

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Agentes Anti-fitovirales en Extractos de Plantas Desérticas de México

Por:

**MADAY AGUIRRE MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.  
Agosto, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Agentes Anti-filovirales en Extractos de Plantas Desérticas de México

Por

**MADAY AGUIRRE MARTÍNEZ**

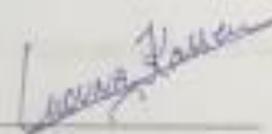
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

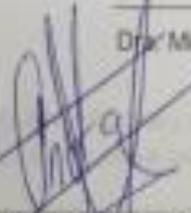
Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza  
Asesor Principal Interno

  
Dra. Mona Kassen  
Asesor Principal Externo

  
Dr. Alonso Méndez López  
Coasesor

  
Dra. Miriam Sánchez Vega  
Coasesor

  
Dr. José Antonio González Fuentes  
Coordinador de la División de Agronomía



Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México.  
Agosto, 2020

## AGRADECIMIENTOS

**A DIOS:** por permitirme vivir, por darme la oportunidad de salir adelante y bendecir mi camino y darles un motivo de felicidad a mi familia.

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro:** mi querida Alma Terra Mater por acogerme en sus instalaciones y así crecer profesionalmente.

**Lic. Francisco Ortiz Serafín:** por apoyarme y guiarme en la universidad.

**Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza:** gracias por haberme aceptado como su tesista y haberme incorporado a este proyecto.

**Dra. Mona Kassen:** una persona espectacular, gracias por apoyarme e impulsarme a salir adelante, ya que usted formo parte importante en este trabajo, gracias por tener esa paciencia para enseñarme. Tengo muchas cosas más que agradecerle.

**Dra. Yolanda Ortega Ortega:** que sin conocerme siempre estuvo disponible para enseñarme y guiarme en el laboratorio, siempre muy amable y cordial.

**Dra. Iliana:** por haberme aceptado para formar parte del proyecto y apoyarme en el experimento.

**Dr. Alonso Méndez López:** porque sin conocerme acepto ser parte de esta tesis como mi coasesor.

**Dra. Miriam Sánchez Vega:** por aceptar ser parte de mi tesis como mi coasesora y apoyarme con sus conocimientos.

**Dr. Gerardo Rafael Arguello Astorga:** de la (División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosi, Mexico), por habernos proporcionado los dos clones utilizados en este trabajo.

### A mis amigos

**A Rafael Aldana Escamilla:** por tu amor incondicional y por haberme apoyado en todo momento moral y económicamente, eres lo mejor que me ha pasado.

**A Ameyalli Labastida:** por tus consejos, por todo lo vivido y principalmente por tu motivación a seguir adelante. Eres una gran amiga.

**A Mayra Romero y Jessi Figueroa:** gracias por su amistad y por todos los momentos compartidos, son unas excelentes personas, ¡las quiero mucho!

## DEDICATORIA

### **A mis padres**

#### **Sra. Hilda Martínez Cruz y Sr. Gonzalo Aguirre Barrientos**

Por darme la vida, por creer y confiar en mí, y apoyarme cuando más los necesite, gracias por todo su amor y comprensión, por apoyarme moral y económicamente que a pesar de las dificultades nunca me dieron un “no” por respuesta y gracias a todo el esfuerzo y sacrificios hoy logramos esta meta. Son el motivo de mis sueños, los amo con todo el corazón.

### **A mis hermanos**

#### **Judith, Rodrigo y Ma. Cristina.**

Gracias por todo el apoyo y amor que me brindan a pesar de todos los obstáculos que conlleva su vida. Son la parte favorita de mi vida, los amo con todo mi corazón y esto va por ustedes.

### **A mi abuelito y mis tíos:**

#### **Sabino Aguirre, Domingo Aguirre, Lourdes Aguirre, Doris Mar Fierro y Adelina Aguirre.**

Gracias por todo su apoyo a lo largo de toda mi carrera tanto moral como económicamente. Son parte de esta meta que hoy gracias a ustedes también lo logre.

Apa sabino nunca olvidare el día que ahorraste dinero para darme a mí y a Cristi, porque, aunque no tuvieras dinero hacías todo lo posible por darnos, aunque fueran cincuenta pesos y cuando me regresaba a la universidad siempre te quedabas llorando.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Justificación .....	2
1.2. Objetivo general.....	2
1.3. Objetivo específico.....	2
1.4. Hipótesis: .....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Plantas Desérticas de México.....	4
2.2. Gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> D.C. Coville) .....	4
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	4
2.3. Hojasén ( <i>Flourensia cernua</i> D.C.) .....	7
2.3.1. Clasificación taxonómica.....	7
2.4. Extractos Vegetales .....	8
2.5. Efecto Antifitoviral de los Extractos de Plantas.....	9
2.6. <i>Nicotiana Benthamiana</i> .....	12
2.7. Geminivirus.....	12
2.7.1. Begomovirus .....	13
2.8. Agroinfiltración .....	14
III. MATERIALES Y METODOS.....	16
3.1. Ubicación del Experimento .....	16

3.2. Cultivo de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	16
3.3. Clones Infecciosos y Agroinfiltración .....	17
3.4. Preparación de Extractos Vegetales.....	18
3.5. Tratamientos y aplicaciones y muestreos .....	19
3.5.1. Fecha de muestreo.....	20
3.6. Análisis Molecular .....	21
3.6.1. Extracción de ADN total .....	21
3.6.2. Purificación de DNA .....	21
3.6.3. Cuantificación del ADN total y electroforesis .....	22
3.6.4. Detección y cuantificación del virus mediante PCR.....	22
3.6.5. Curva Estándar .....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Desarrollo de Síntomas Virales y Detección del Virus en Plantas de <i>N. benthamiana</i> .....	24
4.2. Extracción de ADN y Cuantificación .....	25
4.3. Detección de la Presencia del Virus RhMSinV por PCR.....	25
4. 4. Determinar el Ciclo Umbral de Detección y Construir la Curva Estándar .	26
4.5. Efecto del Extracto de Gobernadora en la Concentración Viral.....	28
4. 6. Efecto del Extracto de Hojasén en la Concentración Viral.....	30
V. CONCLUSIÓN.....	33
VI. LITERATURA CITADA.....	34

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales constituyentes fitoquímicos de <i>Larrea tridentata</i> . .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Lista de varios métodos de extracción de productos naturales .....	9
<b>Cuadro 3.</b> Modo de acción de productos botánicos contra insectos vectores de enfermedades fitovirales. ....	11

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Agroinfiltración a través de una jeringa sin aguja, introduciendo <i>Agrobacterium</i> en hojas de la planta de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Distribución de tratamientos del extracto <i>Larrea tridentata</i> . .....	19
<b>Figura 3.</b> Distribución de tratamientos del extracto <i>Flourensia cernua</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> agro-infectadas con el virus RhMSinV. .....	24
<b>Figura 5.</b> Gel de agarosa 1%, presenta el resultado de extracción de ADN total de 6 muestras de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Gel de agarosa de 1% mostrando en los carriles 1 y 2 bandas de 1,400 pb usando cebadores específicos al virus RhMSinV.....	26
<b>Figura 7.</b> Determinación del ciclo umbral para la cuantificación viral .....	27
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa 1%, mostrando la intensidad gradual de una dilución serial de ADNc de 1400 pb.....	27
<b>Figura 9.</b> Curva estándar generada a partir del promedio de intensidad.....	28
<b>Figura 10.</b> Efecto del extracto de <i>Larrea tridentata</i> en la acumulación del virus RhMSinV en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Efecto del extracto de <i>Flourensia cernua</i> en la acumulación del virus RhMSinV en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	31

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Químico Aplicada (CIQA), en Saltillo Coahuila. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) y hojaseén (*Flourensia cernua*) en la multiplicación de Rhynchosia mosaic Sinaloa virus (RHMSinV) en *Nicotiana benthamiana*. En el experimento se utilizaron dos clones con el genoma total del geminivirus RhMSinV con sus dos ADN A y B para inocular las plantas de *N. benthamiana*, estos transformados en *Agrobacterium tumefaciens* por separado. Para infectar las plantas modelo se utilizó el método de agroinfiltración una vez comprobada la multiplicación del virus por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fueron establecidos tres tratamientos con 9 repeticiones más el control negativo y positivo, posteriormente se realizó la aspersion de los extractos a las concentraciones de: extracto hidroalcohólico de gobernadora: 10, 5 y 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> y para el extracto acuoso de hojaseén: 20, 10, 5 mg·mL<sup>-1</sup>. La toma de muestras para el primer extracto fue a los 2 días y a los 15 días después de la inoculación mientras que para el segundo extracto fue a los 7 y 15 días dpi, una vez obtenidas las muestras se realizaron diferentes pruebas moleculares las cuales indicaron que el extracto de *Larrea tridentata* a la concentración de 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> suprime el virus hasta por 15 días, mientras que *Flourensia cernua* a los 7 días dpi tiene una supresión en el virus a la concentración de 5 mg·mL<sup>-1</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Los geminivirus constituyen la familia más grande, diversa y económicamente importante de los virus de ADN de plantas (Rojas *et al.*, 2005; Fondong, 2013). La familia *Geminiviridae* se clasifica en nueve géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* (Zervini *et al.*, 2017). Dentro del grupo más ampliamente diversificado y distribuido se encuentran los begomovirus, los cuales infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Lazarowitz, 1992; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018).

Los begomovirus se encuentran entre los patógenos más dañinos que infectan plantas cultivadas en todo el mundo (Morales, 2006) y esto ha sido la principal preocupación en la horticultura mexicana a lo largo de los años, teniendo un impacto negativo significativo en la producción de cultivos de tomate, pimiento, frijol, calabaza, melón, soja, tomatillo, tabaco, sandía y algodón (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2019)

Una probable alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades, es el uso de los productos naturales derivados de las plantas. Las plantas y sus propiedades han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Celis *et al.* 2008).

Los extractos de origen vegetal tienen determinados metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antialimentarios, antivirales, antimicrobianos, repelentes, inhibidores de germinación de semillas que permiten su utilización para proteger a los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Philogenet *et al.*, 2004).

