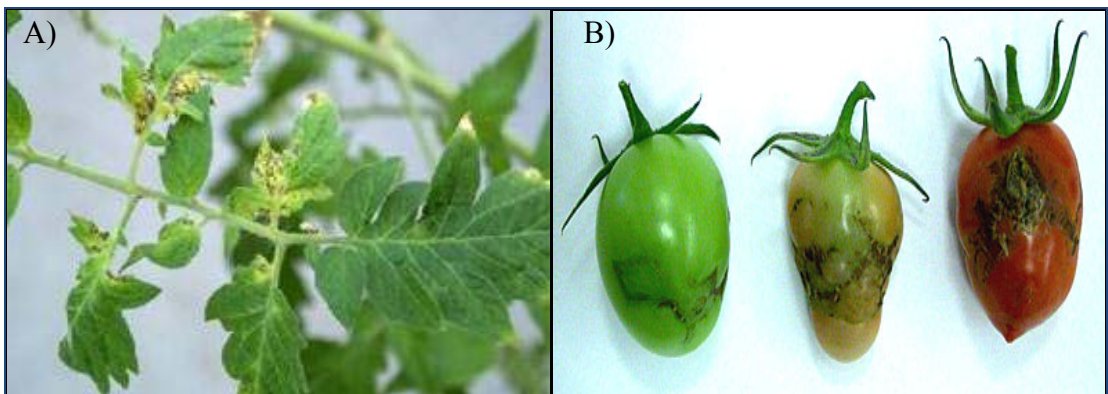


Figura 4. Síntomas producidos por ToMarV en tomate. A) necrosis rodeadas por amarillamiento o áreas verde claro, B) frutos anillos necróticos y manchas (Tomado de Verbeek y col., 2008).

2.2.2. Superfamilia “Picornaviridae”

Los picornavirus comprenden seis familias: *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Comoviridae*, *Sequiviridae*, *Dicistroviridae*, y *Potyviridae*, propuestas como una superfamilia de virus (Liljas y col., 2002). La organización genética de la familia *Picornaviridae* y *Sequiviridae* se representa esquemáticamente en la Figura 5. Los géneros de las dos familias se diferencian en que la familia *Picornaviridae* posee una cola de poli A. La proteína VPg unida al extremo terminal 5', se cree que funciona en la regulación genética. La secuencia de Poli-A (cadena de adeninas), que varía de un virus a otro, es importante para producir infectividad y el análisis de las secuencias de la región conservada polimerasa (Pol) ó RdRp a partir de estos virus producen alineamientos filogenéticos congruentes con su ubicación de la superfamilia “Picornaviridae” (Koonin, 1993).

2.2.3. Problemática actual de la enfermedad marchitez manchada del tomate

Las investigaciones sobre virus, se han incrementado dramáticamente, y nuevos virus están siendo encontrados constantemente. En México, el ToANV y el ToMarV, se asociaron a la aparición de grandes cantidades de mosquita blanca. Sin embargo, aún no se ha logrado identificar a ciencia cierta el insecto vector (Turina y col., 2007; Verbeek y col., 2008). El ToANV se secuenció parcialmente lo cual dificulta su clasificación. Sin embargo tiene características de un *Sequivirus* y el ToMarV se ubica en la familia de los *Picornavirus*. En estas familias no se han determinado los sitios de corte de la poliproteína y que tienen que ver con la infectividad del virus, lo cual tiene que ser determinado experimentalmente.

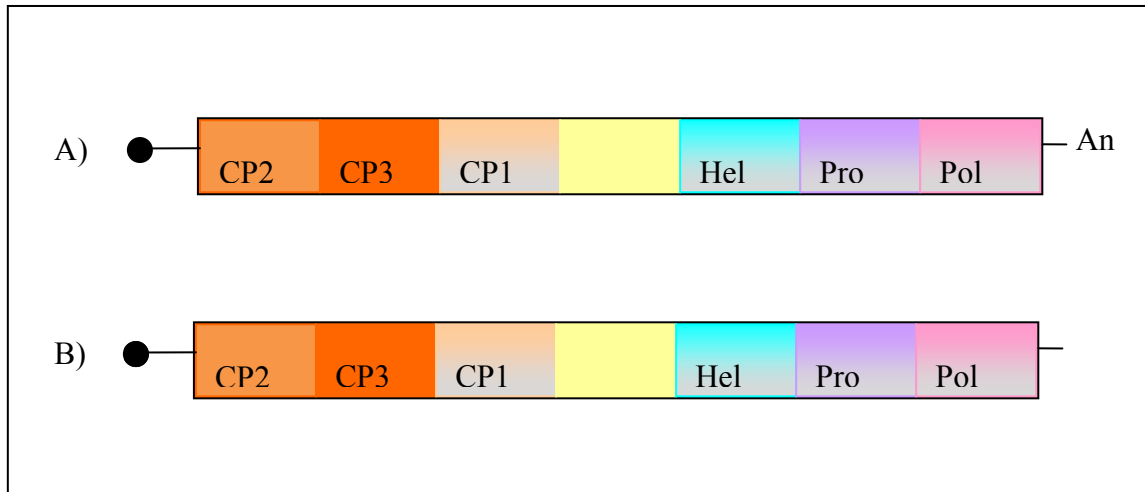


Figura 5. Organización genómica de las familias *Picornaviridae* y *Sequiviridae*. Donde A) *Picornaviridae* y B) *Sequiviridae*, (Las abreviaciones son Hel: Helicasa; Pro: proteínasa; Pol: polimerasa (otros autores la manejan como región RdRp); CP: proteínas de la cápside (CP1, CP2, CP3 son tres copias imperfectas del dominio de la CP), An: poli-A; ●:VPg (Le Gall y col., 2008).

Tampoco no se han determinado los cambios moleculares que producen en las plantas, ni se conoce el amino terminal de las proteínas de la cápside con lo cual se podrían diseñar anticuerpos monoclonales, por lo que aún no hay en México, una tecnología disponible y de fácil aplicación para que los agricultores puedan identificar estos nuevos virus. El rango de indicadores para el virus ToANV incluye solanáceas como tomate, tabaco, pimiento y malezas como toloache (*Datura stramonium*) y tomatillo silvestre (*Physalis* spp.) y al menos una no solanácea teresita (*Catharanthus roseus*) de la familia de las *Apocynaceae* (Turina y col., 2007; Verbeek y col., 2008). Se sospecha de un origen local del virus ToANV (Brown, 2008).

2.2.4. Identificación de virus en plantas

El diagnóstico tradicional, basado en síntomas y los estudios de rango de hospederos pueden ayudar a clasificar algunos virus comunes, empleando rangos de plantas hospederas, lo cual requiere paciencia y experiencia para observar e interpretar los síntomas. La microscopia electrónica es también usada (Desjardins y col., 2000) como un excelente método para evaluar las características morfológicas de un amplio espectro de organismos patógenos, pero no son suficientes para identificar algunos patógenos. En comparación, la hibridación de ácidos nucleicos, el PCR, la secuenciación de ADN, el análisis de dsRNA y los métodos basados en anticuerpos (ELISA y *Western blot*) son métodos que ofrecen la posibilidad de definir cepas a un nivel genético y molecular. Muchos de estos métodos son fáciles de realizar, económicos, rápidos y precisos, pero requieren la secuencia de ácidos nucleicos, avanzados conocimientos de antigenicidad de la proteína de la cápside, o en su defecto requieren la viabilidad de un rango de antisueros necesarios para caracterizar uno o muchos posibles virus (Clark y Adams, 1977; Pappu y col., 1993; Sánchez-Navarro y col., 1999;). El análisis de dsRNA, es también el método mas versátil para identificar virus de ARN, ya que no se necesita un conocimiento previo de la muestra (Dawson y col., 1982). Pero también puede ser insuficiente para identificar un virus desconocido. Del mismo modo, se requieren reactivos específicos (juegos de oligonucleótidos o anticuerpos) para estos patógenos, lo cual no es muy útil si estos reactivos no están disponibles, lo que implica se hayan generado con anterioridad en base a conocimientos de la secuencia nucleotídica del genoma o a la antigenicidad de las proteínas de la cápside que lo componen.

Así, no siempre existe un método simple, confiable o disponible, para que los fitopatólogos identifiquen a un patógeno. Tradicionalmente, la identificación de un virus desconocido debe seguir los rigurosos postulados de Koch para probar que un agente patógeno causa la enfermedad detectada. En su lugar algunas técnicas, más novedosas como la espectrometría de masas (EM) ofrecen la oportunidad de identificar un virus desconocido sin tener que realizar numerosos experimentos. La huella peptídica de masas (PMF por sus siglas en inglés) se ha empleado con éxito sin la necesidad de la identificación directa de cepas virales por purificación. (Lewis y col., 1998; She y col., 2001). Así la EM tiene la característica de discriminar proteínas y masas de péptidos que son únicos para patógenos sin el requerimiento de reactivos específicos para el patógeno como primera realización del análisis. La EM tiene el potencial para ser una tecnología universal de detección de patógenos que es rival de la secuenciación del ADN. Limitada solo por las bases de datos actuales, debido a que se desconoce el genoma completo de muchos fitopatógenos. En la actualidad, los fitopatólogos tienden a utilizar más la EM para estudiar los cambios en el proteoma de las plantas y así tener una visión de la respuesta del hospedero a la infección, más que para la detección de patógenos, ya que estos raramente se reportan en estos estudios.

2.2.4.1. Proteómica basada en espectrometría de masas para identificación de proteínas virales en plantas

La proteómica término designado por Marc Wilkins, en 1994, es un nuevo enfoque de estudio funcional de las proteínas, pues en él se integran algunas tecnologías básicas como: métodos de separación de alto rendimiento de proteínas, espectrometría de masas y sobre todo, herramientas de bioinformática que ayudan a extraer información de las bases de datos y la correlacionan con los datos de masas obtenidos experimentalmente. La proteómica es utilizada para conocer el proteoma de las especies o para elucidar diferencias en la expresión de proteínas comparando dos condiciones, como en la proteómica comparativa.

Uno de los objetivos claves en la proteómica comparativa, es identificar la expresión diferencial de proteínas entre muestras control y problema. El análisis de los patrones de proteínas de geles separados en dos dimensiones (2D, separación por punto isoeléctrico y por peso molecular), es decir, el análisis de las manchas de proteínas (*spots*), que en

diferentes condiciones: aparecen (inducidas), desaparecen (reprimidas) o que cambian de intensidad (diferente concentración). Una vez que los geles se analizan y se determinan las proteínas candidatas. Estas se extraen del gel y se identifican mediante EM.

El estudio de complejas preguntas biológicas a través de proteómica comparativa a empezado a ser una importante herramienta en el estudio de la biología de las plantas (Heazlewood y col., 2003; Kersten y col., 2002; Rossignol y col., 2001; Thiellement y col., 1999; Van Wijk y col., 2001), marcado por la rápidamente expansión de la genómica de plantas y los bancos de datos de secuencias expresadas transcritas (ESTs), que proveen oportunidades para la identificación de proteínas expresadas diferencialmente. La generación y análisis de datos proteómicos son muy difundidos. En la actualidad, existe una gran diversidad de aplicaciones. Sin embargo todos los protocolos deben contener algunos pasos básicos que conforman la ruta crítica del análisis proteómico.

1. Colecta de muestras, manejo y almacenamiento.
2. Separación de proteínas (electroforesis bidimensional).
3. Identificación de proteínas (espectrometría de masas).
4. Caracterización de proteínas (secuenciación de aminoácidos).
5. Bioinformática (referencia cruzada de informática de las proteínas con bases de datos genómicas)

La proteómica basada en la EM, se convertirá, en el futuro en un enfoque crítico para identificar, caracterizar y entender mejor la biología de patógenos de plantas de origen fúngico, viral y bacteriano. La falta de información disponible del genoma de estos patógenos sigue siendo un cuello de botella para la identificación exitosa cuando se usa EM (Padliya y Cooper, 2006).

2.2.4.1.1. Preparación de muestras

El paso más crítico en cualquier estudio proteómico es la extracción y/o preparación de la muestra. A este respecto, el análisis proteómico de tejidos de plantas, involucra un número de cambios prácticos que son típicamente, más problemáticos que con otros

organismos. Además de que tienen relativamente baja concentración de proteínas, los tejidos de plantas son también ricos en proteasas y materiales que interfieren severamente con la separación y análisis de proteínas, incluyendo pared celular y polisacáridos de reserva, lípidos, compuestos fenólicos y una amplia formación de metabolitos secundarios (Granier y col., 1988; Tsugita y col., 1999). Tales contaminantes son un problema particularmente para la electroforesis bidimensional 2-D, resultando en estriamientos horizontales y verticales, manchados y una reducción del número de los distintos *spots* resueltos.

Muchos protocolos de extracción han sido desarrollados y seleccionar un protocolo, depende de la naturaleza del tejido de partida y de las aplicaciones a las que se tengan destinadas (Por ejemplo, análisis de complejos de proteínas, proteínas de membrana o proteínas con modificaciones post- traduccionales) (Isaacson y col., 2006). Un número de protocolos han sido desarrollados para mejorar la extracción de proteínas de plantas antes del análisis de 2-DE y muchos estudios proteómicos de tejidos de plantas completos, usan una estrategia básica de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) y acetona seguida por la resolubilización en un buffer para isoelectoenfoque (IEF buffer) conteniendo agentes caotrópicos y detergentes (Santoni y col., 1994). Esta medida aumenta la concentración de proteínas y ayuda a remover los contaminantes, del mismo modo, algunos contaminantes poliméricos son de este modo co-extraídos. Éste puede ser un problema particularmente con tejidos que son ricos en compuestos como polisacáridos y polifenoles solubles en la pared celular.

Un protocolo alternativo ha sido desarrollado en el cual las proteínas se solubilizan en fenol saturado (Phe), con o sin dodecil sulfato de sodio (SDS), y las proteínas son subsecuentemente precipitadas con metanol y acetato de amonio, seguido por la resolubilización en IEF buffer (Hurkman y Tanaka, 1986; Meyer y col., 1988). Este método puede generar extractos de proteínas con una contaminación aparentemente mínima a partir de tejidos resistentes como por ejemplo tallos leñosos (Mijnsbrugge y col., 2000), y ha sido usado para de tejidos de hojas de olivos, los cuales contienen grandes cantidades de polifenoles, resultando en un sustancial incremento de la calidad de los extractos de las proteínas comparadas con las técnicas descritas previamente (Wang y col., 2003). Otro reporte también indica que el método de extracción de

proteínas basado en el fenol saturado también minimiza la proteólisis durante la extracción (Shuster y col., 1983).

2.2.4.1.2. Electroforesis bidimensional

El corazón de la tecnología de la proteómica es la electroforesis bidimensional (2-D). Actualmente, no hay ninguna otra técnica la cual sea capaz de resolver simultáneamente miles de proteínas en un procedimiento de separación, la mejora más prominente en la electroforesis (2-D) resulta de los geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG strip por sus siglas en inglés). La identificación de proteínas a partir de geles de poliacrilamida ofrece ventajas importantes comparada con las aplicaciones libres de gel ya que remueve las impurezas de bajo peso molecular, incluyendo detergentes y componentes de soluciones amortiguadoras, los cuales frecuentemente perjudican la identificación por espectrometría de masas, otra ventaja es que la matriz de poliacrilamida es un contenedor seguro para manipular, derivatizar, y archivar cantidades hasta de femtomoles de proteínas (Shevchenko y col., 2006).

2.2.4.1.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una micro-técnica analítica que nos permite conocer el peso molecular y bajo ciertas condiciones, la información estructural de un compuesto. Por lo tanto, se utiliza para identificar compuestos desconocidos o elucidar la estructura y las propiedades químicas de las moléculas con la ventaja de necesitar pequeñas cantidades de muestras (10^{-12} a 10^{-15} moles de un compuesto de 1000 Da de masa).

En los proyectos proteómicos, la identificación de proteínas es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles bidimensionales, la identificación de las manchas o *spots* conduce a la creación de mapas de referencia, que definen las proteínas expresadas por un organismo o tejidos en condiciones determinadas. Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas y sobre-expresión y delección de genes. Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el

método de detección para la identificación de proteínas a gran escala, el primer paso para el estudio del proteoma de distintos organismos. También permite la caracterización de modificaciones post-traduccionales que presentan relevancia fisiológica, tales como glicosilación y fosforilación (Figura 6).

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suave para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa (Figura 7).

Esta técnica tan robusta implica:

- 1.- La conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como desorción /Ionización de Matriz Asistida por Láser (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido (Figura 8), ó la ionización mediante electrospray (ESI) de una muestra en solución.
- 2.- Separación de los iones según su relación m/z en un analizador de masas (por ejemplo un analizador tipo ToF (*Time of Flight*), cuadrupolo, trampa iónica, etc.).
- 3.- Fragmentación opcional de los iones peptídicos.
- 4.- Medida de las masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor de la relación m/z .

Los espectrómetros de masas tienen en común que miden la relación m/z de iones gaseosos haciendo uso de campos eléctricos y/o magnéticos. La medida exacta de este valor para las moléculas gaseosas ionizadas del analito (ion molecular) dará información sobre su masa molar (peso molecular). Si además se induce la fragmentación del ion molecular, cada fragmento iónico será detectado con su propio valor de m/z . (McLafferty y col., 1993). El conjunto de fragmentos formados es característico de cada analito y depende de su estructura química (“huella dactilar”). Por

lo tanto, del análisis de los fragmentos obtenidos se obtiene información sobre la estructura química del analito en cuestión.