México es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo, estimándose que tiene entre 23,000 y 30,000 especies de plantas, muchas de estas

plantas no han sido exploradas bien para su utilidad medicinal o agronómica como plaguicida (Sarukhan, 2017).

### **1.1. Justificación**

Un ser humano no puede vivir sin alimentos, y para una mejor producción de alimentos saludables, podemos aplicar medidas ecológicas que permite controlar las plagas y enfermedades que aquejan a los cultivos en algún momento de su crecimiento. De otro lado, al realizar esta investigación se pretende identificar agentes anti-fitovirales en extractos de plantas desérticas de México como alternativas naturales que nos ayuden a controlar enfermedades virales en otros cultivos agrícolas. Con este tipo de control biológico se tendrá una alternativa para el manejo de virus de bajo costo y amigable con el ambiente lo cual podría aportar avances a las investigaciones sobre control natural de diversas enfermedades fitoviológicas.

### **1.2. Objetivo general**

- Identificar extractos de plantas de zonas áridas de México con capacidad anti-fitoviral

### **1.3. Objetivo específico**

- Estudiar el efecto del extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) y hojásén (*Flourensia cernua*) en la multiplicación de *Rhynchosia mosaic sinaloa virus* (RHMSinV) en *Nicotiana bentamiana*.

### **1.4. Hipótesis:**

A través de extractos naturales de las plantas como; *Larrea tridentata* (nombre común: gobernadora) y *Flourensia cernua* (nombre común: hojásén) se puede

controlar o disminuir la severidad del begomovirus Rhynchosia mosaic sinaloa virus (RHMSinV) en plantas de *Nicotiana bentamiana*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Plantas Desérticas de México

La palabra desierto o tsert proviene de antiguos jeroglíficos egipcios y significa “lugar que ha sido abandonado, olvidado o dejado atrás. Sin embargo, a pesar de que “desierto” significa que no hay vida, desde el punto de vista geográfico, antropológico y biológico esto no necesariamente es así. En los grandes desiertos del mundo existen poblaciones humanas que aplican diversas estrategias para poder subsistir y vivir de acuerdo con sus creencias. (Karlín, 2013).

La República mexicana está parcial o totalmente ocupados por zonas secas: Baja California, Baja California Sur, Durango, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Zacatecas y Tamaulipas (Valiente- Banuet, 1995).

Las plantas que crecen en ambientes desérticos desarrollan defensas adicionales para atenuar los efectos de altas temperaturas, rayos ultravioletas, sequía y salinidad (Rioja- soto, 2020) y son importantes debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que poseen (Trejo-Márquez *et al.*, 2015).

### 2.2. Gobernadora (*Larrea tridentata* D.C. Coville)

#### 2.2.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Zygophyllaceae

Género: *Larrea*

Especie: *Larrea tridentata*

La gobernadora (*Larrea tridentata*, D.C. Coville), es un arbusto común de los desiertos cálidos de América del Norte. Es una planta importante con una larga historia de uso medicinal (Hanan *et al.*, 2009) Entre las propiedades medicinales propuestas de la gobernadora, la más destacada son sus efectos antioxidantes (Arteaga *et al.*, 2005). Esta especie es de hoja perenne de 1-3 m de altura,

ramificado y nudoso. Las hojas son opuestas con dos folíolos asimétricos que miden aprox. 1 cm de largo. Las hojas son brillantes con una gruesa capa resinosa secretada por una epidermis glandular de las estípulas, ubicada en los nudos; el tallo es leñoso, nudoso e inerme. Las flores son completas y nacen solitarias en las axilas, con cinco pétalos amarillos con garras. El fruto es una cápsula redondeada, cubierta con una densa concentración de pelos blancos. El arbusto es desagradable para el ganado y la mayoría de la vida silvestre, generalmente es tóxico y a veces causa la muerte (Arteaga *et al.*, 2005). Los metabolitos secundarios de la resina (entre los que destacan fenoles, líganos y flavonoides), son defensas bioquímicas para repeler la agresión de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (Lira, 2003).

*L. tridentata* es una fuente notable de productos naturales, donde aproximadamente el 50% del peso seco de las hojas es materia extraíble. Los aceites volátiles forman el 0.1% de su peso seco. Pero también se consiguió extraer de sus hojas algunos flavonoides, alcaloides halógenos y glucósidos (Arteaga *et al.*, 2005). Esta especie se ha utilizado en medicina tradicional para tratar más de 50 enfermedades. Usos más comunes están asociadas a enfermedades de origen renal y ginecológico además de sus propiedades analgésicos, antiinflamatorios y antiviral (Gnabre *et al.*, 2015; Königheim *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2011).

Por otro lado, el extracto de *L. tridentata* se ha usado en agricultura como fungicida (Rodríguez-Guadarrama *et al.*, 2018). Por ejemplo, hasta el 100% del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp., dos hongos que causan problemas importantes en el cultivo de maíz se inhibieron tras aplicación de 3 a 7 mg·mL<sup>-1</sup> de extracto etanólico de gobernadora (Moreno-Limón *et al.*, 2011). El crecimiento del micelio de otro hongo agresivo *Phytophthora cinnamomi* que afecta los cultivos de aguacate, fue inhibido con extractos polifenólicos de *L. tridentata* a concentraciones entre 6.96 y 8.6 mg·L<sup>-1</sup> (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) evaluaron la capacidad antifúngica de extractos de *L. tridentata* en la inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* bajo condiciones experimentales en invernadero. Los extractos con mayor porcentaje de inhibición y desarrollo vegetativo fueron: diclorometano a 3000 ppm y metanol a 4000 ppm, tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez, los polifenoles: el ácido nordihidroguareético y los dos

flavonoides kaempferol y quercetina, encontrados en abundancia en las hojas de *L. tridentata* tienen la característica de conservar y proteger frutas de los siguientes hongos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* sin cambiar sus propiedades, la tasa de respiración o los procesos de madurez después su cosecha (Aguirre-Joya *et al.*, 2018). Además de los compuestos mencionados *L. tridentata* lleva otros componentes fitoquímicos que se presentan en el Cuadro 1 por Brinker (1993).

Las hojas de este arbusto están cubiertas con una capa resinosa que contiene una mezcla compleja de fenólicos, saponinas, terpenoides y ésteres de cera que representan del 20 al 35% de la hoja en peso seco. Más del 80% de la resina está compuesta de agliconas fenólicas con el componente principal ácido nordihidroguareético (Hernández *et al.*, 2006). La resina extraída de la gobernadora en combinación con la técnica de solarización se propuso como método alternativo para el control de hongos y nematodos en condiciones de campo (Lira *et al.*, 2004).

**Cuadro 1.** Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata*.

Porcentaje del Tipo Compuesto peso seco	Tipo	Compuesto
16-21	Lígnanos Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-norisoguaiacin Ácido nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin
10-15		Kaempferol
0.1-0.2	Saponinas	
	Triterpenos	Larreagenin A Ácido Larréico
	Monoterpenos	
	Volátiles	
	Hidrocarburos 35	Alpha penene Delta-3-carene Limoneno
	Aromático	Benzaldheído Benzilacetato Benzilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos	
	Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
70.1 (de tallos)	Lípidos	Alkil ésteres (C46-C56)

## 2.3. Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.)

### 2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Flourensia*

Especie: *Flourensia cernua*

*Flourensia cernua* (nombre común hojasén) es un arbusto endémico dominante en el suroeste de los Estados Unidos (Texas, Nuevo México y Arizona), el norte y centro de México (Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, San Luis Potos, Guanajuato e Hidalgo), Argentina y Chile (Rios, 2015). La resina incluye abundantes compuestos fenólicos y taninos condensados que proporcionan una barrera química para prevenir ataques de insectos y herbívoros.

Al igual que la gobernadora, hojasén se usó mucho en la medicina tradicional. De los fitoquímicos obtenidos por extractos etanólicos de las hojas de esta especie, se pueden encontrar: sesquiterpenos, pirazinas y esteroides oxigenados (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2017). Además, tiene propiedades fungicidas, por ejemplo, se han reportado efectos de inhibición sobre *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* con extractos metanólicos (Gamboa *et al.*, 2003). De la misma manera que en la gobernadora sus productos polifenólicos inhiban el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* a concentraciones bajas (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Los extractos etanólicos de las hojas de hojasén a 2.2 y 2.7 mg·L<sup>-1</sup> mostraron una alta efectividad en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer*, respectivamente mientras que sus extractos acuosos se estudiaron contra *R. stolonifer*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* y los extractos con solventes orgánicos alternativos (lanolina, manteca de cacao) contra *R. solani* (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2017). Además de ser antifúngicas, su extracto tiene propiedades antibacteriano y antioxidante (Méndez *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2018). *F. cernua* es también una fuente de compuestos fenólicos

como: quercetina, catequina, ácido elálgico, ácido cinámico y galato de metilo. Se ha evaluado su utilidad de ser introducido en recubrimientos comestibles para reducir las pérdidas postcosecha de fruta (como tomate) (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2017).

## 2.4. Extractos Vegetales

Los extractos vegetales y sus componentes principales poseen un amplio espectro de actividades biológicas, que pueden ser de gran importancia en varios campos. En la naturaleza muchos de estos componentes juegan un papel importante en la resistencia contra enfermedades e insectos (Michaelakis *et al.*, 2007; Dunkić *et al.*, 2010; Bishop, 1995). *In vitro* se ha demostrado que los extractos crudos etanólicos de algunas plantas exhiben propiedades antibacterianas (Bitchagno *et al.*, 2015), antivirales, antioxidativas (Li *et al.*, 2017), antimicóticas, antiparasitarias e insecticidas (Ashok *et al.*, 2010).