En la actualidad hablar del desarrollo de proyectos proteómicos significa contar, entre otras cosas, con esta herramienta analítica esencial. El uso de la espectrometría de masas (EM) apunta siempre a dos aspectos A) Determinación de masas molares (pesos moleculares) y B) Determinación de la estructura química.

La espectrometría de masas ha sido usada en fitopatología y ha demostrado su uso para la identificación de virus mejor que para cualquier otro patógeno (Padliya y Cooper, 2006). El método EM para determinar la identidad de un virus de plantas puede ser colocado en las siguientes categorías:

- 1.- Identificación basada en la masa total (peso molecular) de la proteína viral de la cápside (CP).
- 2.- Identificación basada usando las masas de péptido proteolíticos a partir de CP como una única huella peptídica (también conocida como PMF).
- 3.- Resolución de la secuencia de aminoácidos de los péptidos que conforman la proteína de la cápside vía MS/MS.

Cuando la masa sola no es suficiente para identificar una CP, se puede digerir la CP con una proteasa y examinar las masas de los péptidos derivados. Por examinación manual las masas de los productos de la digestión triptica (She y col. 2001; She y col., 2004) resuelve con éxito las secuencias de aminoácidos de la CP y también descubre la verdadera secuencia de aminoácidos de la CP de virus de plantas superiores (Padliya y Cooper, 2006).

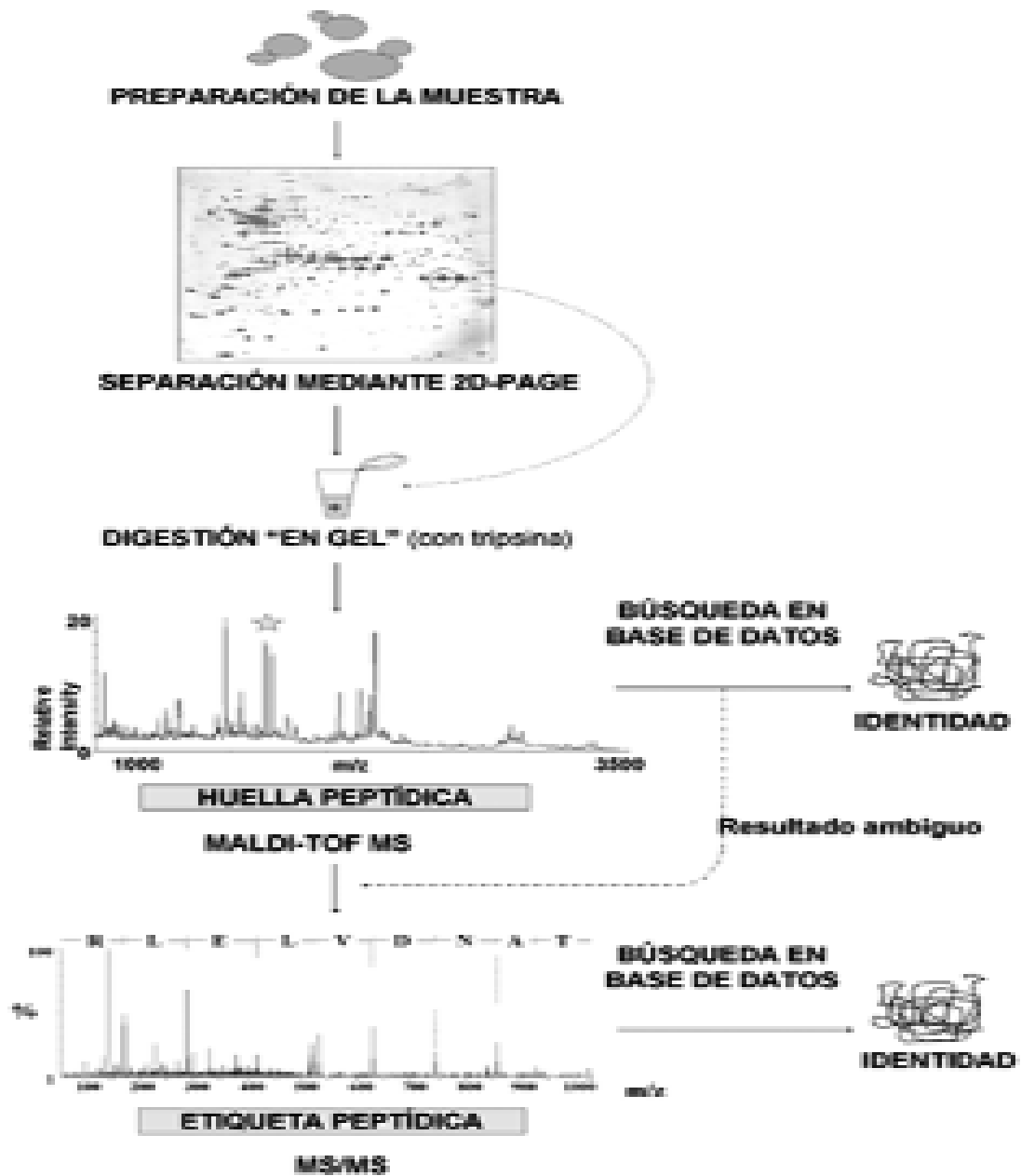


Figura 6. Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (Pitarch y col., 2003).

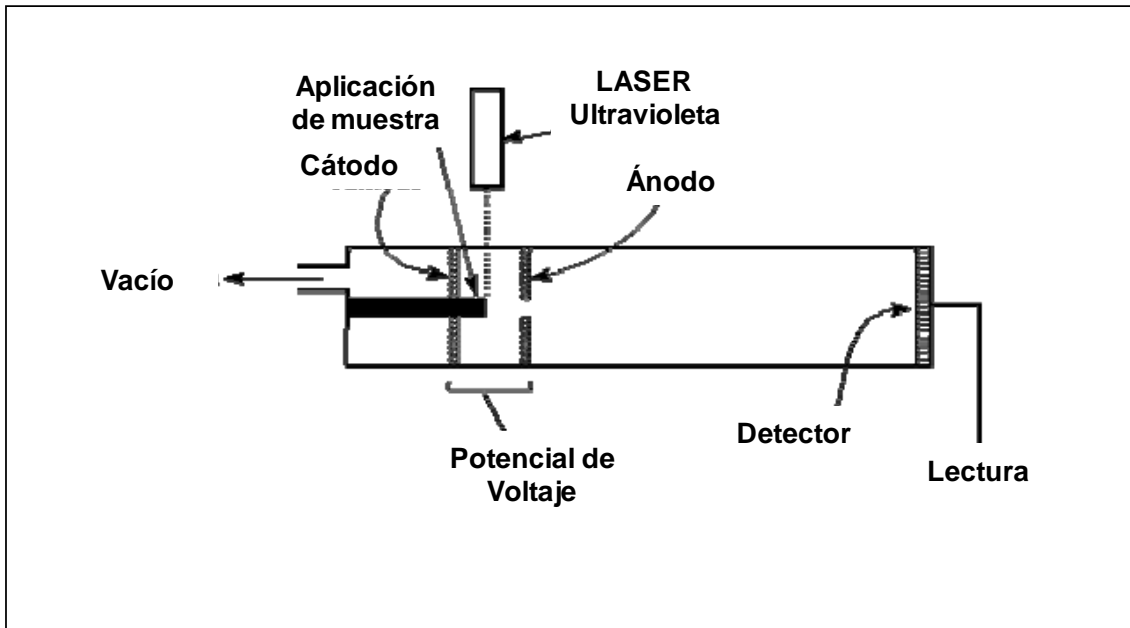


Figura. 7. Diagrama básico de un espectrómetro de masas MALDI (Tomado de Creel, 1993).

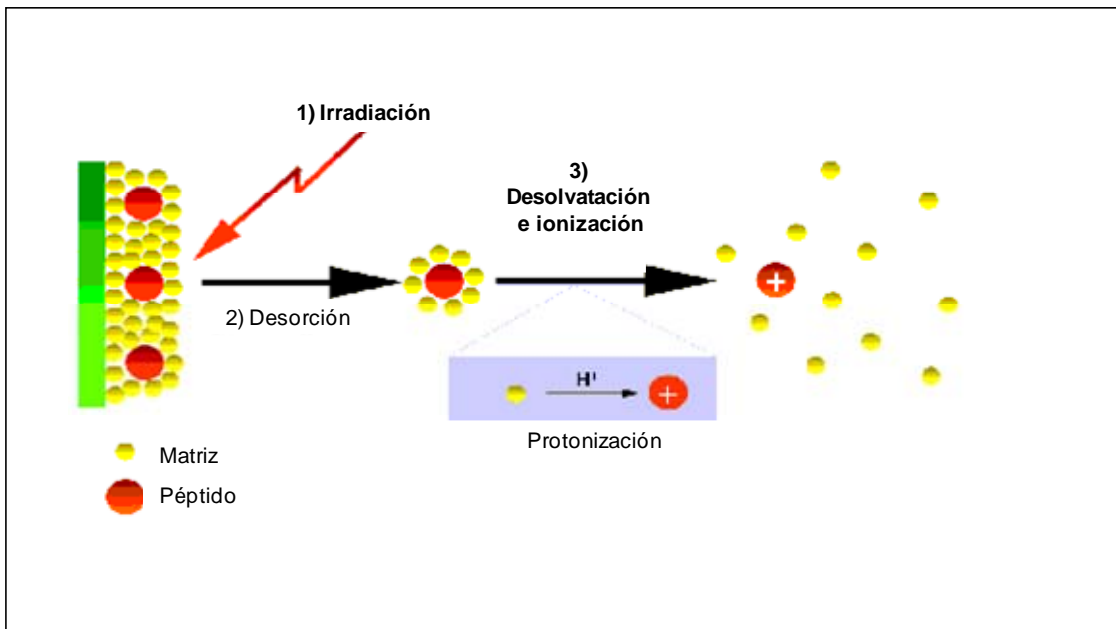


Figura 8. Representación esquemática de Desorción / Ionización de Matriz Asistida por Láser (MALDI) (Tomado de Nijmegen Proteomics).

Del mismo modo, la habilidad para interpretar manualmente las masas de los productos de digestión, está más allá de las capacidades de rutina de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Afortunadamente, es posible automatizar la evaluación del espectro de masas usando algoritmos computacionales que comparen huellas peptídicas de masas virtuales a partir de secuencias conocidas de virus candidatos (Yao y col., 2002).

Otra posibilidad para completar la realización puede aplicando MS/MS para resolver las secuencias de aminoácidos de péptidos tripticos. (Cooper y col., 2003) hacen referencia a los algoritmos de búsqueda de las bases de datos para interpretar los datos del MS/MS e inferir la identidad a partir del espectro de masas, basándose en secuencias de CP virales conocidas. En este trabajo, los autores reportaron la identificación de dos virus a partir de plantas infectadas, uno de los cuales fue un virus desconocido que no pudo ser detectado utilizando un set estándar de oligonucleótidos de PCR. Este virus desconocido no se encontró en la base de datos, y a la fecha la identidad del virus permanece desconocida (Padliya y Cooper, 2006).

En uno de los primeros ejemplos del uso de EM para detectar virus de plantas se analizaron hojas de tabaco infectadas por MALDI-TOF EM directamente después de la adición de ácido acético y la disolución de la matriz. El espectro mostró un pico de 17491 Da, el cual corresponde a la masa de la proteína de la cápside del virus TMV (Fenselau y col. 2001).

Usando un enfoque similar, Tan y colaboradores (2000) usaron MALDI-TOF MS y LC-MS para identificar simultáneamente CPs de dos virus que infectaban orquídeas, las masas moleculares conocidas de los correspondientes CPs permitieron llegar a esas conclusiones. Estos ejemplos indican claramente los beneficios de la identificación viral por masas conocidas de las CP. Sin embargo, esta práctica de diagnóstico falla si la masa de la CP del virus se desconoce o si hay diferencia entre la masa predicha a partir de la secuencia del ácido nucleico y la masa observada.

Mutaciones genéticas impredecibles o modificaciones post-traduccionales (PTMs) tales como glicosilación, hidrólisis, fosforilación u otras pueden crear discrepancia que confunden la interpretación de datos y la exactitud en la identificación de los virus. En tales casos una alta resolución en la EM es deseable y por lo tanto el empleo de

MALDI-MS ha sido usado de forma confiable para identificar las mutaciones en la CP de TMV (Lewis y col., 1998). Comparado a la secuenciación del ADN, que puede ser usado para identificar el origen de las variaciones en las proteínas, solo la EM puede resolver mutaciones similares y cualquier modificación post traduccional, lo cual comienza a ser una importante distinción a este respecto en la detección del patógeno por virtud de la identificación de proteínas.

Así la EM ha sido exitosa para obtener información de identificación complementaria de virus cuando los datos de otros métodos no han sido suficientes, la utilidad de la EM y los diferentes niveles de interrogantes pueden ser hechas sobre las proteínas. Existen casos donde la EM es usada en conjunción con otros métodos moleculares para identificar virus (Padliya y Cooper, 2006).

Por ejemplo en el 2005, se observó un virus causante de nuevos síntomas en sorgo, el cual reaccionó débilmente con el antisuero del *Johnsongrass Mosaic Virus* (JGMV). Los experimentos MS/MS sobre la CP del nuevo virus revelaron que la región intermedia de la CP fue sustancialmente diferente a partir de la región correspondiente de la CP del virus del cuál el anticuerpo fue originado. Consecuentemente estos autores pudieron caracterizar una nueva variante del JGMV y explicar la débil interacción del anticuerpo (Seiffers y col, 2005).

La regulación de mecanismos de cualquier interacción planta-patógeno es compleja y dinámica. Una estrategia proteómica es también valiosa en el entendimiento de las redes regulatorias, porque esto se relaciona con la identificación de nuevas proteínas en relación a su función y ayudaría a comprender como su expresión y modificación es controlada (Thurston y col., 2005). Hay muchos ejemplos en los que han sido caracterizados factores del hospedero que tienen papeles importantes en la infección de los virus (Whitham y Wang, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades virales en tomate producen pérdidas cuantiosas. Recientemente, la enfermedad marchitez manchada en tomate llamó la atención de los investigadores, ya que las técnicas de diagnóstico tradicionales, fallaron para la detección del agente causal tradicional, por lo que se llegó a la conclusión de que se trataba de un nuevo virus en la región.

La información generada del agente o agentes causales ha sido escasa, su origen a ciencia cierta es desconocido y no hay una técnica disponible y de fácil aplicación, para que se pueda identificar. Por lo que ha surgido la necesidad de implementar herramientas alternativas como la proteómica, que ayuden a detectar rápidamente y de manera confiable, tanto nuevos agentes causales de origen viral, como sus variantes, así como el de aportar estrategias que ayuden al conocimiento de nuevos virus en plantas para poder hacer un manejo adecuado de los cultivos, evitando en tiempo y forma que estos sean afectados severamente.

IV. HIPÓTESIS

Mediante proteómica se pueden identificar proteínas de la cápside de virus en plantas de tomate con síntomas de marchitez manchada.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar mediante técnicas de proteómica las proteínas de la cápside del agente causal de la enfermedad marchitez manchada en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

5.2. Objetivos específicos

Separar mediante electroforesis bidimensional proteínas tanto de plantas sanas como enfermas para determinar sus perfiles diferenciales.

Utilización de anticuerpos específicos contra proteínas de la cápside de virus potencialmente relacionados a la sintomatología para corroborar su naturaleza viral.

Caracterizar mediante espectrometría de masas la proteína diferencial que haya resultado inmunoreactiva a anticuerpos contra el agente causal.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia general

La estrategia general de trabajo seguida en el presente estudio (Figura 9).

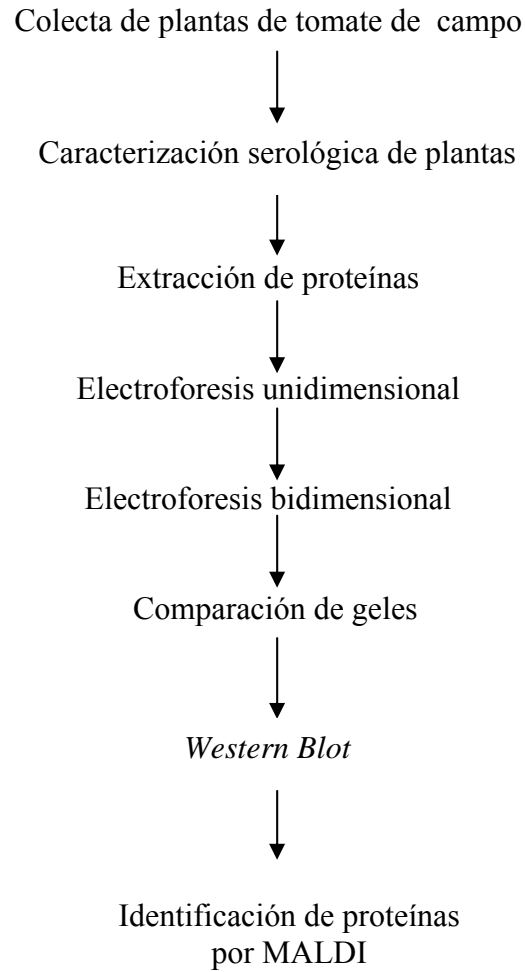


Figura 9. Estrategia general.