La ventaja de usar extractos orgánicos naturales para combatir enfermedades frente al uso de productos químicos sintéticos es la rápida biodegradabilidad de los metabolitos orgánicos, ya que estos desaparecen con facilidad del medio ambiente aéreo y del suelo después de que son aplicados en el campo (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

La extracción es el primer paso para separar los productos naturales deseados de las materias primas. Los métodos de extracción incluyen extracción con solvente, método de destilación, prensado y sublimación (Cuadro 2). De los cuales, la extracción con solvente es el método más utilizado. Las propiedades del solvente de extracción, el tamaño de partícula de las materias primas, la relación solvente-sólido, la temperatura y la duración de la extracción afectarán la eficiencia de una extracción. En este tipo de extracción, los alcoholes (etanol, EtOH y metanol, MeOH) son los solventes universales para la investigación fitoquímica (Zhang *et al.*, 2018).

**Cuadro 2.** Lista de varios métodos de extracción de productos naturales (Zhang *et al.*, 2018)

<b>Método</b>	<b>Solvente</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Presión</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Volumen consumido de solvente</b>
<b>Maceración</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente	Atmosférico	Largo	Grande
<b>Percolación</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente, ocasionalmente bajo calor.	Atmosférico	Largo	Grande
<b>Decocción</b>	Agua	Bajo calor	Atmosférico	Moderar	Ninguna
<b>Extracción por reflujo</b>	Solventes acuosos y no acuosos	Bajo calor	Atmosférico	Moderar	Moderado
<b>Extracción de Soxhlet</b>	Solventes orgánicos	Bajo calor	Atmosférico	Largo	Moderado
<b>Extracción líquida presurizada</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Bajo calor	Alto	Corto	Pequeño
<b>Extracción de fluido supercrítico</b>	Fluido supercrítico (generalmente S-CO <sub>2</sub> ), a veces con modificador	Cerca de temperatura ambiente	Alto	Corto	Ninguno o pequeño
<b>Extracción asistida por ultrasonido</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente o bajo calor	Atmosférico	Corto	Moderado
<b>Extracción asistida por microondas</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente	Atmosférico	Corto	Ninguno o moderado
<b>Extracción de campo eléctrico pulsado</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente o bajo calor	Atmosférico	Corto	Moderado
<b>Extracción asistida por enzimas</b>	Agua, solventes acuosos y no acuosos.	Temperatura ambiente o calentada después del tratamiento enzimático	Atmosférico	Moderar	Moderado
<b>Hidro destilación y vapor destilación</b>	Agua	Bajo calor	Atmosférico	Largo	Ninguna

## 2.5. Efecto Antifitoviral de los Extractos de Plantas

El efecto antiviral de los extractos de plantas se comprobó ampliamente con virus que afectan animales y el ser humano (Biswas *et al.*, 2019; Grauso *et al.*, 2019; Ebenezer *et al.*, 2019). Sin embargo, en plantas, el control de enfermedades virales con extracto de plantas fue reportado en pocos trabajos. En 2010, Qijian *et al.* demostraron con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en

inglés) cuantitativa en tiempo real (qPCR) que el compuesto 1-fenil-1,3,5-triheptalquina extraído de la planta *Coreopsis drummondii*, suprime la actividad del gen de la cápside del virus mosaico del tabaco (Tomato mosaic virus-TMV). Con una concentración de  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  del extracto tuvo una tasa de inhibición del 73.5% en la infección y 84.3% en la replicación del virus. La multiplicación del mismo virus en *Chenopodium quinoa* Willd., *Cucumis sativus* L. y *Phaseolus vulgaris* L. fue inhibida con aceites esenciales extraídos de las siguientes plantas: *Melaleuca leucadendron* L. *Myrtus communis* L. y *Satureja montana* L. (Jerković-Mujkić *et al.*, 2013).

La acción antiviral de los aceites esenciales extraídos de plantas de lavanda (*Lavendular vera*) se detectó contra el virus de la marchitez del tomate (Tomato spotted wilt virus-TSWV) en plantas de tomate. Todas las concentraciones estudiadas ( $0.5$ ,  $1.0$  y  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), no solo causaron reducción de la incidencia y la gravedad del virus, sino también dieron un aumento significativo en los pigmentos fotosintéticos, azúcares solubles totales, fenoles y flavonoides solubles totales, así como la actividad de catalasa, peroxidasa y polifenol oxidasa en comparación con las plantas control infectadas (Kobeasy *et al.*, 2013).

En 2018, Yazdi *et al.*, estudiaron el efecto de varios fito-extractos etanólicos en plantas de tabacco (*Nicotiana tabacum*) infectadas con el virus de Necrosis de la nervadura del tabaco (Potato virus Y variante PVY<sup>NTN</sup>) que produce necrosis y muerte de la planta. Los autores demostraron que  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto de hojas del árbol *Strophanthus speciosus* redujeron significativamente la expresión de síntomas de PVY<sup>NTN</sup> *in vitro* e *in vivo* sin afectar el crecimiento y desarrollo normales de la planta.

Recientemente Wang *et al.*, (2020) reportaron que el extracto de ajo crudo actúa como un inhibidor significativo contra una amplia gama de virus de la vid. Los resultados de estos autores mostraron por qPCR en tiempo real una significativa reducción en la acumulación del RNA viral de siete virus que causan enfermedad del enrollamiento de la vid. También mostraron que el extracto de ajo induce la expresión de genes relacionados con la patogénesis y estimula la actividad de enzimas antioxidantes en plantas de vid (Wang *et al.*, 2020).

Cabe mencionar que el control de virus de plantas con extractos vegetales puede ser de manera indirecta, controlando o reduciendo la población de insectos vectores en las áreas cultivadas. A continuación, en el Cuadro 3 se presenta una lista de plantas cuyos extractos causaron reducción en la población vectorial de importantes enfermedades fitovirales. El efecto de estos extractos es variable puede ser repelente, anti-alimentario y regulador o inhibidor del crecimiento de los insectos, entre otros (Jeyalakshmi *et al.*, 2015).

**Cuadro 3.** Modo de acción de productos botánicos contra insectos vectores de enfermedades fitovirales.

Modo de acción de productos botánicos contra insectos vectores de enfermedades fitovirales					
Nombre de la planta	Vector	Fitovirus	Planta huésped	Modo de acción	referencia
<i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam	Mosca blanca	TYLCV	Tomate	IGRs	El-Dougdoug <i>et al.</i> (2017)
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr	Mosca blanca	TYLCV	Tomate	Repelente	Baldin <i>et al.</i> (2013)
<i>ZAllium sativum</i> L.	Mosca blanca	CLCuV	Algodón	IGRs	Ali <i>et al.</i> (2010)
<i>Eucalyptus globules</i> Labill.	Mosca blanca	CLCuV	Algodón	IGRs	Ali <i>et al.</i> (2010)
<i>Eucalyptus globules</i> Labill.	Mosca blanca	CLCuV	Algodón	IGRs	Ali <i>et al.</i> (2010)
<i>Clerodendrum inerme</i> (L.) Gaertn.	Mosca blanca	ToLCV	Tomate	Repelente	Reddy <i>et al.</i> (2010)
<i>Gliricidia maculata</i> (Kunth)	Mosca blanca	ToLCV	Tomate	Repelente	Reddy <i>et al.</i> (2010)
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Mosca blanca	ToLCV	Tomate	Repelente	Reddy <i>et al.</i> (2010)
<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nee ex Steud.)	Trips	TSWV	Tomate	Repelente	Reitz <i>et al.</i> (2010)
<i>Calotropis procera</i> (Ait.) Ait.f	Saltamontes	RTV	Arroz	IGRs	Prakash <i>et al.</i> (2008)
<i>Pongamia pinnata</i> Ventenat.	saltamontes	RTV	Arroz	IGRs	Prakash <i>et al.</i> (2008)
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden y Betcher) Cheel	Trips	TSWV	Tomate	repelente	Reitz <i>et al.</i> (2008)
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Saltamontes	RTV	Arroz	IGRs	Senthil Nathan <i>et al.</i> (2007)
<i>Vitex negundo</i> Linn.	Saltamontes	RTV	Arroz	IGRs	Rajappan <i>et al.</i> (2000)
<i>Boerhaavia difusa</i> Linn.	Mosca blanca	ToLCV	Tomate	Repelente	Awasthi and Rizvi (1999)

IGRs, sustancias reguladoras del crecimiento de insectos; CLCuV, virus del rizo de la hoja de Algodón: RTV, virus de Arroz tungro: ToLCV, virus del enrollamiento de la hoja de tomate: TYLCV, virus de rizo de hoja amarilla de tomate: TSWV, virus de la marchitez del tomate.

## **2.6. *Nicotiana Benthamiana***

*Nicotiana benthamiana* es nativa de Australia es una especie de importancia agronómica en la familia de las solanáceas, que incluye pimiento, tomate, papa y tabaco. Esta planta es alotetraploide con un genoma compuesto por 19 cromosomas; su progenitor materno es *Nicotiana sylvestris* (Kelly *et al.*, 2013). A pesar de la distribución natural exclusivamente australiana de *N. benthamiana*, ahora se cultiva en invernaderos y cámaras de crecimiento de instituciones de investigación y empresas de biotecnología de todo el mundo. Originalmente fue sacada de la oscuridad por virólogos en la década de 1940 (Kostoff D. 1940), y utilizado en ensayos de diagnóstico para la presencia e identificación de virus en la década de 1980 (Van Dijk *et al.*, 1987; Bally *et al.*, 2018).

Hoy es ampliamente utilizada como planta modelo para el estudio de cuestiones fundamentales en las interacciones moleculares planta-microbio y otras áreas de la biología vegetal. Esta popularidad deriva de su susceptibilidad a diversos patógenos y especialmente al silenciamiento génico inducido por virus y métodos de expresión transitoria de proteínas. (Bombarely *et al.*, 2012)

## **2.7. Geminivirus**

Los geminivirus son virus que infectan a las plantas y se caracterizan por un genoma de ADN monocatenario (ADNss) de 2.7 o 3.0 kb, este genoma comprende dos componentes de ADN (bipartito: ADN A y ADN B) o un solo componente de ADN (monopartito). Tienen una o dos cápsides alargadas formadas por la unión de dos icosaedros incompletos (o gemelos). La cápside tiene un diámetro de 18-20 nm y una longitud de unos 30 nm (Ramesh *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2001).