6.2. Materiales

6.2.1. Material biológico

Para el análisis proteómico, se colectaron 2 plantas sintomáticas y 2 plantas asintomáticas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), de la variedad gavilán con mes y medio de transplante y antes del periodo de floración, colectadas de campo en mayo del 2006, en el municipio de Guasave Sinaloa, México, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C, para el posterior análisis.

Para evaluar hospederos alternos por serología, se colectaron 2 plantas de teresitas (*Catharanthus roseus*) sintomáticas, y tres plantas de bleo (*Amaranthus retroflexus*) sintomáticas (colectadas de los jardines del pasillo del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa en noviembre del 2007) (Figura 18), respectivamente y se almacenaron a 4 °C.

6.2.2. Anticuerpos

Se emplearon anticuerpos policlonales y su conjugado con la enzima fosfatasa alcalina desarrollados con partículas virales purificadas del *Tomato Necrosis Apex Virus* (ToANV), donados por el Dr. Máximo Turina (Turina y col., 2007) del Laboratorio de Virología Vegetal, Torino, Italia. Se emplearon anticuerpos comerciales del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del jaspeado del tabaco (TEV), virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), virus de la mancha anular del tomate (ToRSV), virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), virus clorótico del tomate (ToCV), virus de la infección clorótica del tomate (TICV), virus Y de la Papa (PVY), virus X de la papa (PVX), virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV), virus S de la papa (PVS), virus A de la papa (PVA), virus M de la papa (PVM), provenientes de la casa comercial AGDIA (Elkhart, Indiana, USA).

6.2.3. Reactivos químicos

Se empleó fenol saturado con Tris pH 7.9, glicina ultrapura, marcador molecular Benchmark Prestained Protein Ladder (No. de catálogo 10748-010), marcador molecular Benchmark Protein Ladder (No. de catálogo 10748-012), Quant-iT™ Protein Assay Kit se adquirieron de la casa comercial Invitrogen, (Eugene, Obregón, USA).

Los reactivos azul de bromofenol, sustrato líquido para membranas: BCIP/NBT-Blue (No. de catálogo B3804), β - mercaptoetanol, ácido etilendiamintetracético (EDTA), inhibidor de proteasas, iodoacetamida, polivinilpolipirrolidone (PVPP), dodecil sulfato de sodio (SDS), tiourea, urea, se adquirieron de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los reactivos acetato de amonio, ácido clorhídrico, ácido acético, azida de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, etanol, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, fosfato de potasio dibásico, glicerol, se adquirieron de la casa comercial Fagalab (Mocorito, Sin. México).

El aceite mineral, agarosa de bajo punto de fusión (overlay), agua nanopura, anfolitos, azul de Coomasie R-250, chaps, ditriotreitol (DTT), membrana de PVDF (No. catálogo 162-0184), Tris; tiras IPG 7 cm rango 4 -7 (No. de catálogo 163- 2001) y 3-10 (No. de catálogo 163-2000), se adquirieron de la casa comercial Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

El buffer general de extracción ELISA, para-nitrofenil fosfato, Tween 20, se adquirió de la casa comercial Agdia (Elkhart, Indiana, USA).

La solución Destreak se adquirió de la casa comercial Amersham Biosciences (Buckinghamshire, United Kingdom).

El agua grado HPLC, metanol grado HPLC se adquirió de la casa comercial Karal (León, Gto.).

6.3. Métodos

6.3.1. Caracterización serológica de plantas colectadas

Se tomaron fotos representativas de los síntomas presentados por las plantas colectadas, y se describieron detalladamente. Para descartar agentes causales de origen viral conocido en las plantas de tomate a utilizar en el análisis proteómico, estas se evaluaron mediante la prueba inmunoenzimática, DAS-ELISA, para los virus AMV, CMV, TMV, TEV, TRSV, ToRSV, TSWV, ToCV, TICV, PVY, PVX, PLRV, PVS, PVA, PVM, y para determinar presencia o ausencia del virus ToANV en estas plantas, se utilizó la misma técnica.

Para determinar hospederos alternos del virus ToANV se analizaron también por DAS-ELISA, pero únicamente para este virus, dos plantas de teresitas (*Catharantus roseus*), y tres de bleo (*Amaranthus retroflexus*).

6.3.1.1. Prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos (DAS-ELISA)

Se utilizó la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reportado por Cruz y Farías, (1997) (Figura 10). Los anticuerpos (gammaglobulina) específicos para cada agente patogénico se utilizaron a una dilución (1:300, en el caso de los anticuerpos comerciales (Agdia), y 1:500 para el anticuerpo policlonal contra ToANV. Las muestras se colocaron en relación 1:10 p/v. Las pruebas que resultaron positivas se analizaron una segunda vez para su confirmación.

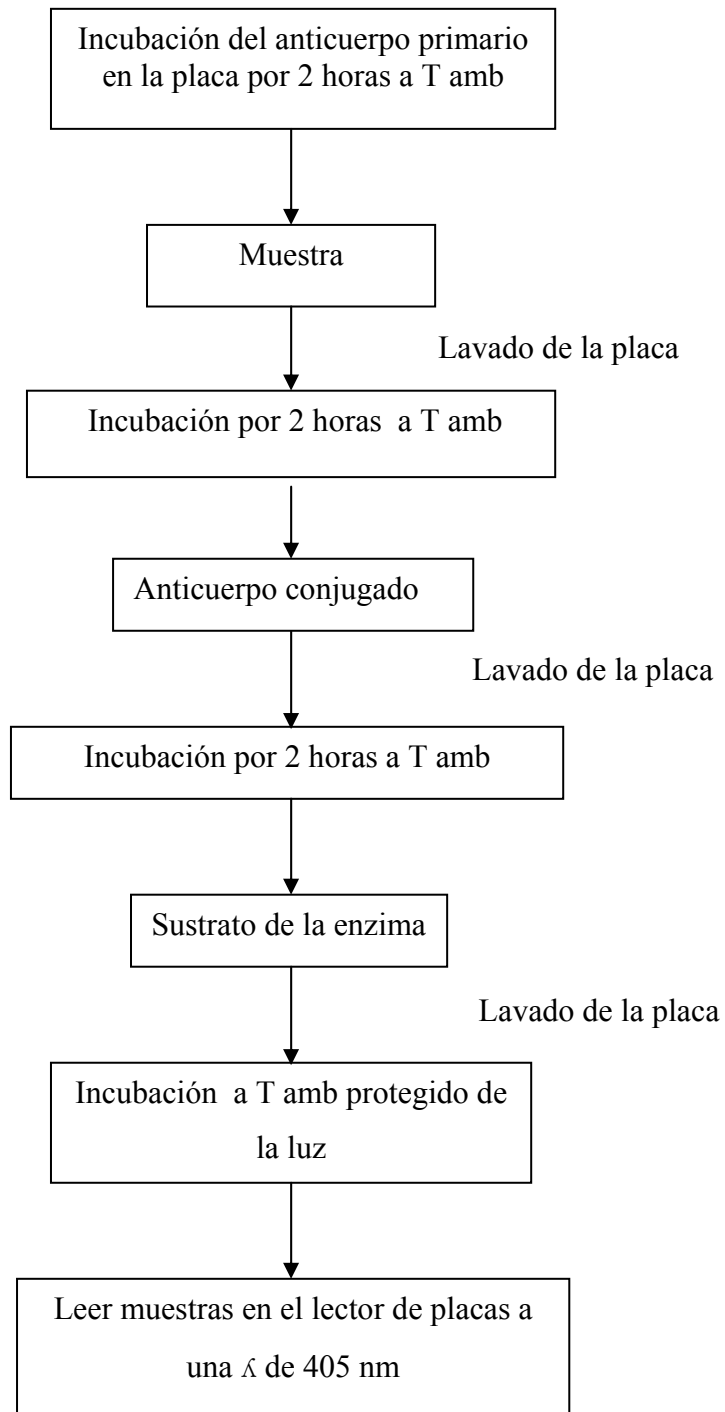


Figura.10. Diagrama de flujo de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos (DAS-ELISA).

6.3.2. Prueba de inoculación con extracto de plantas de tomate con síntomas de marchitez manchadas y positivas con DAS- ELISA para el virus ToANV.

Se inocularon plantas de tomate y de teresitas, por infiltración de los extractos de tejido positivo de tomate para ToANV en plantas de tomate variedad gavilán, para probar que el agente causal provocaba los síntomas característicos, conjuntamente con esto obtener muestras en condiciones más controladas para el análisis proteómico y en teresitas la infiltración se hizo con el fin de purificar el virus.

El tejido positivo de tomate congelado y molido, se usó en relación 1:10 en buffer de extracción (sulfito de sodio 0.13 %, PVP 2 %, leche descremada 0.2 %, tween-20 2 %, azida de sodio 0.02 % diluido en buffer de lavado) pH 7.4 para el virus ToANV, se mantuvieron a temperatura constante 28 °C, se registraron síntomas y se analizaron por DAS-ELISA a los 15 días post inoculación (dpi). Como control negativo, las plantas fueron infiltradas con buffer de extracción.

6.3.3. Análisis proteómico

El análisis proteómico, se hizo con la finalidad de identificar las proteínas de la cápside de manera diferencial en las dos plantas de tomate positivas para el virus ToANV, confrontadas con dos plantas de tomate negativas para este virus, como controles y evaluadas con la prueba DAS-ELISA. Para llevar a cabo el análisis proteómico, es necesario estandarizar las condiciones de extracción del tejido foliar de las plantas de tomate, ya que como se ha mencionado anteriormente, estas condiciones varían de tejido a tejido. Tomando como base el método de extracción de solubilización con fenol de Hurkman y Tanaka (1986), también se estandarizó las condiciones de electroisoelectroforesis, donde se ensayaron los rangos de pH de 3-10 y 4-7, del rango de 4-7 se hicieron 3 repeticiones experimentales de las dos réplicas biológicas de la condición enferma (positiva para el virus ToANV) y una réplica biológica para la condición sana (negativa para el virus ToANV), se compararon en el programa Gelscape para identificar las proteínas diferenciales y aproximar los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de estas proteínas.

6.3.3.1. Optimización del método de extracción de proteínas

Se tomó como punto de partida el método de extracción por fenol, utilizado para tejidos vegetales recalcitrantes, reportado por Hurkman y Tanaka (1986). El método se basa en la extracción de las proteínas que se solubilizan en fenol saturado (Phe). Para optimizar, este método se ensayó adicionando PVPP como agente “secuestrante” de fitoquímicos y sin PVPP, además se evaluó el efecto de lavados de la pastilla con solventes orgánicos (acetona y metanol preenfriados a -20 °C), que tiene como objeto eliminar moléculas no proteicas y sales, para el rendimiento de la proteína se probó con diferentes ciclos de sonicación y cantidad del agente reductor β -mercaptoetanol, las proteínas se solubilizaron en buffer IEF. El método final optimizado fue el siguiente:

El tejido vegetal fue finamente molido con nitrógeno líquido usando pistilo y mortero 0.2 g de tejido molido fue resuspendido en 500 μ L de buffer de extracción (Polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1%, glucosa 0.7 M, KCl 0.1 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, Etilendiamintetracético (EDTA) 5 mM, β -mercaptoetanol 2%). La mezcla fue extensivamente homogenizada en hielo a 2 °C con un macerador de tejidos marca Cole Parmer por 15 minutos, para romper las células vegetales. Posteriormente se adicionó fenol saturado con Tris-HCl pH 7.5 (500 μ L) y la mezcla fue rehomogeneizada por 30 minutos a 2 °C y finalmente centrifugada a 13,000 rev/min a 4 °C por 30 min. Las proteínas del extracto fueron precipitadas a partir de la fase final de fenol con 5 volúmenes de acetato de amonio saturado en metanol a -20 °C toda la noche a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rev/min a 4 °C por 30 min. El sobrenadante se removió cuidadosamente con una pipeta y se desechó, la pastilla que contiene las proteínas vegetales, se resuspendió de nuevo en 2 volúmenes de metanol saturado con acetato de amonio preenfriado (-20 °C), se incubó a -20 °C por 15 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 13, 000 rev/min. Se removió el sobrenadante y la pastilla se incubó a 37 °C, en una placa de calentamiento por 5-10 minutos o hasta que estuviera totalmente seca. Se colocó inmediatamente en hielo y se resuspendió en buffer de solubilización (urea 7 M-tiourea 2 M). Se centrifugó por 5 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, la proteína solubilizada se almacenó a -70 °C para su posterior uso (Figura 11).

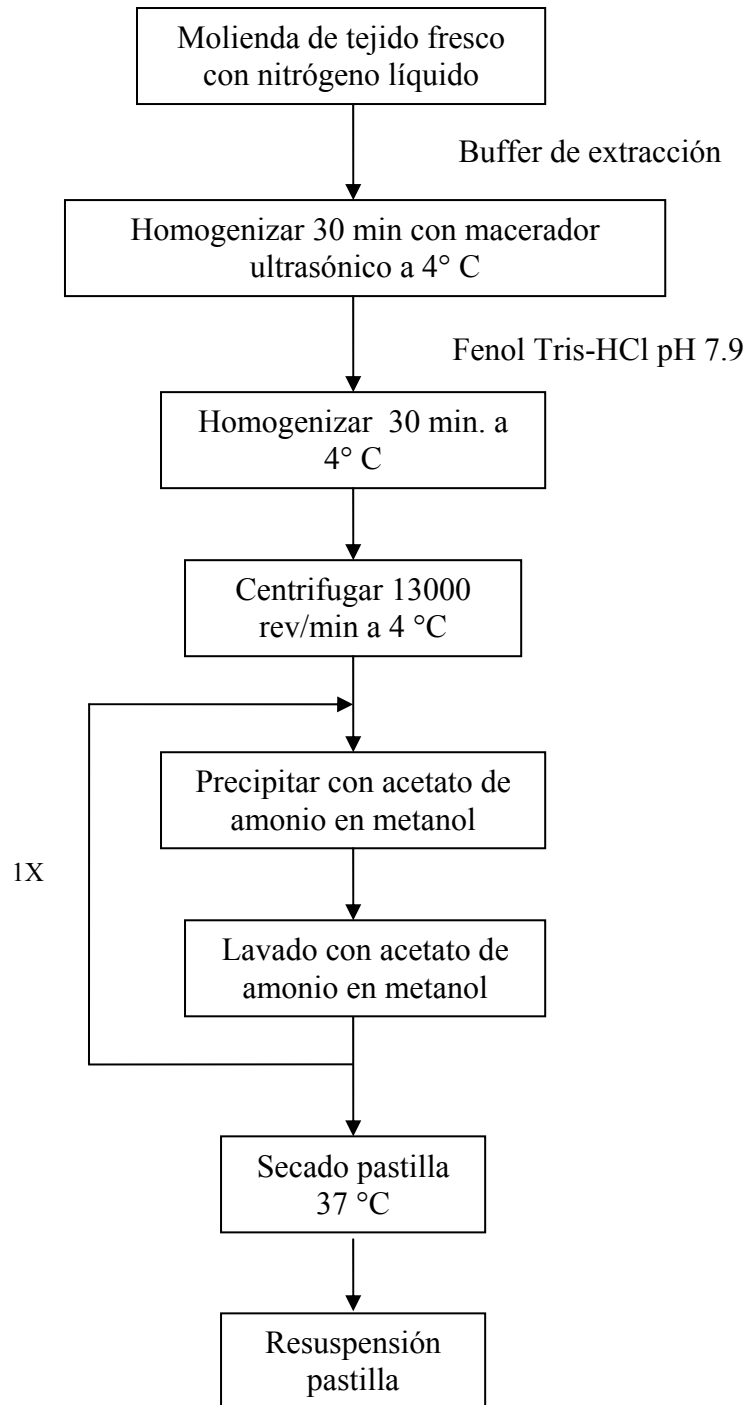


Figura 11. Diagrama de flujo de la extracción de proteínas por fenol modificado (Hurkman y Tanaka, 1986) y optimizado para hoja de tomate.

6.3.3.2. Cuantificación de proteínas

La proteína obtenida se cuantificó con el kit comercial Quant-It™ Protein Assay Kit (Invitrogen) que se basa en la unión de un fluoróforo específico a proteínas. Todos los reactivos deben utilizarse a temperatura ambiente. Este kit contiene 3 estándares a las siguientes concentraciones: estándar 1: 0 ng/μL, estándar 2: 200 ng/μL, estándar 3: 400 ng/μL de albúmina de suero bovina (BSA) en buffer TE con las cuales se calibra el equipo Qubit™ fluorómetro (Cat. No. Q32857) (Marca Invitrogen). La solución madre y el fluoróforo (fluorescencia máxima excitación/emisión: 470/570 nm) con los cuales se conforma la solución de trabajo. Siendo el rango de concentración de proteína a la que se puede leer de 0.25-5 μg/mL. Por lo cual, se hicieron diluciones de la muestra 1:100 en buffer (urea 7 M-tiourea 2 M).

Se prepararon 200 μL de solución de trabajo por cada tubo de reacción, incluyendo los tres estándares, la cual se obtuvo mezclando 1 μL de solución A (Fluoróforo), con 199 μL de solución B. Se aplicó vortex por 2-3 segundos y se colocó en cada tubo para lectura 190 μL de solución de trabajo y 10 μL de muestra, se aplicó vortex por 3 segundos a cada tubo, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyó en el fluorómetro Qubit™ fluorómetro (Invitrogen) (Figura. 12).

La concentración de proteína se calculó con la siguiente fórmula:

$$[C] = QF \times (200 / X)$$

Dónde:

[C]= concentración de la muestra en μg/mL

QF= el valor dado por el Qubit™ fluorómetro

X= el número de microlitros de muestra que adicionados a cada tubo.

Se multiplicó por el factor de dilución para determinar la concentración de la muestra original.

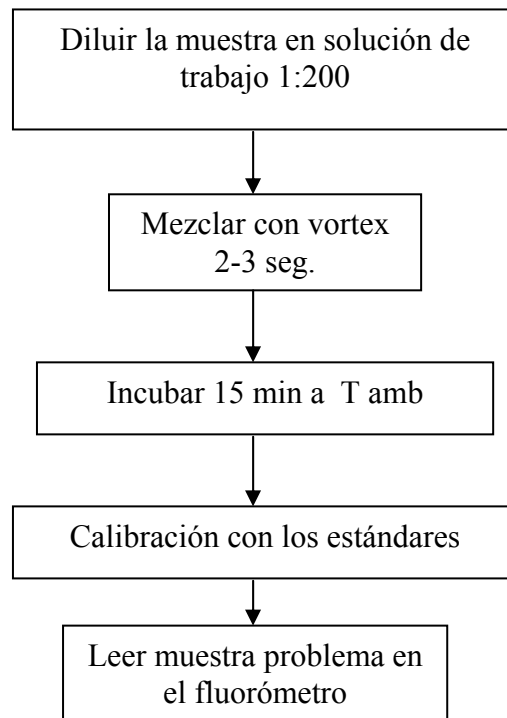


Figura. 12. Diagrama de flujo del método fluorométrico para la cuantificación proteína.

6.3.3.3. Electroforesis en gel desnaturizante (SDS–PAGE)

Para evaluar la calidad de las proteínas extraídas y realización en ensayo *Western blot*, las proteínas extraídas se separaron en base a su peso molecular en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10 y 12% de acrilamida, Se cargaron 10 µg de proteína en buffer de carga, y para los geles que se utilizaron en el *Western blot* se cargaron 40 µg en gel de acrilamida al 12%, calentándose a 100 °C en un tubo eppendorff por 5 min, después se colocó en hielo, se mezcló mediante vortex, se colocaron de 10 a 20 µL de solución de carga, y se aplicaron 100 V por 2 hrs aproximadamente.

6.3.3.4. Electroforesis bidimensional

En la electroforesis bidimensional se separaron las proteínas de los extractos de las plantas de tomate por punto isoeléctrico, primera dimensión y por peso molecular, segunda dimensión.

6.3.3.4.1. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

En la separación por punto isoeléctrico, se estandarizaron variables como rango y longitud del gel de pH Inmovilizado (IPG ó tira IPG) la cantidad de proteína cargada a la tira IPG, la cantidad de anfolitos, la composición del buffer de hidratación, tipo de hidratación, gradiente de voltaje, y el voltaje empleado en el enfoque sobre la tira IPG.

El electroisoelectroenfoque se realizó en el sistema Protean IEF Cell Bio-Rad, el máximo de voltaje aplicado, sobre la longitud de la tira IPG fue de 4000 V para tiras de 7 cm. El equipo brindó bajo estas condiciones un óptimo máximo de longitud de campo de ~ 600V/cm., de tiras de IPG, y se manejó un límite de 50 mA por tira. Las tiras de pH inmovilizado IPG de 7 cm, se hidrataron con 100 µg de proteína previamente cuantificadas y se resuspendieron en buffer IEF (125 µL de urea 7M-tiourea 2M o en su defecto se utilizó la solución Destreak (Amersham Biosciences), suplementados con 0.5% de anfolitos) el cuál se equilibró en agitación suave por 2 horas y se hidrataron por 12 horas a 50 V. Una vez finalizada, se cambió el aceite mineral y se colocaron papeles wicks hidratados con 10 µL de agua nanopura. El enfoque de la tira se hizo con

el siguiente gradiente 500 volts por 15 min, subida de voltaje de manera lineal hasta llegar a 4000 V, y aplicación constante de 4000 V hasta completar 22000 volts/hrs la temperatura fue constante de 20 °C en todo el proceso de electroisoelectroforesis.

6.3.3.4.1.1. Acondicionamiento de las tiras IPG

Si las tiras fueron almacenadas a -70 °C, se temperizaron por 15 min a temperatura ambiente antes de usarse. Se adicionaron 1.5 mL de buffer de equilibrio por tira, primero se equilibró la tira con el buffer I SDS-PAGE de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 2% (p/v)) por 15 min en agitación suave, se siguió el mismo paso con el buffer II SDS-PAGE de equilibrio (6M urea, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5 % (p/v)), adicionando en fresco el DTT y la iodoacetamida.

6.3.3.4.2. Segunda dimensión: Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE)

Se emplearon geles desnaturantes en un tamaño aprox. de 80x90x1 milímetros. Los geles se prepararon de acuerdo a Laemmli (1970). Una vez acondicionadas las tiras de pH inmobilizado, estas se colocaron sobre la parte superior del gel, en el extremo positivo de la tira se colocó un “cuadrado” de papel filtro (wicks) prehumedecido con 7 μ L de marcador molecular Benchmark (Invitrogen), y se cubrió con agarosa de bajo punto de fusión (0.5 % en buffer de corrida). Los geles se corrieron en la cámara Hoeffer miniEV (Amersham Biosciences) a 100 volts por aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente.

6.3.3.4.3. Visualización de proteínas

Una vez terminada la electroforesis, los geles se colocaron en una charola de plástico con tapa y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R-250. El gel fue cubierto con solución de tinte (azul de Coomassie R-250, 1% p/v, metanol 45%, ácido acético 10%) y se mantuvo en agitación suave por 12 horas, posteriormente el exceso de azul de Coomassie fue eliminado y se reemplazó la solución de tinte con solución de destinte (metanol 10%, ácido acético 10 %).

6.3.3.4.4. Fotodocumentación y análisis de geles

Los geles 2-DE se fotodocumentaron con el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Se utilizó el programa Quantity-One y se analizaron las fotos de los geles comparativos con el programa Gelscape (<http://www.gelscape.ualberta.ca>).

6.3.3.4.5. Determinación del punto isoeléctrico y peso molecular de las proteínas de geles bidimensionales

La asignación de valores de peso moleculares, se realizaron tomando como referencia las proteínas del marcador molecular comercial y para la determinación del punto isoeléctrico se tomó en cuenta que se utilizaron tiras de electroisoelectroforesis con gradiente lineal, y por lo tanto, las diferentes unidades de punto isoeléctrico, se calcularon con el programa Gelscape (<http://www.gelscape.ualberta.ca>).

6.3.4. Detección inmunológica de las proteínas del virus ToANV (*Western blot*)

Esta técnica se utilizó para detectar proteínas de la cápside, del virus ToANV en los extractos de proteínas de la parte aérea de tomate, para comprobar si con este método se habían extraído proteínas de la cápside, cuantas y de que peso molecular en los geles de primera dimensión, en los geles de segunda dimensión también se hizo el *Western blot*, para identificar cuales y cuantas, de las proteínas diferenciales obtenidas por el método de extracción de proteínas utilizado y resueltas en los geles bidimensionales entre plantas problema y control pertenecían al virus ToANV y cuales a reacciones de la planta a la infección.

Para el *Western blot* de primera dimensión, se cargaron 40 µg de proteína en cada pozo en geles de poliacrilamida al 12%, y para los de segunda dimensión se cargaron 200 µg de proteína en cada tira, se utilizaron las siguientes condiciones de electroisoelectroforesis subida lenta de voltaje y se aplicó 28000 VH al 12%, cada corrida se hizo por duplicado; un gel se utilizó para la transferencia y el segundo gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 como referencia y selección de proteínas para identificación. Para la transferencia se utilizó membrana de PVDF en el equipo Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell (Bio-Rad) por 1 hora a 50 volts por gel, se empleó el anticuerpo policlonal

anti-ToANV conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Turina y col., 2007) a una dilución 1:10,000 y se reveló con el sustrato líquido para membranas: BCIP/NBT-Blue (Sigma- Aldrich) (Figura 13).

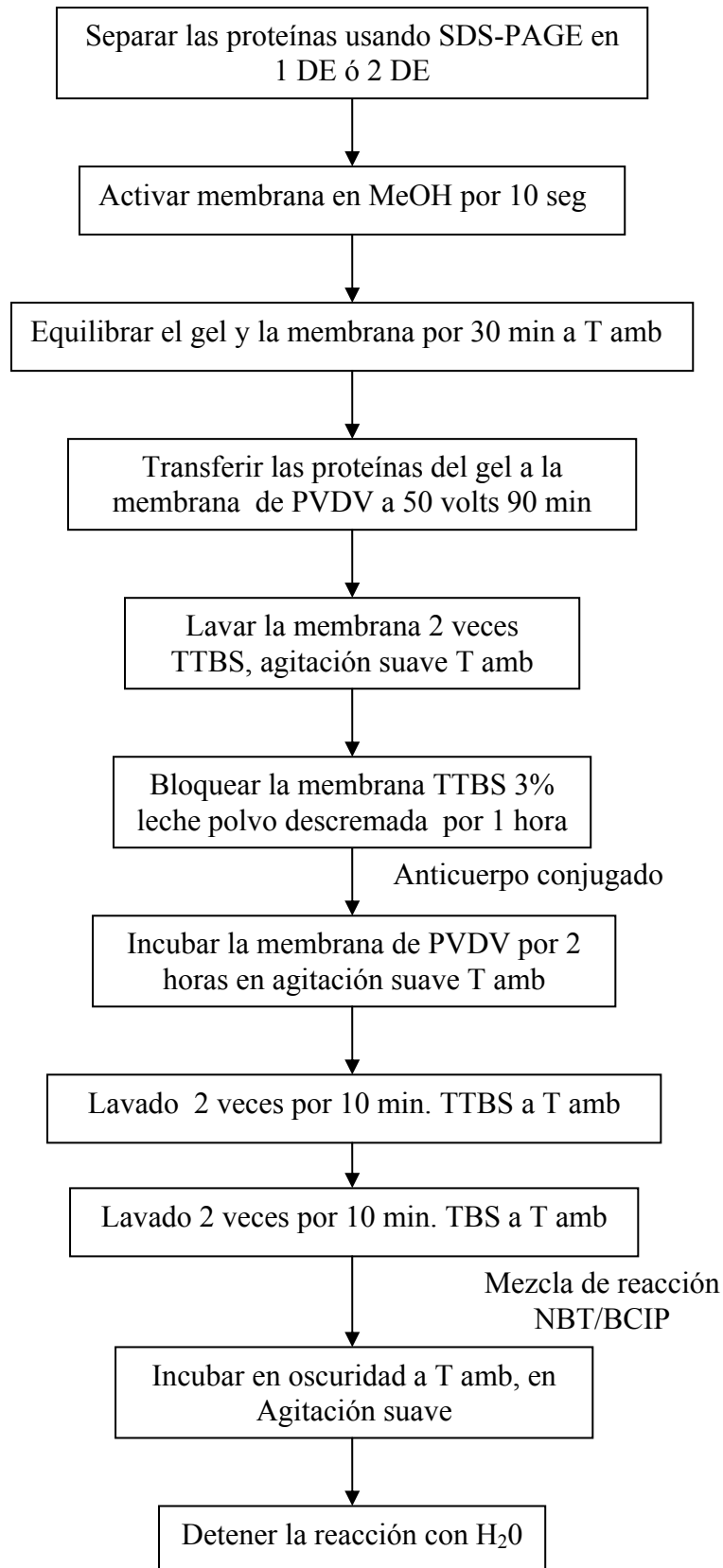


Figura. 13. Diagrama de flujo del ensayo de inmunodetección (*Western blot*).

6.3.5. Identificación de proteínas por huella peptídica de masas PMF

La proteína se identificó en el Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, en el equipo MALDI marca Applied Biosystem, mediante la técnica de mapeo proteolítico de masas (PMF por sus siglas en inglés).

Las proteínas seleccionadas a partir de la inmunodetección (*Western blot*), y/o a partir de los geles comparativos, se cortaron de los geles de acrilamida con una punta para micropipeta cortada al tamaño aproximado de la proteína, para evitar contaminación se realizó en campana de flujo laminar y se colocaron en un tubo eppendorf en metanol al 50%, se almacenaron a -20 °C, como paso previo a la identificación.

6.3.5.1. Preparación de la muestra para espectrometría de masas

Todos los geles de los cuales las bandas o *spots* se cortaron para el análisis de espectrometría de masas se prepararon de tal manera que se minimizara la contaminación por polvo o queratinas. Se utilizó el siguiente protocolo modificado (Shevchenko, 1996) se utilizó una matriz de ácido α -ciano-4- hidroxicinámico (Figura 14). Se hicieron 4 repeticiones en el MALDI, para obtener un espectrograma bien calibrado, los picos resultantes se exportaron y analizaron en dos programas de cómputo disponibles en Internet, para la identificación de la proteína.

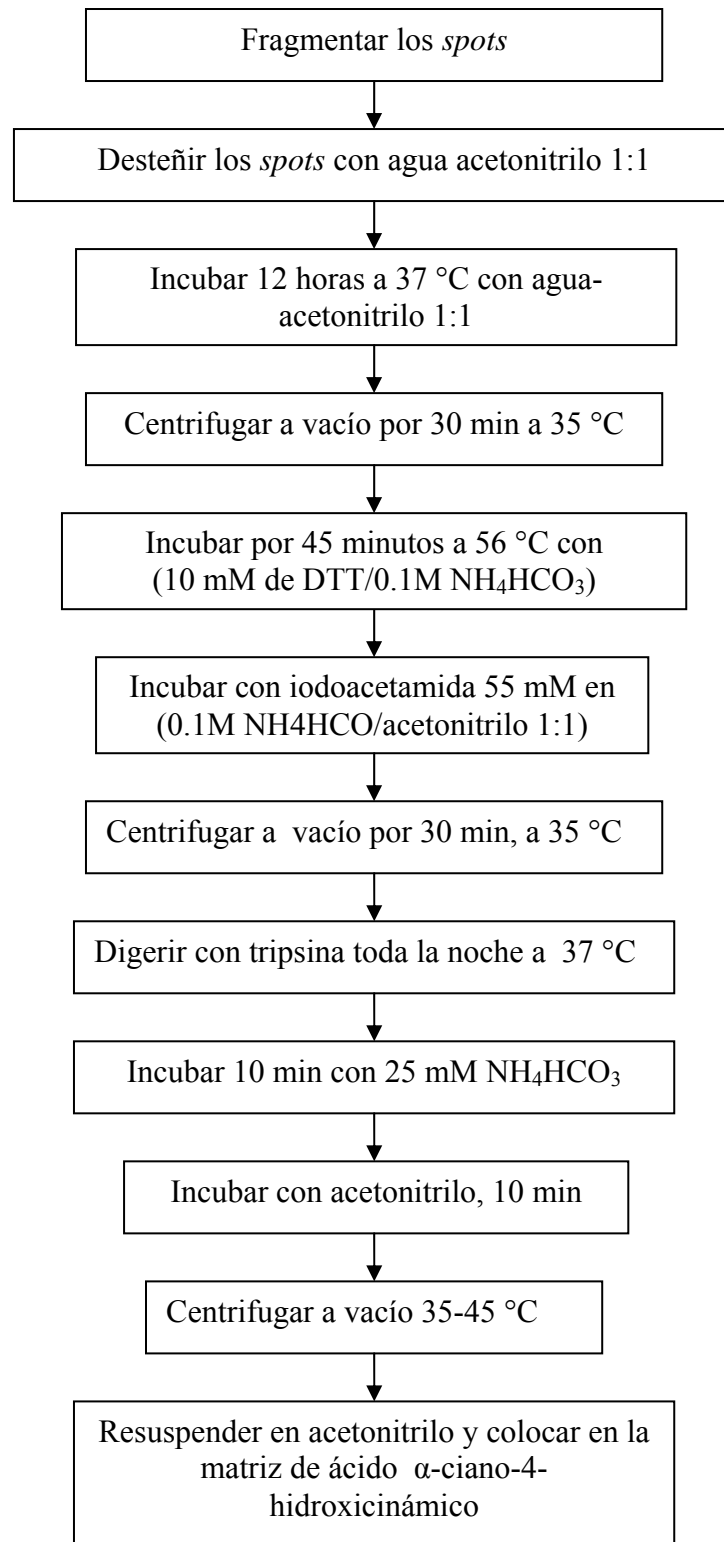


Figura 14. Diagrama de flujo para la preparación de proteínas para espectrometría de masas (Shevchenko y col., 1996).

6.3.5.2. Análisis bioinformático de los espectros de masas

Se utilizaron alternativamente dos programas informáticos ALDENTE (Expasy) y MASCOT (Perkins y col., 1999). Ambos programas utilizan un protocolo de búsqueda denominado MOWSE (Daresbury, UK) <http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>, para la comparación de los listados de masas medidos con MALDI-TOF, con las masas de péptidos de digestiones teóricas de proteínas recogidas en bases de datos (NCBI, UniprotKB/TrEMBL, Swiss-prot/TrEMBL). Se generó en este análisis, listas priorizadas de proteínas que presentan una mayor probabilidad de corresponderse con la identidad de las proteínas analizadas.