De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la familia *Geminiviridae* constituye la mayor familia viral conocida, superando en número de especies descritas (~300) a todos los grupos de virus que infectan plantas, animales, hongos, algas y otros sistemas eucarióticos o procarióticos, como bacterias y arqueas (Ramesh *et al.*, 2017). Se reconoce nueve géneros de la familia

Geminiviridae: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus* (Zervini *et al.*,2017), la clasificación se realizó tomando en consideración la estructura del genoma, las relaciones filogenéticas, el vector de insectos y el rango de huéspedes (Brown *et al.*, 2012).

La distribución global de geminivirus está directamente relacionada con el vector, *Bemisia tabaci*, se estima que esta especie de mosca blanca es capaz de establecerse en 500 plantas como hospedero alrededor del mundo, por lo que se le considera una especie cosmopolita de mayor importancia en la transmisión de virus (Morales y Anderson, 2001) y puede desplazar hasta 200 Km de radio (Deying *et al.*, 2006).

Los geminivirus afectan varios cultivos entre ellos; maíz, yuca, frijol, calabaza, otras cucurbitáceas y tomate, producidos en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Bisaro, 1996).

### **2.7.1. Begomovirus**

Los begomovirus poseen un genoma compuesto por dos moléculas circulares, denominadas DNA-A y DNA-B de 2.6 kb, cada segmento está envuelto con dos icosaedros gemelos, formando dos partículas necesarias para la infección (Malgarejo *et al.*, 2013). El ADN A lleva cuatro genes que expresan la proteína del cáncide, la replicación, la transactivación y la de acumulación (Gutiérrez *et al.*, 2004). Mientras el ADN B, lleva solo dos genes, implicados en el movimiento y transferencia citoplasma-núcleo (Gafni y Epel, 2002). Ambos componentes están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica (RI), la cual contiene el origen de la replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de una secuencia de la RI de aproximadamente 200 pb, que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley *et al.*, 2000).

El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartita a excepción del Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) (Lazarowitz, 1992).

Los begomovirus generalmente inducen síntomas graves en sus anfitriones, que incluyen mosaico amarillo, mosaico dorado y rizo de hojas (Zhou, 2013; Lozano *et al.*, 2016). Los periodos de adquisición, retención y transmisión de los begomovirus muestran que el periodo de adquisición a la inoculación mínima reportado (AAP) y el periodo de acceso de transmisión a la inoculación (IAP) están en un rango de 15 a 60 minutos y de 15 a 30 minutos, respectivamente, tanto para begomovirus del viejo mundo como para los del nuevo mundo (Brown *et al.*, 2002)

### **2.7.1.1. Síntomas**

Ya sean aislados o en combinación; mosaico amarillo brillante, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, otras deformaciones foliares como abultamientos o ampollamientos, reducción del área foliar, enanismo, abscisión floral, hoja purpuras, reducción del tamaño de frutos, amarillamiento y enchinamientos (Polston y Anderson, 1997).

## **2.8. Agroinfiltración**

Es una metodología útil en la producción de proteínas recombinantes en plantas que explota la expresión transitoria. Se sirve también como vehículo para introducir el transgén en las células, pero la cepa recombinante se infiltra en la planta, principalmente en las hojas. Puede realizarse manualmente, de forma local y directa, o bien utilizando una cámara de vacío. En ese caso, las hojas se sumergen en una solución con la cepa de tras sacar de ellas el aire por vacío. Se aplica entonces una presión para que los espacios intersticiales se rellenen con la solución. Una vez allí, infecta y transfiere el gen de interés a las células de las hojas en un número muy elevado de copias, y aunque el porcentaje de las que se integran en el genoma es bajo (5-9%), casi todas acceden al núcleo y se expresan de forma transitoria. La expresión mayoritariamente transitoria del transgén se aprovecha para producir altas cantidades de proteína en poco tiempo por varios motivos: (i) la

síntesis se inicia a los 3-4 días de la agroinfiltración, (ii) no es necesaria la regeneración de plantas, pues el objetivo no es obtener una planta transgénica con un nuevo carácter heredable, y (iii) tampoco se requiere seleccionar las células transformadas (Asensio y Centeno, 2016).

El método más popular de agroinfiltración es la "agroinfiltración por jeringa", que implica el uso de una jeringa sin aguja para introducir *Agrobacterium* en hojas de plantas. A nivel laboratorio se puede hacer con una jeringa, en donde el procedimiento se lleva a cabo en dos pasos: A. Primero se realiza una pequeña herida en el envés de la hoja; B. Luego se agrega la solución del *Agrobacterium tumefaciens* ya modificado con el vector viral y el gen de interés utilizando una jeringa sin aguja a través de la herida en los espacios intracelulares de la hoja (Díaz, 2014).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación del Experimento**

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), localizado al noreste de la ciudad de Saltillo (Coahuila, México), con las coordenadas geográficas 25°23´ Latitud Norte y 101°59´ Longitud Oeste con una altura de 1600 msnm.

Se cultivaron plantas de *Nicotiana benthamiana* en cámara de crecimiento.

La preparación de extractos y los análisis moleculares se realizaron en los laboratorios del Departamento de Biociencias y Agrotecnología del CIQA.

#### **3.2. Cultivo de *Nicotiana benthamiana***

Para llevar a cabo la germinación de *N. benthamiana* se desinfectaron las semillas de la siguiente manera: primero se pasaron por agua de grifo para quitar impurezas, después se lavaron en detergente diluido en agua estéril (una gota del detergente comercial savia durante cinco minutos con agitación periódica, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en alcohol al 30% por 20 segundos, luego se lavaron tres veces con agua destilada antes de colocarlos en hipoclorito de sodio al 30% durante 15 min (agitando periódicamente). Para terminar, se enjuagaron cinco veces con agua destilada, y se dejaron en agua destilada por un día.

Una vez que se tenían las semillas desinfectadas se sembraron en sustrato previamente esterilizado (en este caso se utilizó Peat moss) y se incubaron en oscuridad a 25 °C hasta su germinación. Las plántulas obtenidas se trasplantaron en macetas pequeñas y se trataron con solución nutritiva de Fahraeus durante todo el ensayo (Fahraeus 1957.). La inoculación del virus se realizó cuando las plantas cumplieron un mes de edad eso significa cuando las plantas tuvieron de cinco a seis hojas completamente desarrolladas.

### 3.3. Clones Infecciosos y Agroinfiltración

Los dos clones utilizados en este trabajo para inocular las plantas de *N. benthamiana*, con el virus RhMSinV fueron cedidos por el Dr. Gerardo Rafael Arguello Astorga (División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México). Los clones incluyen el genoma total del geminivirus RhMSinV con su dos ADN A y B, transformados en *Agrobacterium tumefaciens* en separado y llevan la resistencia a los antibióticos Kanamicina (K) y Rifampicina (R).

Para sembrar las células de *A. tumefaciens* transformadas en placas de Petri, se preparó un medio sólido de Luria Bertani (LB-agar) siguiendo la construcción de los proveedores con adición de los antibióticos K y R. El crecimiento de la bacteria se realizó a 28 °C durante 48 horas.

Para preparar el cultivo infeccioso de *A. tumefaciens*, se incubaron a partir de unas colonias aisladas, células de los dos clones A y B en el mismo medio líquido LB+K+R a 28 °C en agitación continua hasta alcanzar D.O. (Densidad Óptica) de 0.5 (aprox. 18 h). Luego se realizó una colecta de las células centrifugando (8 min a 5000 rpm) en condiciones frías 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en una solución (10 mM MES (compuesto ácido 2- (N -morfolino) etanosulfónico) pH 5.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, acetosiringona 150 μmol) y se dejó a temperatura ambiente durante dos a tres horas. El siguiente paso consistió en agroinfiltrar la solución en las plantas.

Para infectar las plantas de *N. benthamiana* con el virus RhMSinV se usó el método de agroinfiltración que consiste en infiltrar el *Agrobacterium* transformado en la planta por medio de presión usando como media una jeringa de 1.0 mL sin aguja (Figura 1).

**Figura 1.** Agroinfiltración a través de una jeringa sin aguja, introduciendo *Agrobacterium* en hojas de la planta de *Nicotiana benthamiana* (Chen *et al.*, 2013).



### 3.4. Preparación de Extractos Vegetales

Se prepararon dos tipos de extractos: acuoso (agua destilada) e hidroalcohólico (etanol al 70%); los metabolitos secundarios de *Flourensia cernua* y de *Larrea tridentata*, se extrajeron a partir de hojas colectadas de plantas silvestres en el municipio de Saltillo, Coahuila. El material vegetal se secó en horno a una temperatura de 70 °C por 24 h, posteriormente se molieron con ayuda de una licuadora industrial.

Extracto hidroalcohólico: se preparó un extracto de *L. tridentata* en una relación de 1:10 (p/v) biomasa seca-solvente utilizando etanol al 70%, la suspensión se colocó en un baño ultrasonido por 20 min para la extracción de los metabolitos secundarios y se dejó reposar toda la noche a 4 °C. En seguida se eliminaron los restos celulares con papel filtro número 1 (1,001-150, Whatman), la solución resultante se centrifugo a 15,000 rpm por 5 min y se extrajo el sobrenadante del extracto. El sobrenadante se concentró mediante rotavapor a sequedad, el material se resuspendió en metanol (100%), el cual se evaporó y se obtuvo 1.0 g de extracto concentrado. El concentrado se almaceno en frascos de vidrio previamente etiquetados y refrigerados a -20 °C hasta su uso. Del concentrado obtenido se realizó una solución madre a una concentración de 10 mg·mL<sup>-1</sup>. A partir de la solución madre se realizaron diluciones 5.0 mg mL<sup>-1</sup> y 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>.