El programa MASCOT y ALDENTE se alimentaron con los valores m/z de los picos arrojados por el análisis MALDI y datos adicionales de búsqueda como peso molecular de la proteína, punto isoeléctrico, modificaciones fijas y variables (oxidación-reducción), entre otras. Los parámetros para asignar una identificación inequívoca en el análisis bioinformático obtenidos mediante la alimentación de los péptidos experimentales y su correspondencia con las digestiones teóricas de las proteínas en las bases de datos son: péptidos alineados (*peptide matched*); probabilidad asociada a cada búsqueda (*score*); y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptidos que hemos podido identificar (*sequence coverage*). Cuanto mayor sean estos tres parámetros, mayor es la probabilidad de una identificación correcta (Casado-Vela, 2003). Los valores umbral de estos tres parámetros son $score \geq 1 \times 10^{-3}$, $peptide\ matched \geq 3$ y $sequence\ coverage \geq 25$, además se toma en cuenta el punto isoeléctrico calculado, tomándose como referencia un error permitido de ± 0.5 de unidad.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Sintomatología y caracterización serológica del material colectado

7.1.1. Descripción de los síntomas de las plantas colectadas

Los síntomas característicos de la enfermedad marchitez manchada encontrados en las plantas de tomate colectadas son marchitez general de la planta, rayadura en el tallo, necrosis en las hojas y en la parte apical. Principalmente se observaron daños en la parte apical de las plantas (Figura 15 B). Estos síntomas son similares a los reportados por Turina y col. (2007) para los síntomas generados por el virus ToANV en tomate, las plantas en esta etapa, no presentaban flores ni frutos (Figura 15 A).

7.1.2. Descripción de síntomas en hospederos alternos

También se observó sintomatología en plantas de ornato común en la región llamadas comúnmente teresitas (*Catharanthus roseus*) en las que se observaron lesiones necróticas, como anillos café en hojas, también estando necrosadas los botoncillos de las flores, y amarillamiento intervenial (Figura 16), positivo en la prueba DAS-ELISA (Tabla 5) para el virus ToANV, esta planta se reportó como hospedero experimental, con síntomas de deformación y mosaico, en las plantas de campo, se observó la deformación en las hojas reportado por Turina y colaboradores (2007), con la diferencia de síntomas que en campo se observaron anillos necróticos reportados para tomate y amarillamiento intervenial reportado solo para inoculación mecánica de muestras de tomate provenientes de campo a *Nicotiana benthamiana*. Este virus suele ser muy agresivo y por lo tanto, atacando principalmente la parte apical, las plantas presentan muerte regresiva, esta se observó, pero en algunas varas que estaban seriamente infectadas y posteriormente en la planta entera. El lugar de colecta de estas plantas fueron los jardines del CIIDIR-SIN.

Turina y colaboradores en el 2007, reportaron la presencia de un nuevo virus en Culiacán y Obregón denominado ToANV. Este virus citan los autores genera los

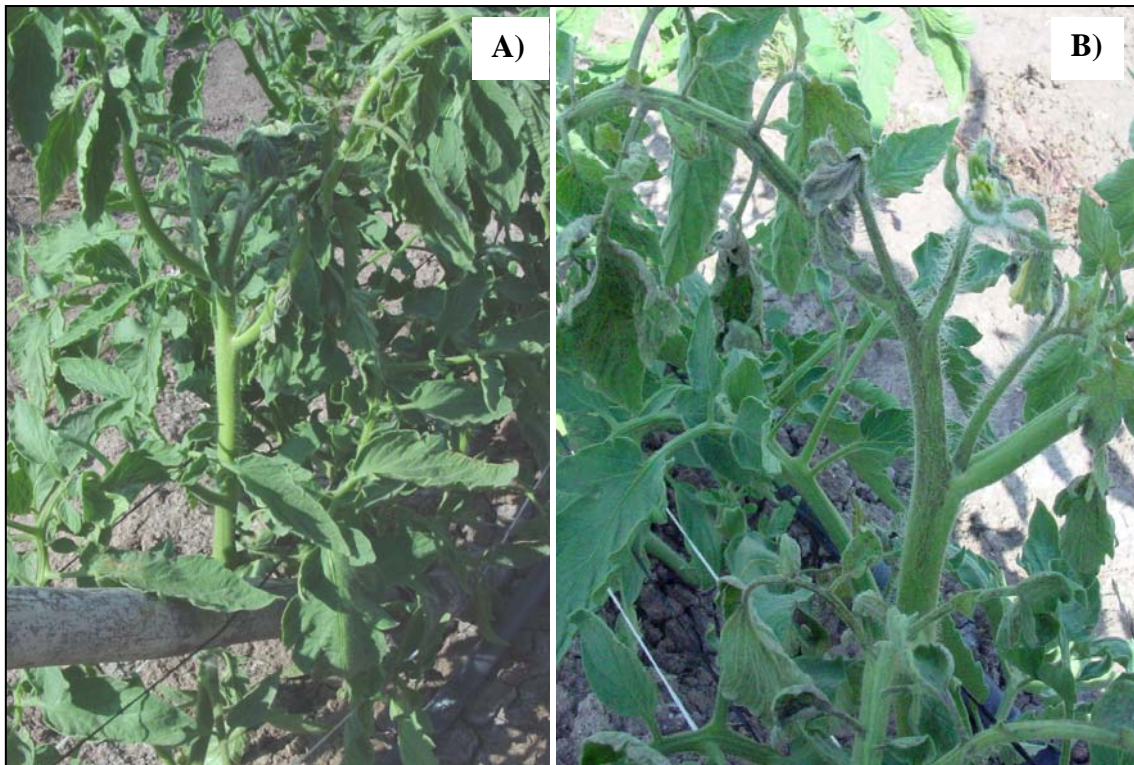


Figura 15. Síntomas de marchitez manchada en plantas de tomate colectadas. A) planta asintomática, B) planta con síntomas de marchitez manchada.



Figura 16. Teresita (*Catharanthus roseus*) con síntomas de virosis afectando parte aérea. Amarillamiento intervenial, deformación de la hoja, anillos necróticos café en la parte apical.

síntomas de marchitez manchada que se presento recientemente en los cultivos de tomate en Sinaloa. Empleando anticuerpos policlonales generados con el virus purificado ToANV, se logró detectar la presencia del virus en las plantas colectadas en campo, debido a la falta del virus purificado, para ser utilizado, como un estándar, las pruebas ELISA, no se pudieron hacer de manera cuantitativa, por lo cuál, en las plantas positivas, no sabemos que cantidad de virus tenemos en cada planta positiva analizada.

7.1.3. Detección del virus ToANV por DAS-ELISA en plantas de tomate con síntomas de marchitez manchada

Los resultados de las pruebas de ELISA dieron positivos para las plantas de tomate colectadas con síntomas, no así para las plantas asintomáticas, por lo que se corrobora la presencia del virus ToANV o una variante cercana de este en el material colectado. En la Tabla 2, se observan los resultados obtenidos de dos plantas sintomáticas y dos plantas asintomáticas. Estas plantas también fueron analizadas para los virus (AMV, CMV, TMV, TEV, TRSV, ToRSV, TSWV, ToCV, TICV, PVY, PVX, PLRV, PVS, PVA y PVM) datos no mostrados, ya que estos fueron negativos, sin embargo con esto se descartaron otros posibles virus de la región que infectan tomate en estas plantas.

Tabla 2. Resultados de la prueba DAS-ELISA para el virus ToANV obtenidas de plantas de tomate colectadas en campo para el análisis proteómico

Muestra	ToANV
Tomate asintomático 1	-
Tomate asintomático 2	-
Tomate marchitez 1	+
Tomate marchitez 2	+

Nota: Se resalta en negrita los resultados positivos, dónde (+) es positivo y (-) es negativo.

7.1.4. Detección del virus ToANV por DAS-ELISA en hospedantes alternos con síntomas de marchitez manchada

Se colectaron en campo plantas de teresita la cuál presentaba síntomas de virosis y bledo, que y se analizaron por DAS-ELISA para el virus ToANV, para determinar si

estos eran hospederos naturales alternos de este virus en la región, solo resultaron positivas para este análisis las teresitas marchitez 1 y 2 (Tabla 3)., las plantas de bledo resultaron negativas.

Tabla 3. Resultados de la prueba DAS-ELISA para el virus ToANV en hospederos alternos

Muestra	ToANV
Teresita marchitez 1	+
Teresita marchitez 2	+
bledo sintomático 1	-
bledo sintomático 2	-
bledo sintomático 3	-

Nota: Se resalta en negrita los resultados positivos, dónde (+), es positivo y (-) es negativo.

7.1.5. Experimentos de infiltración en teresitas (*Catharanthus roseus*)

En el experimento de infiltración, las plantas inoculadas (tres macetas alineadas en la parte frontal (Figura 17 A) resultaron positivas para la prueba de DAS-ELISA (Tabla 4), en cuestión de síntomas, una de las plantas se marchitó rápidamente y las demás inoculadas, solo estaba necrosada la parte apical, a los 15 días después de la inoculación (Figura 17 B) el síntoma de necrosis apical, observado en las plantas inoculadas fue resaltado en un círculo amarillo (Figura 17 B). Las plantas control, plantas de las tres macetas posteriores no presentaban estos síntomas, y resultaron negativas por DAS-ELISA (Tabla 4) sin embargo no se observaron los síntomas característicos de anillos necróticos, ni amarillamiento intervenial, observados en las plantas de teresita positivas para ToANV por DAS-ELISA analizadas de campo lo cual, puede deberse a la cantidad de virus en las plantas y a factores ambientales, ya que estas plantas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura.

Se observó mediante la prueba de ELISA que las plantas positivas para el virus ToANV fueron: 2, teresita marchitez 1 y teresita marchitez 2. Por lo que se podría considerar que

las muestras presentan el virus ToANV o alguna variante cercana a este, dado que la técnica ELISA no genera resultados contundentes.

Tabla 4. Resultado de la prueba DAS-ELISA para teresitas (*Catharanthus roseus*) inoculadas por infiltración con tejido de tomate positivo para el virus ToANV

<i>Muestra</i>	ToANV	<i>Muestra</i>	ToANV
teresita control 1	-	teresita inoculada 1	+
teresita control 2	-	teresita inoculada 2	+
teresita control 3	-	teresita inoculada 3	+

Nota: Se resalta en negrita los resultados positivos, dónde (+), es positivo y (-) es negativo.

También se inocularon plantas de tomate por infiltración, las cuales se contaminaron con otros virus, debido a la presencia de insectos vectores que atacan al tomate, presentes en la región, por lo no se pudieron tener resultados confiables, y no se reportan en esta tesis.



Figura 17. Experimento de infiltración en teresitas (*Catharanthus roseus*). A) Plantas inoculadas por infiltración con el virus ToANV y control a los 15 dpi, B) planta control contra planta inoculada.

7.2. Análisis de proteínas

7.2.1. Optimización del método de extracción de proteínas y separación por isoelectroenfoque

Para esta optimización de método de extracción de proteínas se utilizó una planta de tomate a la cual, se hicieron extracciones de proteínas con el mismo método Fenol (Hurkman y Tanaka, 1986), el cual generalmente sufre modificaciones, de acuerdo al objetivo buscado, por lo que se probó la cantidad aproximada de rendimiento y la calidad de los geles 2-D para cada una de las condiciones probadas de la Tabla 5, donde se observa que el promedio del rendimiento de todas las muestras están dentro de un rango de 1.9 a 2.9 mg proteína/g de muestra fresca, dieron cerca de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y en total cerca de 500 μg de proteína por 200 mg de tejido procesado, lo que permite realizar hasta tres geles bidimensionales por extracción. Cabe recalcar que el tener mayor rendimiento de proteína, no necesariamente implica que sea adecuado para la separación bidimensional, por lo que las condiciones se evaluaron como se describirá posteriormente.

Tabla 5. Rendimiento de extracción de proteínas

	Método de extracción de proteínas fenol (Hurkman, 1986).	Promedio de rendimiento mg proteína/g de muestra fresca
A	Fenol con lavados	2.955
B	Fenol sin lavados	2.892
C	Fenol/PVPP con lavados	2.389
D	Fenol/PVPP sin lavados	1.973

Una vez obtenidos estas muestras fueron separadas en base a su peso molecular en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%. En la Figura 18, se muestran las proteínas extraídas por los distintos métodos, donde se observa que aun cuando las proteínas fueron cuantificadas por el mismo método y se trató de cargar en el gel la misma cantidad no se observan homogéneas respecto a la cantidad, esto puede deberse a que el PVPP es un secuestrante de fitoquímicos, pudiéndose haber interferido con la

cuantificación sobre todo en las muestras a las que no se adicionó. Los lavados también ayudan a remover contaminantes y fitoquímicos presentes en las muestras, por lo que este factor también pudo haber creado esta variación en la calidad de los extractos de proteína, la cual fue cuantificada por un solo método para todas las muestras cargadas en el gel de la Figura 18. Pero en general las proteínas se separaron de manera correcta y entre las muestras A, B, C y D, se presenta un patrón electroforético muy homogéneo, las bandas son muy legibles, de buena calidad y se pueden observar proteínas en todos los pesos moleculares, lo cual nos indica que el extracto es una mezcla compleja de proteínas.

Las mismas muestras A, B, C y D, fueron acondicionadas y separadas bidimensionalmente en tiras de pH inmovilizado de 7 cm de un rango de pH de 3 a 10 con un total de 22000 VH aplicados en el isoelectroenfoque y posteriormente separadas en un gel SDS-PAGE al 10% para observar cual era el efecto del PVPP y los lavados en la separación de las mismas por pI y peso molecular, ya que los contaminantes presentes en las muestras afectan el enfoque de las proteínas. Si esto no se realiza de manera correcta, no se puede seguir con el análisis proteómico buscado en este trabajo.

En el gel 2-D de la muestra A (Figura 19 A), se observan estriamientos horizontales y verticales, en el gel 2-D de la muestra B (Figura 19 B), se observa un estriamiento horizontal, mas parecido a un barrido, las proteínas no están bien enfocadas, y sólo se observa como una especie de grandes manchas no muy bien definidas, en el gel 2-D de la muestra C (Figura 19 C), se observan regiones claras, las proteínas no están estriadas, pero no están bien enfocadas y están concentradas en una pequeña región de pH del gel, tampoco están bien separadas por peso molecular lo que puede ser ocasionado por falta de solubilidad de las proteínas. En el gel 2-D de la muestra D (Figura 19 D), se observan proteínas enfocadas en la mayor parte del área del gel y no se observa contaminación en el fondo del gel, lo cual nos indicó que las proteínas obtenidas por este método son las adecuadas para este estudio.

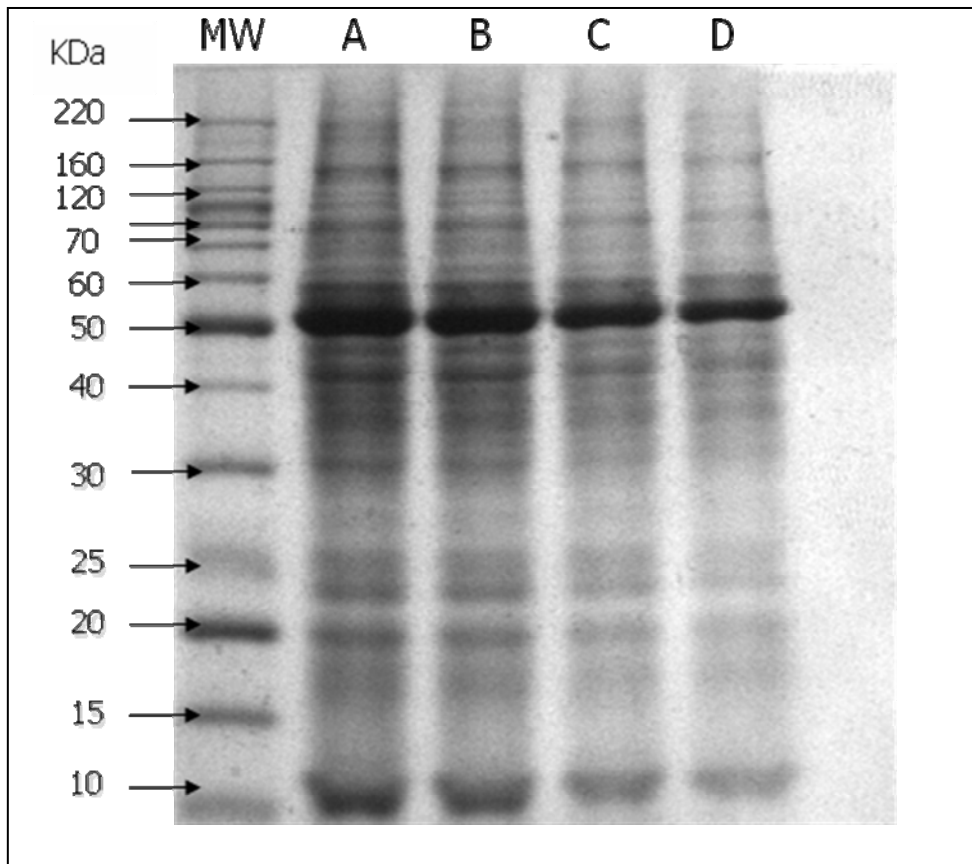


Figura 18. Comparación electroforética entre los distintos métodos de extracción. Gel de acrilamida al 12%. Los carriles A, B, C, D, corresponden a las variaciones en métodos de extracción antes descritos, 10 μ g de cada muestra fueron cargados. MW, corresponde al marcador de peso molecular Benchmark (Invitrogen).

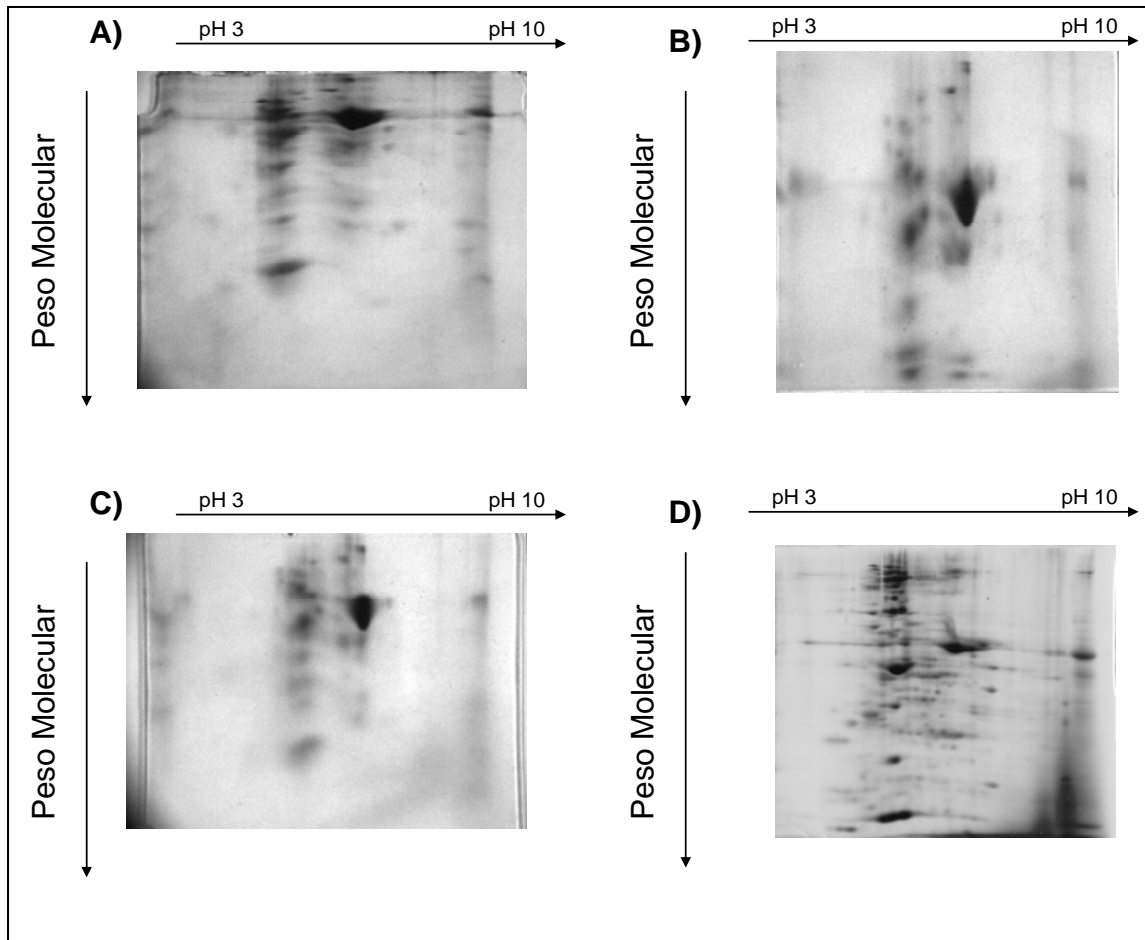


Figura 19. Geles bidimensionales representativos de los distintos métodos de extracción evaluados. A), B), C) y D).

De lo anterior se puede concluir que el método idóneo para la extracción y separación de proteínas en dos dimensiones es el método optimizado D el cual evita lavados extensos con solventes orgánicos, (un problema con el lavado final con acetona, es que la pastilla en este último paso, se oscurece, produciendo oxidación de las proteínas, por lo cual, este solvente se descartó) e incluye el reactivo PVPP que captura contaminantes presentes en tejidos vegetales tales como: fenoles y otros pigmentos. Sin embargo, en este rango de pH de 3-10 y en minigeles, hay todavía *spots*, que pueden corresponder a más de una proteína, eso, no nos ayudaría mucho a la identificación de proteínas de interés. Las proteínas se visualizan de forma más adecuada para los análisis siguientes. En los geles de pH de 3-10, se visualiza acumulación de proteínas en el rango de pH de 4-7, por lo que se separó en el rango de 4-7, en donde las proteínas se separaron de forma más adecuada. Este método fue seleccionado para posteriores extracciones y el rango donde se observan mejor cantidad de proteínas para los extractos es el de pH 4-7, ya que las proteínas alcalinas de 3-10 y de alto peso molecular son difíciles de resolver.

7.2.2. Análisis bidimensional comparativo

Con el objeto de determinar las proteínas que se encuentran expresadas diferencialmente entre las plantas sanas y las sintomáticas, se separaron en tiras IPG de rango de pH 4-7 las proteínas extraídas por el método D de las plantas colectadas. En la Figura 20, se observa los geles representativos de la comparación de las condiciones sana y enferma. Se obtuvieron siete proteínas diferenciales. Estas proteínas diferenciales se encontraron dentro de rangos de puntos isoeléctricos de 5.2 a 6 y pesos moleculares basados en el corrimiento de las proteínas en el gel y con referencia al marcador molecular Benchmark (Invitrogen). Los rangos de estas proteínas comprende 18.8 kDa, la de peso molecular menor a 37.2 kDa la de peso molecular mayor Tabla 6. El criterio para seleccionar proteínas diferenciales, fue que estas se presentaran de manera constantes en las tres réplicas técnicas de cada muestra biológica, para lo anterior se utilizó en el programa Gelscape (<http://www.gelscape.ualberta.ca>), que se alimentó con las réplicas de los geles presentados en el anexo 1. En la Figura 20 B se marcan en círculo las proteínas que se encontraron diferenciales en el gel representativo de la planta sintomática.

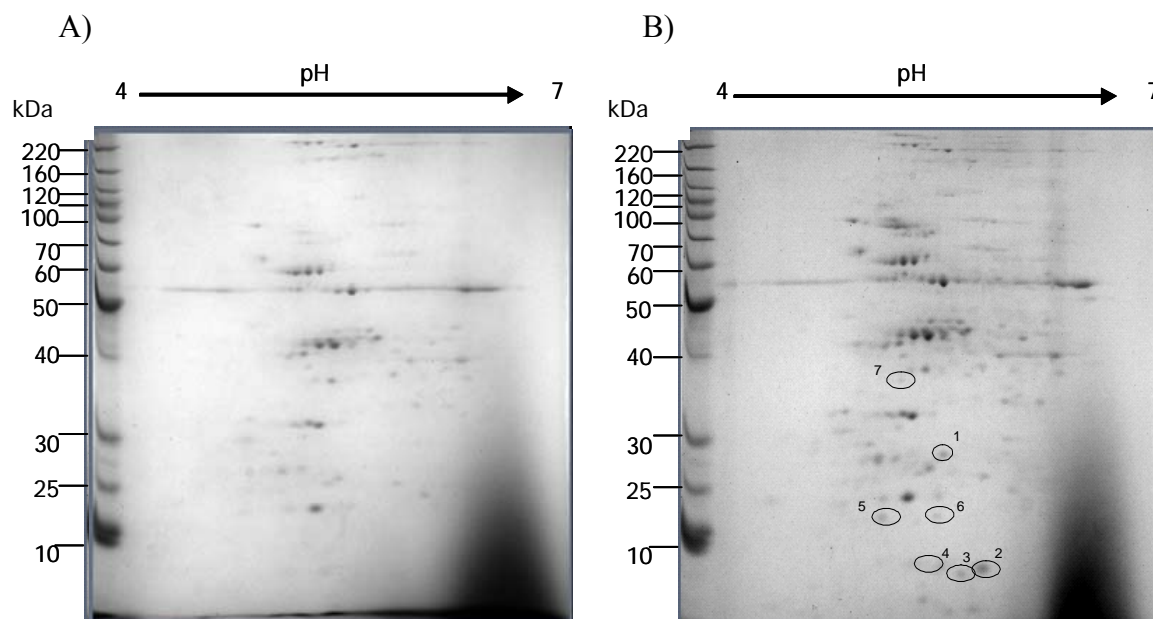


Figura 20. Geles comparativos en rangos de pH de 4-7. A) pertenece a la condición sana, B) pertenece a la condición enferma.

Tabla 6. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos aparentes de las proteínas expresadas diferencialmente, resultante del programa Gelscape (<http://www.gelscape.ualberta.ca>)

Proteína	pI	MW
1	5.7	28.0
2	5.8	18.8
3	6.0	18.9
4	5.7	18.9
5	5.2	19.6
6	5.6	19.6
7	5.3	37.2

De las proteínas identificadas diferencialmente previo a su identificación mediante espectrometría de masas es imposible determinar que proteínas provienen del genoma

del virus y cuales de la planta, por lo que se decidió emplear los anticuerpos policlonales anti-ToANV para identificar las proteínas virales mediante la técnica de *Western blot*, como se presenta a continuación.

7.2.3. Detección de las partículas del virus ToANV mediante *Western blot*

La técnica de *Western blot*, aporta mas información al realizarse sobre proteínas previamente separadas. Se utilizó solo un anticuerpo anti-ToANV, que está conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, el cuál ahorra un paso de protocolo estándar, además reduce en mucho los artefactos. En la Figura 21-A se muestra la detección inmunológica de una proteína de peso molecular aparente de 28 kDa, banda única visualizada en el *Western blot* de primera dimensión, misma que no fue identificada en las plantas sanas pero sí en las muestra correspondiente a la planta sintomática marchitez manchada 1, misma que fue confirmada por la prueba ELISA para la presencia del virus ToANV. Una proteína de la cápside de tamaño de 28 kDa, también fue reportada como proteína de la cápside del virus ToANV (Turina y col., 2007). En la muestra marchitez manchada 2 esta proteína no fue identificada (Figura 21 A), aun cuando esta planta al ser valorada de manera cualitativa por la prueba ELISA resultó positiva (Tabla 2). Como control de carga de proteína se muestran un gel similar donde las proteínas de todas las muestras fueron teñidas con Azul de Coomassie (Figura 21 B), donde se muestra que no existe una diferencia entre la proteína carga de una muestra a otra.

Una probable razón de esto podría ser que las proteínas de la planta marchitez 2 se encontraban en una etapa de infección donde la presencia de la proteína de 28 kDa no se encontraba expresada en altos niveles, y así si la proteína se encontraba por debajo del límite de los sustratos colorimétricos empleados en la técnica *Western blot*, esta no sería detectada, a menos que se empleara un método más sensible. Aunado a que la 2D-PAGE también tiene una limitación importante en la detección de proteínas poco abundantes, como las proteínas virales de la cápside en plantas en etapas tempranas de infección. Muchos patógenos de plantas, incluidos los virus, se encuentran en títulos muy pequeños, lo que no es posible correlacionar muchas veces con la severidad de síntomas presentados por la planta. Los virus también tienden a acumularse de manera irregular en distintas partes de la planta. Para el caso de este agente causal de origen viral, no hay estudios de este tipo en los cuales pudiéramos basarnos, para asegurar la

extracción de cantidades considerables de proteína de la cápside en las dos plantas de tomate analizadas en el análisis proteómico, ya que el criterio de selección de éstas fue en base a síntomas de marchitez manchada. Así la proteína de la cápside de 28 kDa que se identificó con el anticuerpo, pudiera haber estado muy diluida en el extracto, debido a que se utilizó toda la parte aérea para obtener proteínas totales, entre las cuáles están incluidas las del patógeno. En estos estudios proteómicos es necesario a veces realizar un fraccionamiento de la muestra para reducir la complejidad de los extractos. El método de extracción de proteínas empleado podría también estar dejando de lado un grupo desconocido de proteínas incluyendo otras proteínas virales de la cápside, como se ha mencionado anteriormente no existe un método que extraiga el total de las proteínas.

De acuerdo al peso molecular aparente de la proteína identificada en el *Western blot* (28 kDa), (Figura 21 A) correspondería a una proteína de la cápside reportada por Turina y colaboradores (2007) del mismo peso molecular. Para identificar si la proteína de 28 kDa corresponde a la proteína 1 (del mismo peso molecular) identificada en los geles bidimensionales comparativos (Figura 20 B, Tabla 6) se realizó un ensayo *Western blot* en las que se separó las proteínas en un gel bidimensional (rango pH 3-10) (Figura 22), dónde se muestra el resultado donde se confirmó que la proteína identificada en *Western blot* de una dimensión corresponde a la proteína 1 diferencialmente expresada de la Figura 20 B. Con esto se puede concluir que al menos se identifica una proteína de origen viral y el resto de estas proteínas pueden ser expresadas por la planta en respuesta a la enfermedad.

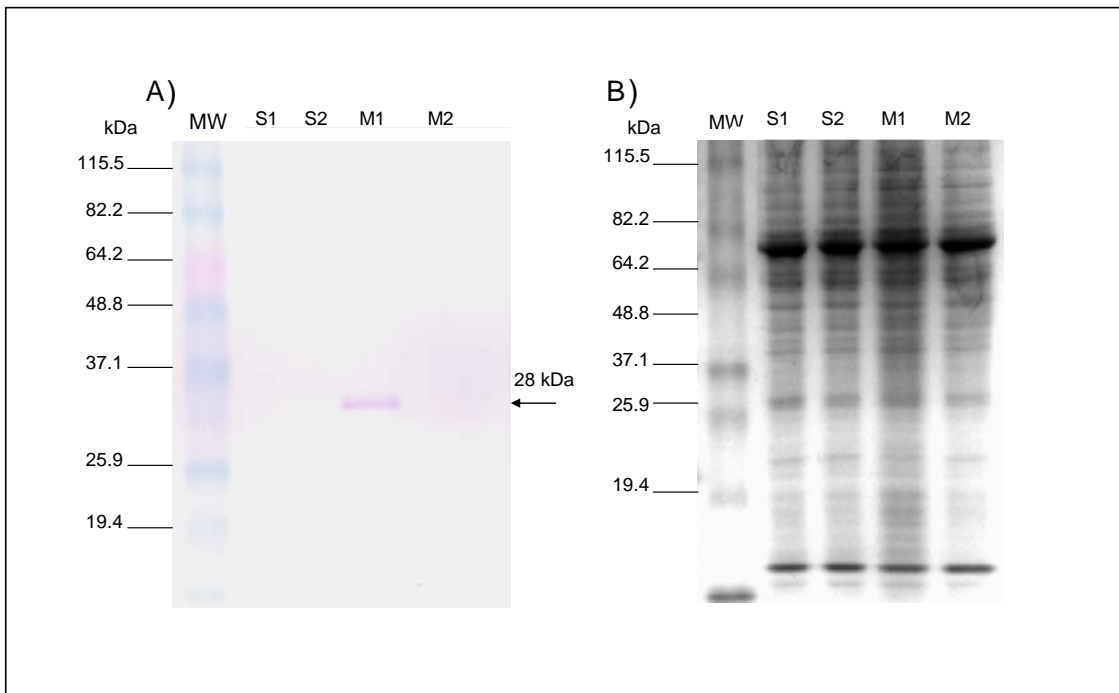


Figura 21. Detección inmunológica de proteínas de la cápside del virus ToANV. A) *Western blot* SDS-PAGE, B) Gel teñido con azul de Coomasie. Donde S1: planta Sana 1, S2: planta sana 2, M1: planta marchitez 1, M2: planta marchitez 2. 40 μg de proteína se cargaron en cada carril. 10 μL de marcador molecular Benchmark Prestained (Invitrogen).

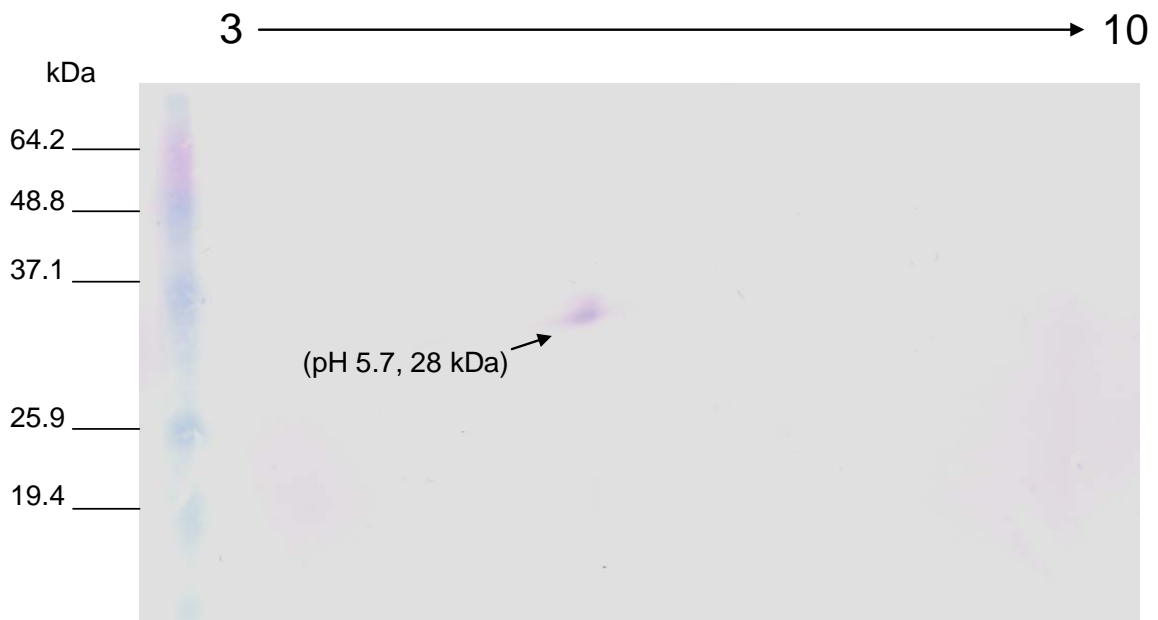


Figura 22. Detección inmunológica de proteínas de la cápside del virus mediante *Western blot* en gel 2-D SDS-PAGE. Tira IPG utilizada gradiente de pH 3-10 sobrecargada con 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína de la planta marchitez 1 y enfocada 22000 VH.