Extracto acuoso: los metabolitos secundarios de *F. cernua* se extrajeron mediante un proceso de decocción a 60 °C. La biomasa se adiciono al agua a la temperatura mencionada y se mantuvo en agitación por 60 min, se utilizó una proporción 1:10 (p/v). La suspensión resultante se enfrió a temperatura ambiente y se eliminaron los restos celulares usando papel filtro número 1 (1,001-150, Whatman), el filtrado obtenido se centrifugo a 9,000 rpm por 20 min. El sobrenadante se almaceno en frascos de vidrio previamente etiquetados y refrigerados a -80 °C hasta su uso, con un tiempo máximo de 30 días de almacenamiento. Las diluciones preparadas fueron 16.6, 8.3 y 4.1 mg·mL<sup>-1</sup>.

### 3.5. Tratamientos y aplicaciones y muestreos

La distribución de tratamientos de los extractos de gobernadora y hojásén fueron como se muestran en las Figuras 2 y 3 en experimento 1 y 2 respectivamente.

Experimento 1:

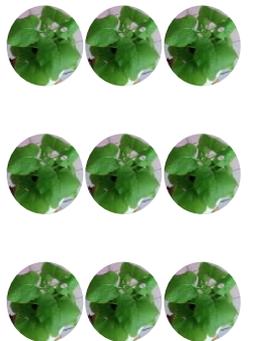
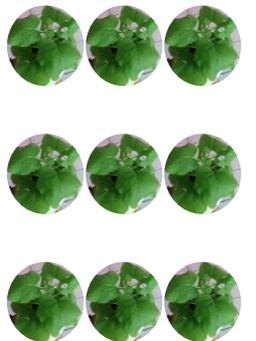
- Tres tratamientos formados con plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el virus RhMSinV y tratadas con aspersion a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la gobernadora, nombrados: G10, G5 y G2.5.
- Dos tratamientos controles no tratados con extracto de plantas: uno formado de plantas con el virus (GC+) y uno con plantas sanas (GC-).

Control		Extracto de gobernadora		
+	-	Tratamientos		
		2.5mg/ml	5mg/ml	10mg/ml

Figura 2. Distribución de tratamientos del extracto *Larrea tridentata*.

## Experimento 2:

- Tres tratamientos formados con plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el virus RhMSinV y tratadas con aspersión a diferentes concentraciones del extracto etanólico de hojaseén, nombrados: H4.1, H8.3 y H16.6.
- Dos tratamientos controles no tratados con extracto de plantas: uno formado de plantas con el virus (C+) y uno con plantas sanas (C-).

		Extracto de hojaseén		
Control		Tratamientos		
+	-	4.1mg/ml	8.3mg/ml	16.6mg/ml
				

**Figura 3.** Distribución de tratamientos del extracto *Flourensia cernua*

Las aplicaciones de los extractos en los dos casos se realizaron a siete días post inoculación (dpi) de plantas con el virus RhMSinV

### 3.5.1. Fecha de muestreo

Experimento 1, el muestro se realizó a:

- A dos días después la aplicación del extracto (2 dpi)
- A quince días después la aplicación del extracto (15 dpi)

Experimento 2, un muestro se realizó a todas las plantas antes y después la inoculación. Las fechas de muestreo fueron:

- Antes la aplicación del extracto (a 0 dpi),
- A siete días después la aplicación del extracto (7 dpi)
- A quince días después la aplicación del extracto (15 dpi)

Para realizar los muestreos se utilizó un sacabocado que permite tomar muestra de hojas de plantas en forma de discos de 1.0 cm de diámetro. Se tomaron tres discos de hojas jóvenes por planta en el mismo tubo eppendorf (1.5 mL) y se guardaron directamente en nitrógeno líquido, para conservar el material genético de la degradación. Por último, fueron guardadas a -80 °C para su previo estudio.

## **3.6. Análisis Molecular**

### **3.6.1. Extracción de ADN total**

La extracción del ADN total de las muestras tomadas previamente y conservadas a -80 °C se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sreelakshmi *et al.* (2010). Con ayuda de nitrógeno líquido se machacó cada muestra, se añadió 750  $\mu\text{L}$  del tampón de extracción, y se incubó durante 30 min a 65 °C. Para eliminar todo tipo de RNA se añadió a la muestra 53  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de RNasa, y se incubó 30 min a 37 °C. Para separar las proteínas y el resto de la célula se añadió 400  $\mu\text{L}$  de 6.0 M acetato de amoníaco, y se dejó en frío 15 min, pasado este tiempo se centrifugó a 4,700 rpm durante media hora y se conserva el sobrenadante en un nuevo tubo. Para precipitar el ADN que se encuentra en el sobrenadante se agregó el mismo volumen de isopropanol frío (~ 650  $\mu\text{L}$ ) y se dejó a -20 °C durante 2 h, luego se centrifugó a una velocidad de 4,700 rpm durante una media hora. El sobrenadante se tiró y el pellet obtenido se lavó con etanol 70% dos veces, una vez hecho se secó el pellet a 65 °C por 10-15 min.

### **3.6.2. Purificación de DNA**

Para garantizar una buena lectura de la concentración del producto obtenido tras extracción, se prosiguió a purificar todas las muestras con el método de fenol-cloroformo, y precipitar el ADN con sales y dos volúmenes de etanol 100%. Por ello, a partir de 50  $\mu\text{L}$  del extracto de ADN obtenido de cada muestra, se aumentó el volumen a 500  $\mu\text{L}$  con agua estéril y 10% del volumen de acetato de sodio 3.0 M. Después se agregó 500  $\mu\text{L}$  de fenol, y tras centrifugación a 14,000 rpm durante 15

min, se formaron dos fases de las cuales se separó la fase sobrenadante y se la añadió 1:1 volumen de cloroformo/isoamil (14:1) con el motivo de asegurar la eliminación total del fenol. Este paso se repitió dos veces. La precipitación se realizó con etanol al 100% y centrifugación a 24,000 rpm durante 20 min. El pellet que se formó se resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

### **3.6.3. Cuantificación del ADN total y electroforesis**

Para verificar que los procesos de extracción y purificación no dañaron el ADN esperado, se realizó análisis de electroforesis con tampón de corrida TAE 1%. El recorrido de la muestra se realizó en un gel Agarosa 1%.

Para estimar la concentración (en  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) del ADN purificado, se utilizó el espectrofotómetro "BioTek Epoch Microplate". En el cual la concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. La relación A260/280 nos permitió determinar la pureza de ADN, el valor óptimo de pureza estuvo entre 1.8-2.0, el cual era el esperado. Un valor A260/280 <1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, y un valor >2.1 indica la presencia de ARN en las muestras (Sambrook y Russell, 2001).

### **3.6.4. Detección y cuantificación del virus mediante PCR**

Para la detección y cuantificar la concentración del virus en las muestras, se usó la técnica de la reacción en cadena de polimerasa o PCR. Esta técnica permite la amplificación exponencial de un fragmento de ADN de doble cadena utilizando cebadores específicos y complementarios a los extremos 3' de cada cadena del fragmento. La amplificación exponencial permitió la comparación y la cuantificación de la concentración inicial del fragmento amplificado en las muestras analizadas. En este trabajo se usaron cebadores descritos previamente en Gregorio-Jorge *et al.* (2010).

Para realizar la PCR se usó la polimerasa Platinum Taq DNA polimerasa de Invitrogen siguiendo las recomendaciones de los proveedores. La concentración de ADN total usada en cada reacción fue  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  y las condiciones de la PCR fueron las siguientes; desnaturalización a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 45 seg, alineamiento a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 segundos y polimerización a  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 min 30 segundos. Estas condiciones se repitieron en 18 ciclos.

Una PCR semicuantitativa absoluta se usó para estimación la concentración del virus en las muestras. Por ella, se generó una curva estándar. La concentración inicial de las muestras, el número de ciclos umbral para la cuantificación y la curva estándar fueron optimizados tras varias pruebas de amplificaciones.

### **3.6.5. Curva Estándar**

A partir de ADNc purificado usando el kit nucleospin gel and PCR clean-up y cuantificado, se realizó una serie de diluciones 1:3. Las concentraciones obtenidas fueron: 50, 33.3, 22.2, 14.8 y  $9.8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

## IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Desarrollo de Síntomas Virales y Detección del Virus en Plantas de *N. benthamiana*

La inoculación del virus por el método de agroinfiltración se realizó en plantas de *N. benthamiana* con 5-6 hojas completamente desarrolladas sin floración. Todas las plantas inoculadas mostraron síntomas virales en las hojas apicales a 10 dpi como lo muestra la Figura 4. Lo que indica que la inoculación por el método de agroinfiltración fue satisfactoria y el virus fue capaz de replicarse y transmitirse a hojas nuevas. Este método es el más utilizado por los investigadores por su efectividad (Valero Martínez, MC. 2016). Dando los mejores resultados en la infiltración de hojas. (Ramírez *et al.*, 2018).



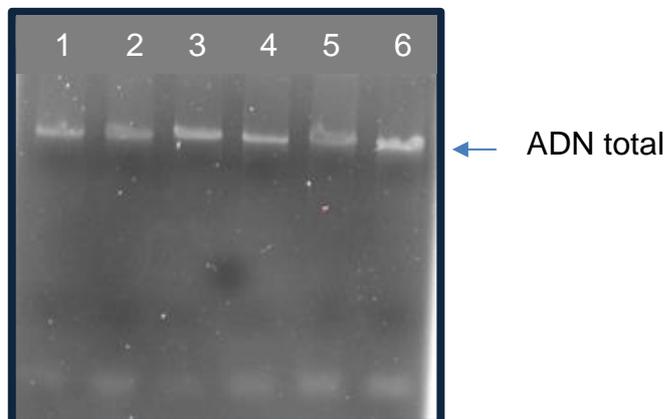
**Figura 4.** Plantas de *Nicotiana benthamiana* agroinfectadas con el virus RhMSinV (a) 1 dpi, las plantas no muestran síntomas (b) 10 dpi, síntomas de amarilleo, mosaico y leve hinchamiento en hojas jóvenes. Las flechas muestran los puntos de inoculación.

Las plantas agroinfectadas con el virus presentaron síntomas de amarillamiento, mosaico y leve enchinamiento en las hojas jóvenes esto concuerda a que los síntomas presentados pertenecen al geminivirus (Reveles-Torres *et al.*, 2019)

## 4.2. Extracción de ADN y Cuantificación

A 7 dpi se tomaron muestras de todas las plantas antes la diferenciación por tratamientos. Los resultados en el gel de agarosa 1% tras extracciones y purificaciones del ADN total de las muestras tomadas, mostraron en general un buen rendimiento (Figura 5), ya que la obtención de ADN integro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014). sin embargo, durante el proceso en algunos casos se perdió el extracto. Estas muestras se eliminaron del estudio.

La cuantificación espectrofotométrica de los extractos dio valores de pureza entre 1.6 y 2.2. A pesar de que los valores óptimos están descritos entre 1.8 y 2.0, sin embargo, valores como 1.6 y 2.2 se consideran aceptables tanto que no afectan la amplificación posterior (Sambrook & Russell, 2001). Esto nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA/RNA) de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR (Rodríguez-Tarduchy, 2014).

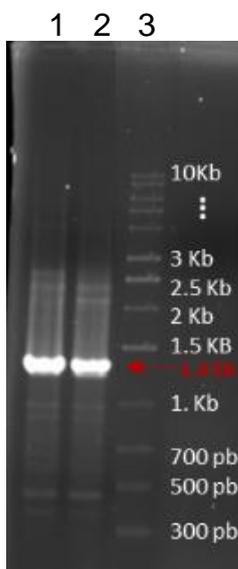


**Figura 5.** Gel de agarosa 1%, presenta el resultado de extracción de ADN total de 6 muestras de *Nicotiana benthamiana*. Cada pocillo corresponde a 2.0  $\mu$ L del extracto de una muestra.

## 4.3. Detección de la Presencia del Virus RhMSinV por PCR.

Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (la

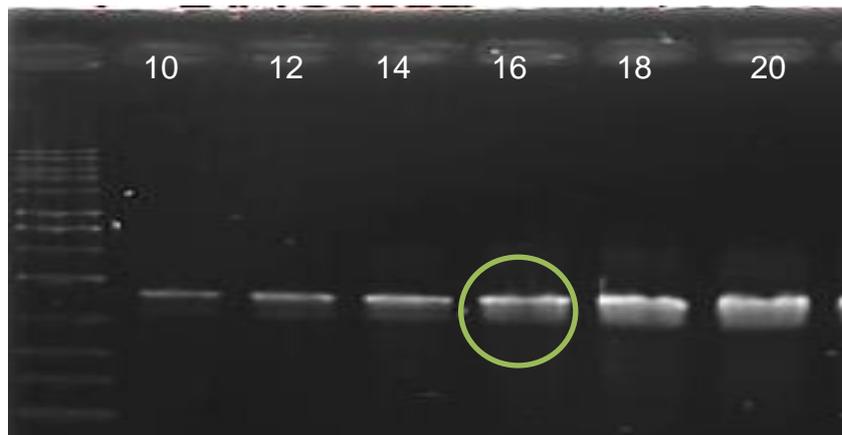
región que debe ser copiada) estos son elegidos por el o la investigadora (Khan Academy, 2020). Los cebadores específicos utilizados permitieron amplificar ADNc de ~1400 pb por PCR a partir de plantas de *N. benthamiana* con síntomas virales (Figura 6). Mientras que, en las plantas no inoculadas, no se detectó amplificación.



**Figura 6.** Gel de agarosa de 1% mostrando en los carriles 1 y 2 bandas de 1,400 pb usando cebadores específicos al virus RhMSinV. El carril 3 corresponde al marcador de ADN de 1 Kb-Axygen.

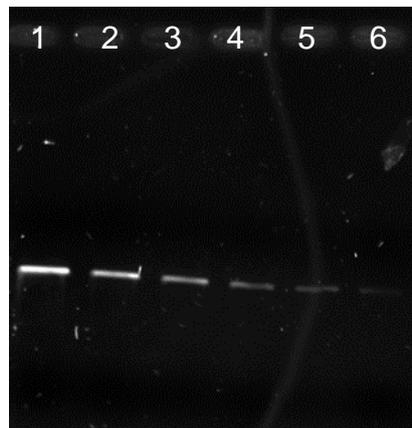
#### **4. 4. Determinar el Ciclo Umbral de Detección y Construir la Curva Estándar**

Utilizando las concentraciones  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  y  $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  en el primer (gobernadora) y el segundo (hojasén) experimento, respectivamente, se determinó el ciclo 16 de la PCR como el ciclo umbral de cuantificación (Figura 7). La búsqueda del ciclo umbral fue importante, para garantizar la detección de concentraciones bajas y evitar la saturación luminosa de concentraciones altas. El ciclo umbral se considera como el punto en el cual la reacción de ampliación da comienzo es un valor definido de forma arbitraria por el usuario, aunque es posible definirlo de forma matemática (Alba-Aguayo *et al.*, 2013).

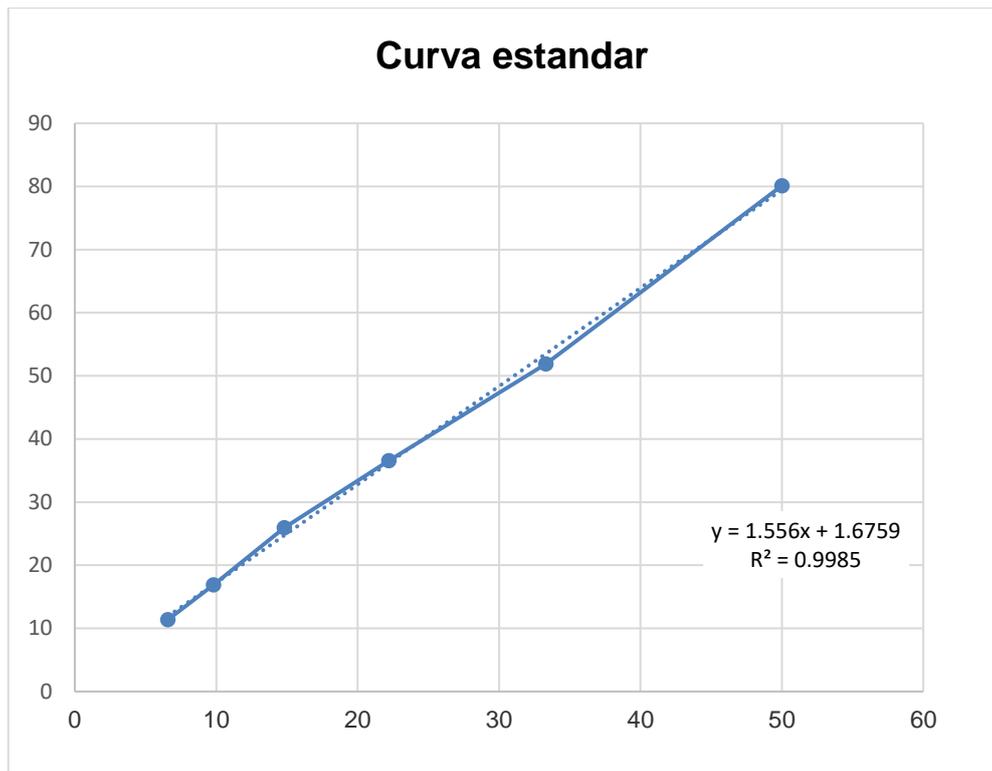


**Figura 7.** Determinación del ciclo umbral para la cuantificación viral, se muestra los ciclos números 10,12,14,16,18 y 20. El círculo muestra el ciclo número 16 siendo el ciclo con concentración, saturación y luminosidad óptima.

La Figura 8, presenta un gel de agarosa 1% realizado con una serie de diluciones de ADNc correspondiente a 1,400 pb de la secuencia viral. Las concentraciones de cada dilución fueron: 50, 33.3, 22.2, 14.8 y 9.8 y 6.57 ng. El promedio de luminosidad de cada banda se usó para la construcción de la curva estándar (Figura 9). Se generó una línea recta con la ecuación  $y = 1.556x + 1.6759$ ; donde "x" en la curva corresponde a la concentración e "y" al promedio de luminosidad.



**Figura 8.** Gel de agarosa 1%, mostrando la intensidad gradual de una dilución serial de ADNc de 1400 pb. Las concentraciones desde el carril 1 hasta 6 fueron: 50, 33.3, 22.2, 14.8 y 9.8 y 6.57 ng, respectivamente.



**Figura 9.** Curva estándar generada a partir del promedio de intensidad en la parte inferior se observa la ecuación de la recta. El eje “x” corresponde a distintas diluciones de concentraciones en ng del virus y el eje “y”, corresponde a la fluorescencia.

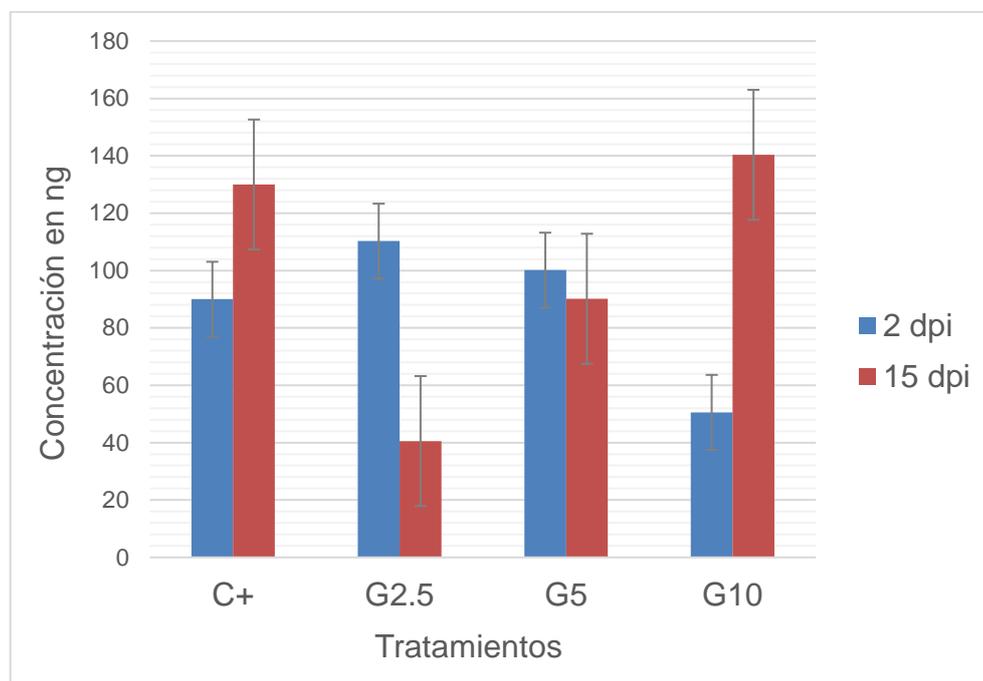
#### 4.5. Efecto del Extracto de Gobernadora en la Concentración Viral.