7.2.4. Identificación de la proteína 1 diferencial mediante espectrometría de masas

Los resultados de la identificación de la proteína seleccionada (proteína 1, Tabla 6), mediante la técnica de huella peptídica de masas, se muestran en la Tabla 7, donde se enlistan los picos experimentales obtenidos de la digestión con tripsina y visualizados en el espectrograma (Figura 23), donde el pico base, de mayor intensidad es el pico 22, el cual tiene un 60 % de intensidad, este valor es tomado como referencia de 100% para los demás picos. Se observa en el espectrograma que los picos están separados y distinguibles unos de otros, lo que permite continuar con el análisis bioinformático. En total resultaron 46 péptidos, con los que se hizo el análisis bioinformático en los programas MASCOT y ALDENTE.

Tabla 7. Picos experimentales obtenidos del análisis MALDI de la proteína 1

Pico no.	<i>m/z</i>	Pico no.	<i>m/z</i>
1	700.111358	24	885.726006
2	704.859881	25	891.786541
3	708.747227	26	894.763013
4	714.226488	27	897.758597
5	719.255828	28	902.853168
6	733.114491	29	908.754743
7	748.933778	30	1044.832257
8	762.247685	31	1058.696490
9	789.000222	32	1065.835283
10	794.880296	33	1075.784894
11	806.994177	34	1081.775248
12	813.930346	35	1083.757744
13	816.842612	36	1085.765173
14	824.862691	37	1096.649215
15	829.070674	38	1101.692190
16	831.829212	39	1109.756931
17	839.804685	40	1120.629957
18	843.878131	41	1202.057151
19	854.844262	42	1270.756667
20	862.984389	43	1285.377233
21	868.887714	44	1308.671288
22	876.829693	45	1457.822252
23	878.805906	46	1475.690731

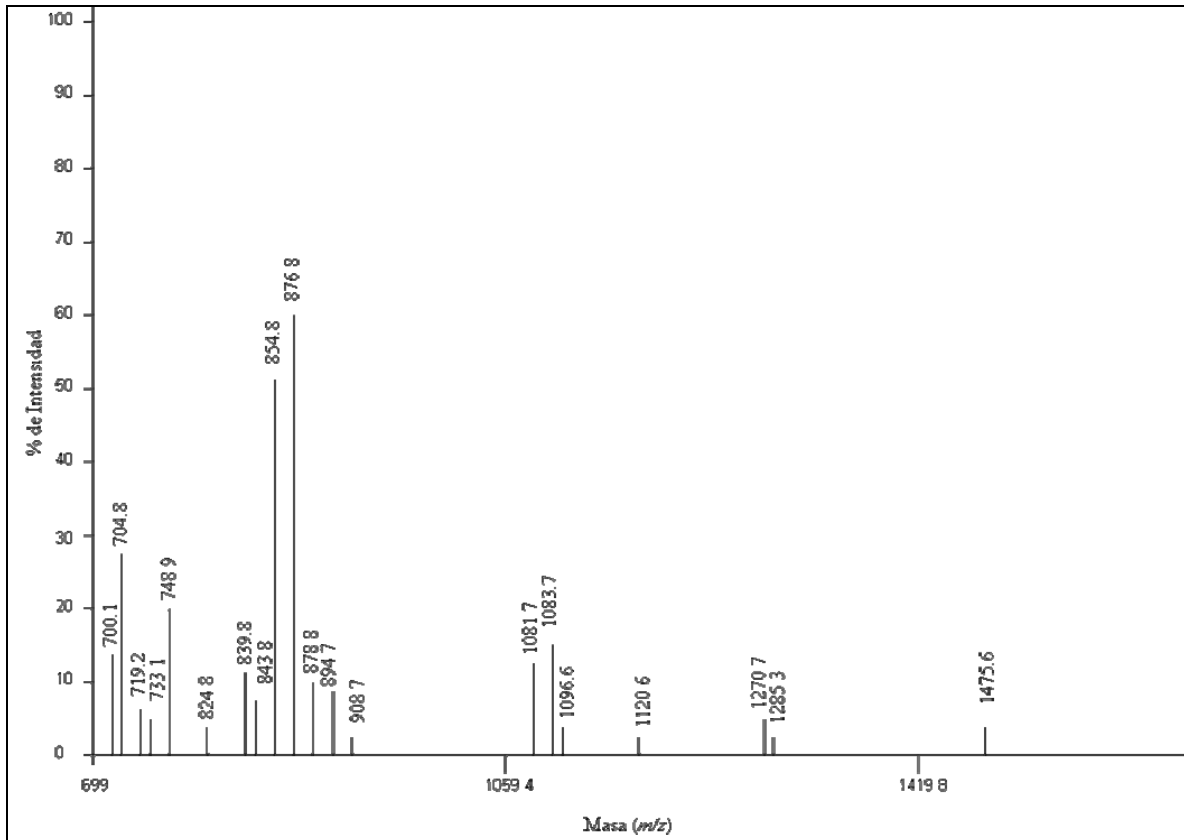


Figura 23. Espectrograma resultante de la proteína 1, identificada por PMF en el equipo MALDI-TOF. Dónde se muestran los picos más prominentes y sus masas (m/z).

Los resultados de la búsqueda en el programa de ALDENTE EXPASY y MASCOT están resumidos en la Tabla 8. El resultado enlistado en primer lugar que nos identificó a la proteína de la cápside del virus OrMV como la más probable en las bases de datos fue obtenido por el programa MASCOT y los siguientes resultados fueron arrojados por el programa ALDENTE, si un resultado se hubiera repetido en los dos programas nos hubiera confirmado la probabilidad de este, lo que no ocurrió en este caso particularmente y en esta búsqueda.

Tabla 8. Proteínas arrojadas por los programas ALDENTE y MASCOT

	MW kDa	pI	Score	% Cobertura	AC	ID
Proteína de la cápside del (OrMV)	28.836	6.1	36	28%	Q1XIS0	Q1XIS0_OMV
Proteína de la cápside del (YMMV)	30	6.3	32	11%	Q715T3	Q715T3_9POTV (F) (C_2
Proteína de la cápside del (CGRMV)	30	6.1	37	8%	Q8JP13	Q8JP13_9VIRU
Proteína de la cápside del (SPFMV)	35.049	6.4	28	20 %	Q5GJ30	Q5GJ30_9POTV

Nota: En esta Tabla, solo el primer resultado se obtuvo del programa MASCOT, y los siguientes del programa ALDENTE.

El éxito de la identificación de las proteínas depende de la evidencia en la cual se soporte. Así, la huella peptídica de masas solo provee la identificación estadística más probable. Solo el resultado de la proteína de la cápside del OrMV arrojado por el programa MASCOT (Tabla 8) cumple estos parámetros descritos en la sección de Métodos (6.3.4.2.), sin embargo estos resultados no son concluyentes, por lo que no se puede asegurar sea el OrMV (virus del mosaico del Ornithogalum), que fue el que presentó el mayor porcentaje de cobertura y uno de los *score* más altos en este análisis bioinformático. Ya que no se tiene referencias que el tomate sea un hospedero de este virus, y además se tiene la prueba del *Western blot*, dónde esta proteína reacciona con el anticuerpo anti-ToANV, coincidiendo además en síntomas.

La identificación por huella peptídica de masas, no pudo ser totalmente concluyente debido a que el genoma de este organismo no está completamente caracterizado, por lo que hasta este punto del análisis nos encontramos identificando la cápside de un virus de ARN de cadena positiva, lo que nos da información para poder diseñar primers basados en la región conservada RdRp, como estrategia de detección de estos virus, la mayoría de los virus a los que muestra homología, pueden producir necrosis en las hojas, por lo que también nos sugiere que este virus pudiera estar causando la necrosis (manchado de las hojas).

La estrategia utilizada en este trabajo y la información generada del mismo contribuyó al conocimiento de nuevas técnicas para la identificación de fitopatógenos, arrojando mapas de referencias de proteínas de respuesta (proteínas diferenciales), para futuros trabajos de interacción planta-patógeno en tomate.

En todos los casos, las bases de datos muestran homología con virus de ARN de cadena positiva donde hay partes o dominios conservados de la familia *Potyviridae* y por similitud contiene un dominio catalítico RdRp común a la superfamilia de los picornavirus, la cual también comprende a la familia sequivirus (Liljas, 2002) a la cual pertenece el virus ToANV hecho en base al análisis del genoma parcialmente caracterizado (Turina y col., 2007). Por lo que debido a la falta de información generada con respecto a nuevos virus o virus pobremente estudiados se dificulta la clasificación e identificación inequívoca de estos.

A menos que el genoma de un virus esté completamente secuenciado, no hay garantía de que la verdadera secuencia de la proteína analito está presente en la base de datos. Si eso falta, entonces se pueden obtener puntuaciones dentro de los rangos aceptables con otras especies que son de interés, y así en su defecto se obtiene una caracterización por homología.

Aunque hay un resultado que entra dentro de los valores umbral proteína de la cápside del (OrMV) (Tabla 8) con un pI de 6.1, *score* de 36 y porcentaje de cobertura de 28 %, el peso molecular es 0.8 kDa mayor, sin embargo debido a que este virus no es un hospedero en tomate, no se consideró un resultado concluyente. La razón por la que no

se haya podido identificar esta proteína al 100% en las bases de datos pueden ser diversas, ya sea que el virus al que pertenece esta proteína esté pobremente estudiado o que se trate de un virus nuevo.

VIII. CONCLUSIONES

Se detectó el virus ToANV en plantas de tomate con síntomas de marchitez manchada, por medio de la prueba DAS-ELISA.

Se encontró un hospedero natural alternativo del virus ToANV, no previamente reportado por medio de DAS-ELISA, que presenta síntomas parecidos a los reportados para el virus ToANV como lesiones necróticas en la parte apical, malformación de las hojas muerte regresiva reportado para tomate y amarillamiento intervenial reportado para tabaco.

Los geles bidimensionales muestran diferencias en los patrones de proteínas de plantas sintomáticas y asintomáticas.

Se encontró una proteína de aprox. 28 kDa p.I. aproximadamente 6 en geles de pH 4-7 diferencialmente e inmunodetectada con el anticuerpo ToANV.

Por espectrometría de masas PMF y los anticuerpos se pudo caracterizar la proteína encontrada en plantas sintomáticas de tomate dando homología con la proteína de la cápside del virus del mosaico del *Ornithogalum* (OrMV) y de otros virus de la familia *Picornaviridae*.

La proteína de aproximadamente 28 kDa, es de un virus no completamente caracterizado, como el ToANV, o en su defecto de un nuevo virus en la región infectando plantas de tomate.

IX. RECOMENDACIONES

Preparación de muestras

- Enriquecer el extracto eliminando la proteína Rubisco por medio de la columna de afinidad.
- Un problema que se tuvo con las proteínas predominantes es que pueden eclipsar a las más pequeñas o las menos abundantes cuando son analizadas por EM. Para resolver este problema se utiliza el fraccionamiento del virión en la fracción soluble (membrana) e insoluble (centro); estas fracciones se tratan con detergentes y centrifugación a altas velocidades.
- En la extracción por fenol de Hurkman y Tanaka, modificar el buffer de extracción adicionando detergentes en la composición para extraer en mayor cantidad proteínas de la cápside de virus.
- Estandarizar otro tipo de extracción con TCA-Acetona para obtener otro subgrupo de proteínas.

Diseño de experimentos

- Aumentar el número de plantas colectadas e inocular mecánicamente el virus purificado en tabaco, ya que es una planta modelo.
- Probar qué síntomas específicos produce esta proteína en la planta y con que proteínas interactúa para producirlos.

Espectrometría de masas

- Secuenciación *de novo* por masas/masas, ya que la técnica de huella peptídica tiene algunas limitaciones y la variabilidad de los virus en la naturaleza rebasa la posible identificación, debido a que muchos de los virus reportados no se caracterizan a nivel proteínas, siendo este un campo poco estudiado. Además que mediante la secuenciación de aminoácidos se puede diseñar

oligonucleotidos para poder amplificar las regiones que no se han secuenciado que comprenden esta parte del virus ToANV.

- Secuenciar el amino terminal para diseñar anticuerpos más específicos que minimicen las reacciones cruzadas con virus de la misma familia.
- Que se utilice la espectrometría de masas para identificar proteínas de la cápside de virus de plantas basados en PMFs en laboratorios de diagnóstico fitopatológicos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. (2006). Fitopatología. 2^a Ed. Limusa. Pp. 4-10, 32-35, 273-276, 532-541, 648, 691-692, 734.
2. Álvarez, R. P., Jiménez, C. G., Leyva, L. N. E., Méndez, L. J. (2007). First report of tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Sinaloa, México. *Plant Pathol.* 56 (6): 1043.
3. Bollag, D. M., (1996). *Protein Methods*. 2^a Ed. Wiley-Liss. Pp. 62-65.
4. Brown J. K., Idris, A. M. (2006). Introduction of the Exotic Monopartite *Tomato yellow leaf curl virus* into West Coast Mexico. *Plant Dis.* 90:1360.
5. Brown J. K. (2008). Memoria Jornada de divulgación: ventana fitosanitaria contra mosquita blanca en tomate. Fundación Produce Sinaloa. Pp. 53.
6. Buck, K.W. (1999). Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* 354:613-627.
7. Casado, V. J. (2004). Tesis Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* M). Biblioteca virtual Miguel de Cervantes. España. Pp. 108.
8. Clark, M. F. y Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol.* 34:475-483.
9. Cooper, B., Eckert D., Andon N. L., Yates J. R., Haynes P. A. (2003). Identification of an unknown virus from infected plants using mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrum.* 14: 736-741.
10. Cook. R. (2007). USDA, FAOSTAT y el mercado dinámico de la producción de tomate fresco en el área del TLCAN. Departamento de Comercio de la Universidad de California en Davis.

11. Creel, H. S. (1993). Trends Pol Sci. 1(11): 336.
12. Cruz, F. M., y Farías, T. G. A. (1997). Guía ilustrada de la prueba de Inmunoabsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Subsecretaría de Agricultura y Ganadería, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. México, D.F. Pp 1-23.
13. Dawson, W. O., Bubrick, P., Grantham, G. L. (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathol.* 78:783-789.
14. De la Torre, A., R., Cervantes, D. L., Houston, H. A., Valverde, R. (2002). Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus de la marchitez manchada del tomate (*TSWV*). *Agrociencia.* 36: 211-221.
15. Desjardins, P. R., Ban, N., Methews, D. M., Kitasako, J. T., Dodds, J. A., McPherson, A. (2000). Electron Microscopy of Satellite tobacco Mosaic Virus Crystals: Metal-Coated, negatively stained, and stereo Pairs. *J Electron Microscop.* 49: 509-514.
16. Granier, F. (1988). Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9, 712–718.
17. Hammond-Kosack, K, y Jones J. D.G. (2000). Responses to plant pathogens. *In.* p. 1102-1156. B.B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA.
18. Hernandez-Martinez, J., García- Mata, R., Valdivia-Icalá, R., Omaña-Silvestre, J.M. (2004). Evolution of the competitiveness and profitabilidad in red tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) in Sinaloa, México. *Agrociencia* 38: 431-436.

19. Herrera, M. G., Madariaga, M. (2002). Incidencia de los virus *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) y *Plum pox virus* (PPV) en viveros de frutales de carozo en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 62:38-45.
20. Hirashima, K. y Watanabe, Y. (2003). RNA helicase domain of Tobamovirus replicase executes cell to- cell movement possibly through collaboration with its nonconserved region. *JVirol.* 77:12357-12362.
21. Hurkman, W. J., Tanaka, C. K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81:802-806.
22. Idris, A. M., Brown, J. K. (2005). Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. *Arch Virol.* 150:1003-1012.
23. Isaacson, T., Damasceno, C. M., Saravanan, R. S., He Y., Catalá, C., Saladie, M., Rose, J. K. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc.* 2: 769-774.
24. Ishikawa, M. y Okada, Y. (2004). Replication of tobamovirus RNA. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 80: 215-222.
25. Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., Zitter, T. A. (1991). Compendium of Tomato Diseases. APS Press. Pp 1, 9- 15, 23, 25-30, 25-41, 43, 49.
26. Kersten, B., Bürkle, L., Kuhn, E. J., Giavalisco, P., Konthur, Z., Lueking, A., Walter, G., Eickhoff, H., Schneider, U. (2002). Large- scale plant proteomics. *Plant Mol Biol.* 48: 133-141.
27. Koonin, E. V. (1993). A new group of putative helicases. *Trends Biochem Sci.* 17: 596-497.

28. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
29. Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Nakashima, N., Stanway, G., Gorbalenya, E.E. (2008). *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo T = 3 virion architecture. *Arch Virol.* 153: 715-727.
30. Lewis, J. K., Bendahmaner, M., Smith, T. J., Beachy, R. N. (1998). Identification of Viral Mutants by Mass Spectrometry. *Pro Natl Acad Sci.* 95: 8596-8601.
31. Liljas, L., Tate, J., Lin, T., Chistian, P., Johnson, J. E. (2002). Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Arch Virol.* 147: 59-84.
32. McLafferty (1993). Interpretation of Mass Spectra. USB Mill Valley. 37, 97, 118-120.
33. Matus, J. A., y Puente, G., A. (1993). Análisis estatal de los efectos de política económica y bases de la estrategia para la conversión de la agricultura, Sinaloa. Colegio de postgraduados y secretaría de agricultura y recursos Hidráulicos. Montecillo, Estado de México. Pp. 635.
34. Meyer, Y., Grosset, J., Chartier, Y., Cleyetmarel, J. C. (1988). Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody-production-antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis.* 9: 704-712.
35. Mijnbrugge, K. V. Meyermans, H., van Montagu, Bauw, G., Boerjan, W. (2000). Formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta.* 210:589-598.
36. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. (1995). *Virus Taxonomy.* Sixth

- Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna & New York: Springer- Verlag.
37. Okuda, M. (2005). Study of detection method and genetic characterization of tospoviruses. *J Gen Plant Pathol.* 71: 458.
 38. Pappu, S.S., Brand, R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gought, K. H., Frenkel, M. J., Niblett, C. L. (1993). A Polymerase Chain reaction method adapted for Selective Amplification and Cloning of 3' Sequences of Potyviral genomes: application to Dasheen Mosaic Virus. *J Virol Methods.* 43: 276.
 39. Padliya N. D., Cooper, B. (2006). Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens. *Proteomics* 6: 4069-4075.
 40. Pitchard, A., Sánchez, M., Nombela, C., Gil, C. (2003). Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B.* 787: 101-128.
 41. Read, A. F., Taylor, L. H. (2001). The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099-1102.
 42. Rick, C. M., Holle, M. (1990). Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Genetic variation and its evolutionary significance. *Econ Bot.* 44:69-78.
 43. Rose, J. K. C. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hardles and experimental tool. *Plant J.* 39: 715-733.
 44. Rose, J. K. C., Tal, I., Damascene, M. B., Saravan, S. R. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc.* 1: 769-74.
 45. Rossignol, M. (2001). Analysis of the plant proteome. *Curr Opin Biotech.* 12.131-134.

46. Roossinck, M. J., Rojas, M. R., Gilbertson, R. L. (2008). Plant Virus Evolution. Springer Berlin Heidelberg. Pp. 27-51.
47. Rybicki E. P., Pietersen, G. (1999). Plant virus disease problems in the developing world. *Adv Virus Res.* 53: 128-175.
48. Sánchez-Navarro, J. A., Canizares, M. C., Cano, E. A., Pallas, V. (1999). Simultaneous Detection of Five carnation Viruses by non- isotopic Molecular Hybridization. *J Virol Methods.* 82: 167-175.
49. Santoni, V. R., Bellini, C., Caboche, M. (1994). Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Planta.* 192: 557-566.
50. Saravanan R. S., Rose, J. C. K. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics.* 4: 2522-2532.
51. Schevenko, A. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68: 850-85.
52. Schevenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2006). In gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 1: 2856-2860.
53. She, Y. M., Haber, S., Seiffers, D. L., Loboda, A. (2001). Determination of the complete amino acid sequence for the coat protein of brome mosaic virus by time-of-flight mass spectrometry. *J Biol Chem.* 276: 20039-20047.
54. Shuster, A. M., Davies, E. (1983). Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls: i. the aging process. *Plant Physiol.* 73: 809-816.
55. Seiffers, D. L., Haber, S., Ens, W., She, Y. M. (2005). Characterization of a distinct *Johnsongrass mosaic virus* strain isolated from sorghum in Nigeria. *Arch Virol.* 150: 557-6.

56. Tan, S. W.L., Wong, S. M. y Kini, R. M. (2000). Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. *J Virol Methods*. 85(1-2): 93-9.
57. Thivierge, K., V. Nicaise, P., Dufresne, S., Cotton, J. F., Laliberte, O., Le Gall, Fortin, M.G. (2005). Plant Virus RNAs. Coordinated Recruitment of Conserved Host Functions by (1) ssRNA Viruses during Early Infection Events¹. *Plant Physiol*. 138:1822-1827.
58. Towner, J. S., Mazanet, M. M., Semler B. L. (1998). Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J Virol*. 72:7191–7200.
59. Tsugita, A., M., Kawakami, T. y Ohki, Y. K. (1999). Two dimensional electrophoresis of plant proteins and standardization of gel patterns. *Electrophoresis*. 17: 855–865.
60. Turina, M. D., Ricker, R., Lenzi, V., Ciuffo, M. (2007). A Severe Disease of Tomato in the Culiacán Area (Sinaloa, México) Is Caused by a New Picorna-Like Viral Species. *Plant Dis* 8:932-941.
61. van Wijk, K. (2001). Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol*. 126: 501-508.
62. Verbeek, M., Dullemans, A. M., van Den Heuvel, J. F. J. M., Maris, P. C., van Der Vlugt, R. A. A. (2007). Identification and characterization of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Arch Virol*. 152: 881-890.
63. Verbeek, M., Dullemans, A. M., van den Heuvel, J. F. J. M., Maris, P. C., van der Vlugt, R. A. A. (2008). Tomato marchitez virus, a new plant picorna-like virus from tomato related to tomato torrado virus. *Arch Virol*. 153: 127-134.
64. Whitham, S. A., Wang, Y. (2004). Roles for host factors in plant viral pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol*. 7:365-371.

65. Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet.* 32: 569-577.
66. Yao, Z. P., Demirev, P. A., Fenselau, C. (2002). Mass spectrometry-based proteolytic mapping for rapid virus identification. *Anal Chem.* 74(11):2529-34.

Páginas web consultadas

<http://www.agronet.com.mx/cgi/notes>

<http://www.caades.org.mx>

<http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>

<http://www.expasy.ch>

<http://www.focir.gob.mx/agroindustria/documents/ProducciondeTomate en Invernadero.pdf> –

<http://www.gelscape.ualberta.ca>

<http://www.matrixscience.com>

<http://www.ncbi.nlm>

<http://www.proteomicsnijmegen.nl>

XI. ANEXOS

Anexo 1

En este anexo se muestran las réplicas experimentales de los geles bidimensionales de las extracciones de proteínas de las plantas sana 1, marchitez 1 y marchitez 2.

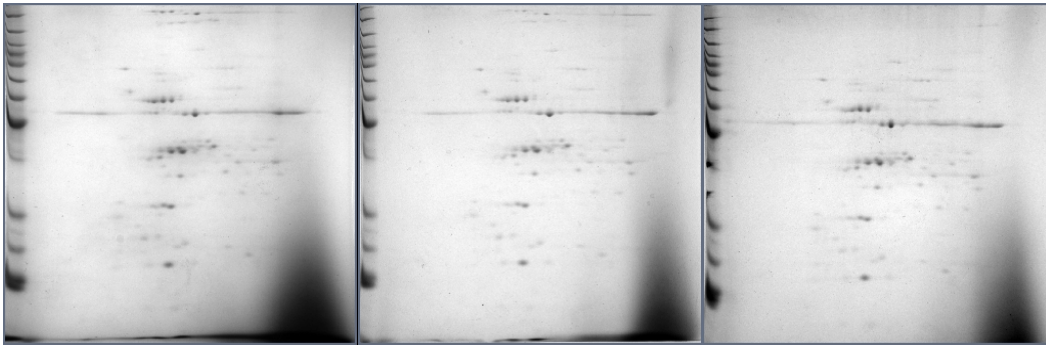


Figura 24. Replicas experimentales de los geles de la condición marchitez 1 en rangos de pH de 4-7.

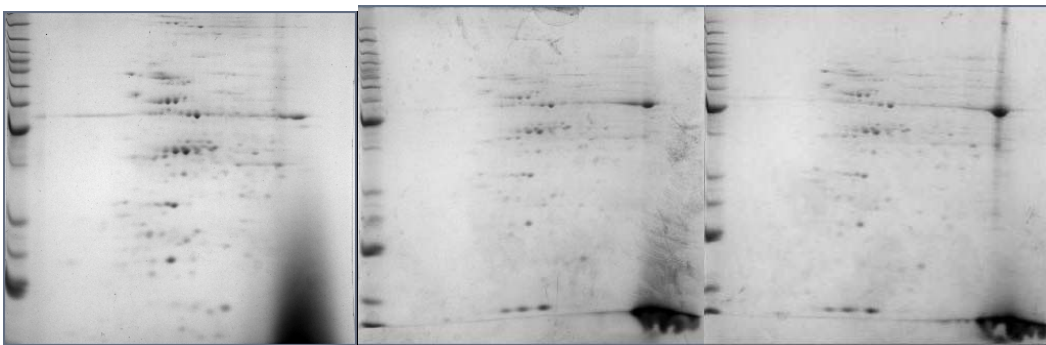


Figura 25. Replicas experimentales de los geles de la planta condición marchitez 2 en rangos de pH de 4-7.

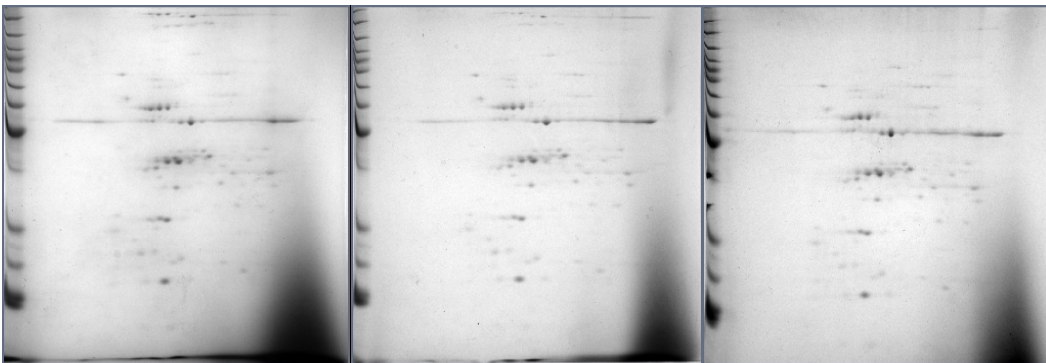


Figura 26. Replicas experimentales de los geles de la condición sana 1 en rangos de pH de 4-7.

Anexo 2

En este anexo encontrarás los resultados de la búsqueda bioinformática en los programas MASCOT y ALDENTE del proceso de identificación realizado por MALDI-TOF.



Mascot Search Results

User : Alejandra Nuñez
 Email : alejn77@hotmail.com
 Search title :
 Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)
 Taxonomy : Viruses (325293 sequences)
 Timestamp : 6 May 2008 at 20:41:58 GMT
 Warning : **Specifying a protein mass disables mixture mode in PMF-search**
 Top Score : 45 for **T13525**, hypothetical protein 36 - Bacillus phage phi-105

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 68 are significant ($p < 0.05$).

../data/20080506

Concise Protein Summary Report

Format As	Concise Protein Summary					Help	
	Significance threshold p<			0.05	Max. number of hits		10
699.104082 from	699.104082 from	703.852605 from	703.852605 from	707.739951 from	713.219212 from		
713.219212 from	718.248552 from	718.248552 from	732.107215 from	747.926502 from	761.240409 from		
761.240409 from	787.992946 from	787.992946 from	793.873020 from	793.873020 from	805.986901 from		
812.923070 from	815.835336 from	815.835336 from	823.855415 from	828.063398 from	828.063398 from		
830.821936 from	830.821936 from	838.797409 from	842.870855 from	853.836986 from	853.836986 from		
861.977113 from	861.977113 from	867.880438 from	867.880438 from	875.822417 from	875.822417 from		
877.798630 from	884.718730 from	890.779265 from	893.755737 from	896.751321 from	896.751321 from		
901.845892 from	901.845892 from	907.747467 from	907.747467 from	1043.824981 from	1043.824981 from		
1057.689214 from	1057.689214 from	1064.828007 from	1064.828007 from	1074.777618 from	1074.777618 from		
1080.767972 from	1080.767972 from	1082.750468 from	1082.750468 from	1084.757897 from	1095.641939 from		
1095.641939 from	1100.684914 from	1100.684914 from	1108.749655 from	1108.749655 from	1119.622681 from		
1119.622681 from	1201.049875 from	1201.049875 from	1269.749391 from	1269.749391 from	1284.369957 from		
1307.664012 from	1307.664012 from	1456.814976 from	1456.814976 from	1474.683455 from	1474.683455 from		
2	PMF	Alejandra Nuñez	alejn77@hotmail.		Carbamidomethyl		
Oxidation (M)	Trypsin	Monoisotopic	30	0.8	Da		
0		MSDB	1+	1			
	../data/20080506	10	OFF		.. Viruses		
concise	not again						

Re-Search All

1. [T13525](#) **Mass:** 109084 **Score:** 45 **Expect:** 11 **Queries**
matched: 14
 hypothetical protein 36 - Bacillus phage phi-105

2. [S18762](#) **Mass:** 59200 **Score:** 43 **Expect:** 16 **Queries**
matched: 13
 outer capsid protein VP5 - epizootic hemorrhagic disease virus
 (serotype 1, strain USA)
[CAA39303](#) **Mass:** 59140 **Score:** 43 **Expect:** 16 **Queries**
matched: 13
 EHDVVP5 NID: - Epizootic hemorrhagic disease virus

3. [Q5DL22_9INFA](#) **Mass:** 64138 **Score:** 37 **Expect:** 62 **Queries**
matched: 10
 Hemagglutinin.- Influenza A virus (A/black-headed
 gull/Sweden/4/99(H16N3)).

4. [Q5DL21_9INFA](#) **Mass:** 64210 **Score:** 37 **Expect:** 65 **Queries**
matched: 10
 Hemagglutinin.- Influenza A virus (A/black-headed
 gull/Sweden/5/99(H16N3)).

5. [T17863](#) **Mass:** 88426 **Score:** 36 **Expect:** 75 **Queries**
matched: 12
 vitellogenin II homolog A363R - Chlorella virus PBCV-1

6. [Q96652_9REOV](#) **Mass:** 35252 **Score:** 36 **Expect:** 78 **Queries**
matched: 10
 VP6.- Bluetongue virus.

7. [Q1XIS0_OMV](#) **Mass:** 28836 **Score:** 36 **Expect:** 82 **Queries**
matched: 10
 Coat protein (Fragment).- Ornithogalum mosaic virus.

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin
 Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : 30 kDa
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.8 Da
 Peptide Charge State : 1+
 Max Missed Cleavages : 1
 Number of queries : 46

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

MASCOT SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

../data/20080506	8	true	0	0	0
0	0.001	0	0.05		

Match to: **Q1XIS0_OMV** Score: **36** Expect: **82**
Coat protein (Fragment).- Ornithogalum mosaic virus.

Nominal mass (M_r): **28836**; Calculated pI value: **6.10**
 NCBI BLAST search of [Q1XIS0_OMV](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Ornithogalum mosaic virus](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI
 Entrez:
[BAE92900](#) from [Ornithogalum mosaic virus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: **46**
 Number of mass values matched: **10**
 Sequence Coverage: **28%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 ADSMDAGGSN RQQAPLVRQQ DQDVNVGTFS VPRVKALSDK MTLPKAHGKV
51 VLNLQHLVQY NPEQTDISNT RATRTQFNW YDKVRDSYGV TDDQMAVILN
101 GLMVWCIENG TSPNLNGNWT MMDGDEQIEY PLQPVLENAQ PTFRQIMAHF
151 SNAAEAYIEK RNSEQR YMPR YGSQRNLNDY SLARYAFDFY EMTSRTPNRA
201 REAHIQKAA ALRNTKTKLF GLDGKVGTEE EDTERHVASD VNRNTHSLLG
251 VNM

Show matched peptides only

No match to: 700.1114, 704.8599, 708.7472, 719.2558, 733.1145,
 762.2477, 794.8803, 806.9942, 813.9303, 816.8426, 824.8627, 829.0707,
 831.8292, 839.8047, 854.8443, 862.9844, 868.8877, 876.8297, 878.8059,
 885.7260, 891.7865, 894.7630, 902.8532, 908.7547, 1044.8323,
 1058.6965, 1075.7849, 1081.7752, 1109.7569, 1120.6300, 1202.0572,
 1270.7567, 1285.3772, 1308.6713, 1457.8223, 1475.6907

>P1;Q1XIS0_OMV
 Coat protein (Fragment).- Ornithogalum mosaic virus.
 C;Species Q1XIS0_OMV: Ornithogalum mosaic virus.
 C;Species BAE92900: Ornithogalum mosaic virus
 C;Family: Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage;
 Potyviridae; Potyvirus.
 C;Accession: Q1XIS0;

 C;Gene name: Name=cp;
 C;Reference [1]
 C;NUCLEOTIDE SEQUENCE.
 C;STRAIN=G;
 R;Yamamoto H., Fuji S., Inoue M., Matsumoto T.;

Submitted (SEP-2002) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
C;02-MAY-2006, integrated into UniProtKB/TrEMBL.
C;02-MAY-2006, sequence version 1.
C;27-JUN-2006, entry version 4.

C;EMBL; AB091836; BAE92900.1; -; Genomic_RNA.
C;GO; GO:0019028; C:viral capsid; IEA.
C;GO; GO:0005198; F:structural molecule activity; IEA.
C;InterPro; IPR001592; Poty_coat.
C;Pfam; PF00767; Poty_coat; 1.
C;NON_TER 1 1
C;Keywords: Capsid protein.
C;SRCDB TREMBL
C;IDN_GENBANK BAE92900;

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>