Los valores de concentraciones de ADNc viral en cada PCR se determinaron a partir de la intensidad de señal obtenida en el gel de agarosa para la banda correspondiente, usando la ecuación lineal generada de la curva estándar.

Los valores de acumulación viral en tejido de hojas jóvenes de las plantas de *N. benthamiana* después la infiltración viral fueron variables y oscilaron entre 50 y 110 ng en el experimento 1; entre 60 y 150 ng en el experimento 2, eso probablemente es debido a un error de estandarización de la cantidad del inóculo inicial en el momento de la agroinfiltración entre las diferentes plantas.

Como se ve en la Figura 10, RhMSinV se multiplicó en todas las plantas inoculadas tras infiltración en la planta (barras azules), sin embargo, la cinética de

multiplicación varió entre los diferentes tratamientos en comparación al control positivo C+.



**Figura 10.** Efecto del extracto de *Larrea tridentata* en la acumulación del virus RhMSinV en *Nicotiana benthamiana*. G2.5, G5 y G10 corresponden a las tres concentraciones evaluadas.

Los valores obtenidos para el control C+ (corresponde a plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el virus sin ningún tratamiento). Los resultados muestran que la concentración del virus en las plantas analizadas con el tiempo, un comportamiento esperado. Mientras G2.5 y G5 mostraron reducción no significativa en el promedio de acumulación viral con el tiempo. Esto puede ser indicación de un efecto de supresión de la multiplicación, por la aplicación del extracto vegetal. En el tratamiento con la concentración más alta G10, esta supresión no se observó, cabe mencionar que a esta concentración hubo síntomas de fitotoxicidad en las hojas de la planta. La mejor reducción se observó con la concentración de 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>.

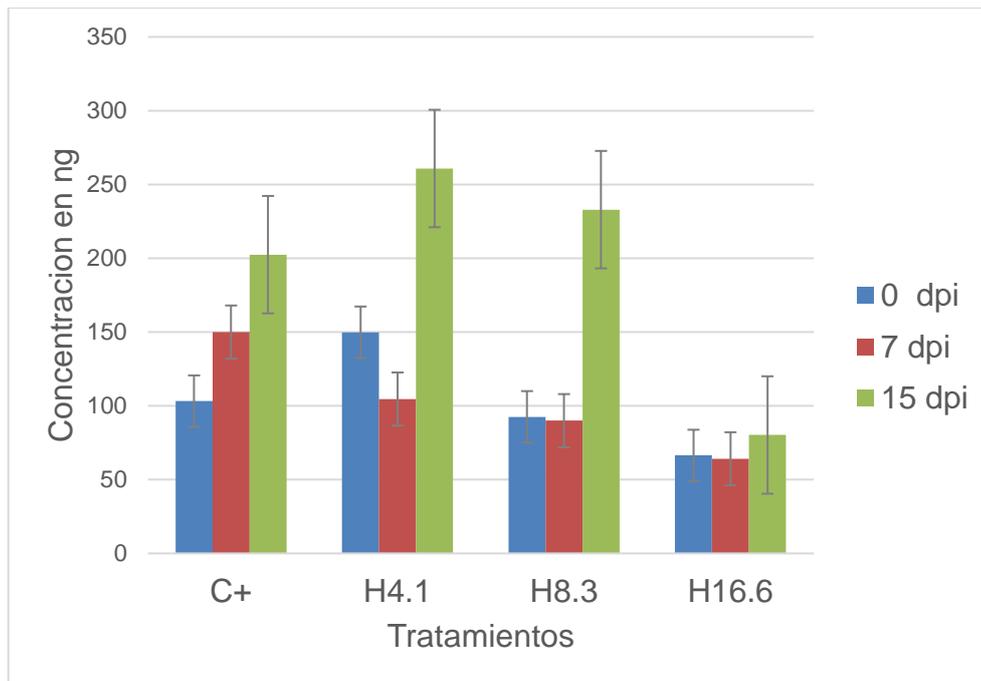
Por otro lado, el efecto supresor en la multiplicación viral consiguió durar al menos hasta los 15 dpi.

La especie *L. tridentata* es considerada una fuente de compuestos con actividad biológica (Pañuelas *et al.*, 2015). Se ha probado, el potencial de su extracto en

inhibiciones del 100% el crecimiento de los siguientes hongos: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* (Delgadillo *et al.*, 2017), *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* (Moreno-Limón *et al.*, 2011), y bacterias: *Staphylococcus aureus* (García *et al.*, 2019) y *Pseudomonas sp.* (Delgadillo *et al.* (2017)). El compuesto esencial del extracto de la gobernadora es el ácido nordihydroguaiaretic (NDGA). Este compuesto y sus derivados tienen inhibición *in vitro* contra varios virus, incluido el VIH, el herpes simple I y II, el papiloma humano (Konigheim *et al.*, 2005) y el virus JÚnin responsable de la enfermedad de la Fiebre Hemorrágica de Argentina (FHA) (Craig *et al.*, 2000), además de otros virus que afectan al ser humano.

#### **4. 6. Efecto del Extracto de Hojasén en la Concentración Viral.**

En la Figura 11, se presentan los valores obtenidos en el experimento 2, tras aplicación del extracto de *F. cernua*. De igual manera, el virus se multiplicó durante 15 días aumentando su concentración de manera progresiva en el tejido de *N. benthamiana* no tratado con el extracto vegetal (tratamiento C+). Sin embargo, en los tres tratamientos H4.1, H8.3 y H16.6 se observa supresión de multiplicación después de una semana de las aplicaciones, antes de recuperarse a 15 dpi. Eso probablemente se debe a que el efecto del extracto no fue continuo con el tiempo. El mejor comportamiento de reducción se observó con la concentración más baja de 5.0 mg·mL<sup>-1</sup>. Cabe mencionar, que las muestras no mostraron síntomas de toxicidad en ninguna de las concentraciones usadas, la fuerte supresión observada en el tercer tratamiento no está bien clara, podemos relacionarla a la concentración alta usada de *F. cernua* como a la baja concentración inicial del inoculo.



**Figura 111.** Efecto del extracto de *Flourensia cernua* en la acumulación del virus RhMSinV en *Nicotiana benthamiana*. H4.1, H8.3 y H16.6 corresponden a las tres concentraciones.

Igual que la gobernadora el hojasén se ha descrito como antifúngica, esta capaz de inhibir el desarrollo de *Phytophthora capsici*, *Botrytis* sp., *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus* sp. (Gamboa *et al.*, 2003), su resina consiste en flavonoides, p-acetofenonas, acetilenos, benzopiranos y benzofuranos (Rodríguez-Guadarrama *et al.*, 2018). Varios flavonoides, tienen efecto anti-fitoviral, como quercetagina 3´metileter extraído de *Centaurea rupestris* que inactiva la multiplicación del virus TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) y suprime la expresión de síntomas (Rusak *et al.*, 1997). El efecto anti-fitoviral se confirmó también con seis flavonoides aislados de *Cassia fistula*, que mostraron reducción entre 28.5% y 31.3% en la multiplicación del virus TMV (*Tabacco mosaic virus*) en *Nicotiana benthamiana* (Zhao *et al.*, 2013). El Hojasén además de flavonoides es una fuente importante del antioxidante: ácido eláxico (Aguilar-Carbo *et al.*, 2008).

En el reino vegetal, muchas plantas tienen componentes activos antiviral, descritos por varios autores. Zhao *et al.* (2017) en su revisión, citan varias especies y muestra que sus componentes incluyen proteínas, polisacáridos y moléculas pequeñas como alcaloides, flavonoides, fenoles y aceites esenciales. En este trabajo se

observó en estudio preliminar, que el hidroalcohólico de *L. tridentata* y acuoso de *F. cernua* tienen efecto anti fitoviral, sobre el virus RHMSinV (Rhynchosia mosaic sinaloa virus) en plantas de *N. benthamiana*. Las concentraciones no llegaron a inhibir la multiplicación viral, sin embargo, afectó y/o retrasó la desimación en la planta. Por lo cual, es muy importante realizar estudios adicionales, para aislar el agente responsable de esta reducción en cada extracto, determinar la concentración óptima, y la duración de la efectividad de los extractos en tiempo. Eso ayudaría a estandarizar un protocolo de aplicación efectivo que permitiera controlar el virus RHMSinV en los cultivos afectados.

## V. CONCLUSIÓN

Los extractos utilizados de *L. tridentata* y *F. cernua* son capaces de reducir la concentración del virus RHMSinV (Rhynchosia mosaic sinaloa virus) en *N. benthamiana*.

El efecto del extracto de *L. tridentata* sobre el virus es más efectivo que el de *F. cernua* al controlar el virus hasta por 15 días.

## VI. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Carbo A. F., Augur C., Prado-Barragan L. A., Aguilar C. N., Favela-Torres E. 2008. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chemical Papers*,62(4): 440–444.
- Aguirre-Joya J. A., Pastrana-Castro L., Nieto-Oropeza D., Ventura-Sobrevilla J., Rojas-Molina R., Aguilar C. N. 2018. The physicochemical, antifungal and antioxidant properties of a mixed polyphenol based bioactive film. *Heliyon* 4: e00942.
- Alba-Aguayo, David & Rueda, Angelica. 2013. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Revista de Educación Bioquímica*. 32. 36-39.)
- Alejos-Velázquez L., Aragón-Martínez, M. y Cornejo-Romero, A., 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1ª ed. México DF, pp.1-2.
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98 (3): 231-239. doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.002.
- Asensio I., Centeno M. L. 2016. “Magnificación” ¿una solución a la producción de anticuerpos recombinantes en situaciones de epidemia/pandemia? *AmbioCiencias*, 14: 19-39. Revista de divulgación científica editada por la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942.
- Ashok K., J., Rekha T., Shyamala D., S., Kannan M., Jaswanth A., Gopal V. 2010. Insecticidal Activity of Ethanolic Extract of Leaves of *Annona squamosa*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(5): 177-180.

- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, JG, Hellens, R., Waterhouse, PM. 2018. *La subida y la subida de Nicotiana benthamiana: una planta para todas las razones. Revisión anual de fitopatología, 56 (1), 405–426.* doi: 10.1146 / annurev-phyto-080417-050141)
- Bisaro D. M. 1996. Geminivirus DNA replication. Pp:833- 854. DNA Replication in Eucaryotic Cells. Vol. 31. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1058p.
- Bishop C. D. 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaluca alternifolia* (Maiden & Betche) cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. Journal Essential Oil Research, 7:641–644. doi: 10.1080/10412905.1995.9700519.
- Biswas D., Nandy S., Mukherjee A., Pandey D. K., Dey A. 2019. *Moringa oleifera* Lam. and derived phytochemicals as promising antiviral agents: A review, South African Journal of Botany. doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.049.
- Bitchagno G. T., Sama Fonkeng L., Kopa T. K., Tala M. F., Kamdem Wabo H., Tume C. B., Tane B., Kuate, J. R. 2015. Antibacterial activity of ethanolic extract and compounds from fruits of *Tectona grandis* (Verbenaceae). BMC complementary and alternative medicine, 15:265. doi:10.1186/s12906-015-0790-5.
- Bombarely A., Rosli H. G., Vrebalov J., Moffett P., Mueller L. A., Martin G. B. 2012. A Draft Genome Sequence of *Nicotiana benthamiana* to Enhance Molecular Plant-Microbe Biology Research. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25(12):1523–1530. doi:10.1094/mpmi-06-12-0148-ta.
- Brinker F. 1993. *Larrea tridentata* (D. C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). British Journal of Phytotherapy, 3: 10-30.
- Brown J. K., Fauquet C. M., Briddon R. W., Zerbini F. M., Moriones E., Navas-Castillo J. 2012. Family Geminiviridae. In: King AMQ; Adams M. J.; Carstens

E. B.; Lefkowitz E. J. (eds). Virus Taxonomy. 9<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK. Elsevier Academic Press. 1327p.

Brown Judith & Czosnek Henryk. 2002. Whitefly transmitted viruses. *Advances in Botanical Research*. 65-100.

Castillo-Reyes F., Hernández-Castillo F. D., Clemente-Constantino J. A., Gallegos-Morales G., Rodríguez-Herrera R., and Aguilar C. N. 2015. *In vitro* antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *African journal of agricultural research*, 10: 4554–4560.

Celis Á., Mendoza C., Pachón M., Cardona J., Delgado W., & Cuca, L. E. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97-106.

Craig, J., Callahan M., Huang R., Chih & De Lucia A. 2000. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral research*. 47. 19-28. 10.1016/S0166-3542(00)00089-9.

Delgadillo R., L., Bañuelos V., R., Delgadillo R., O., Silva V., M., Gallegos F., P. 2017. Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova scientia*, 9(19): 273-290. doi.org/10.21640/ns.v9i19.1019.

Deying M., Gorman K., Devine G., Luo W., Denholm I. 2006. The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Northwestern China. *Crop Protection*, 26(4):612-617.

- Díaz de la G., R. 2014. Agro-infiltración (expresión transitoria por transformación de *Agrobacterium*). 2020, de CIBIOGEN Sitio web: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogen/index.php/seminarios-en-bioseguridad-y-biotecnologia-de-ogms/agroinfiltracion>.
- Dunkić V., Bezić N., Vuko E., Cukrov D. 2010. Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L. ssp. *variegata* (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. *Molecules*, 15: 6713–6721. doi:10.3390/molecules15106713.
- Ebenezer k., Manivannan R., Punniamoorthy A., & Tamilselvan C. 2019. Plant Secondary Metabolites of Antiviral Properties a Rich Medicinal Source for Drug Discovery: A Mini Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(5): 161-167. doi.org/10.22270/jddt.v9i5.3471.
- Fahraeus, G. 1957. The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *Microbiology*, 16(2): 374–381. doi:10.1099/00221287-16-2-374.
- Fondong V. N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology*, 14(6), 635–649. doi.org/10.1111/mpp.12032
- Gafni Y., Epel B. L. 2002. The role of host and viral proteins in intraand inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60:231-241.
- Gamboa A., R., Hernández C., F. D., Guerrero R., E., Sánchez A., A., Lira S., R. H. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (de Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojaseñ (*Flourensia cernua* D.C.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1):13-18.
- García L., C., Alonso R., S. E., Rodríguez M., R., Martínez R., A., Ramírez B., P., Moreno R., A., 2019. Susceptibilidad *in vitro* de una Cepa de *Staphylococcus*

*aureus* Resistente a Diferentes Extractos Vegetales. Revista Agraria -Nueva Época, 6: 1- 3.

Gnabre J., Bates R., Huang R. C. 2015. Lignanos de arbusto de creosota para el tratamiento y prevención de enfermedades humanas: Perspectivas sobre la terapia combinada. Revista de medicina tradicional y complementaria, 5(3):119-126. doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.024.

Grainge M., Ahmed S. 1988. Handbook of plant with pest-control properties. John Wiley and sons, Nueva York. 470 p.

Grauso, L., Emrick, S., Falco, B., de Lanzotti, V., Bonanomi, G. 2019. Common dandelion: a review of its botanical, phytochemical and pharmacological profiles. Phytochemistry Reviews, 18(4): 1115. doi.org/10.1007/s11101-019-09622-2.

Gregorio-Jorge J., Bernal-Alcocer A., Bañuelos-Hernández B., Alpuche-Solís A. G., Hernández-Zepeda C., Moreno-Valenzuela O., Frías-Treviño G., Argüello-Astorga G. R. 2010. Analysis of a new strain of Euphorbia mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. Virology Journal, 19:7:275. doi:10.1186/1743-422X-7-275

Gutiérrez, C., Ramírez-Parra, E., Mar Castellano, M., Sanz-Burgos, AP, Luque, A., y Missich, R. 2004. Geminivirus de replicación de ADN e interacciones del ciclo celular. Veterinary Microbiology, 98 (2), 111-119. doi: 10.1016 / j.vetmic.2003.10.012

Hanan Alipi A.M & Mondragón Pichardo J. 2009. Zygothylaceae. 2020, de Malezas de México Sitio web: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygothylaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>

Hanley B. L., Settlege S., Oroaco B. M., Nagar S., Robertson D. 2000. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle

regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 18:71-106.

Hernández D., Lira-Saldivar R., Hernández-Suárez M. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 211-216.

Hernández-Espinal, L.A., Enríquez Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C.M., Retes-Manjarrez, J., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P., & Garzón-Tiznado, J. 2018. Phylogenetic analysis and distribution of Begomovirus in pepper (*Capsicum annuum* L.) crop in Sinaloa, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 41. 149-157

Jasso de Rodríguez D., Salas-Méndez E. D. J., Rodríguez-García R., Hernández-Castillo F. D., Díaz-Jiménez M. L. V., Sáenz-Galindo A., González-Morales S., Flores-López M. L., Villarreal-Quintanilla J. A., Peña-Ramos F. M., Carrillo-Lomelí D. A. 2017. Antifungal activity *in vitro* of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial Crops and Products*, 107: 499-508. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054.

Jerković-Mujkić A., Mahmutović I., & Bešta-Gajević R. 2013. Antiphytoviral effects of three different essential oils on Tobacco mosaic virus. *Works of the Faculty of Forestry, University of Sarajevo*, 2:.41-51.

Jeyalakshmi C., Dinakaran D., Rettinassababady C. 2015. Botanical Pesticides: the novel chemotherapeutics for managing plant virus p.114-130. *In: Sustainable Crop Disease Management using Natural Products*. editado por Sangeetha Ganesan, Kurucheve Vadivel, Jayaraj Jayaraman. CABI, Boston, 16 nov. 2015-424 p.

Karlin M.S. 2013. *Desiertos y climas Historias de civilización y barbarie*. Cerro Chico: MSK: 1 ed

- Kelly L.J, Leitch A.R, Clarkson J.J, Knapp S, Chase M.W. 2013. Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid tobaccos (*Nicotiana* section *suaveolentes*). *Evolution* 67:80–94
- Khan Academy, accedido 09.08.2020, [www.khanacademy.org](http://www.khanacademy.org)
- Kobeasy M. I., El-Shazly M. A., Rashed M. M., Yousef R. S. 2013. Antiviral action of Lavender (*Lavendular vera*) essential oil against tomato spotted wilt virus infected tomato plant. *Journal of Chemica Acta*, 2:53-60.
- Kostoff D. 1940. Relation degrees and phylesis of certain *Nicotiana* species determined by cytogenetic analysis. *Genetica* 22:215–30.
- Konigheim B. S., Goleniowski M. E., Contigiani M. S. 2005. Cytotoxicity and Antiviral Activity of a Lignan Extracted from *Larrea divaricate*. *Drug Design Reviews*, 2: 81-83. doi:org/10.2174/1567269053390194.
- Lazarowitz S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Plant Diseases* 11:327-349.
- Li Y., Liu Y., Ma A., Bao Y., Wang M., Sun Z. 2017. *In vitro* antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant activities of the ethanol extract of *Mentha piperita* L. *Food science and biotechnology*, 26(6):1675–1683. doi:10.1007/s10068-017-0217-9.
- Lira Saldívar R. H. 2003. Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2):214-222.
- Lira-Saldivar R., Cruz J., Beltrán F., Jiménez F. 2004. Effect of Biofumigation with Solarization and *Larrea tridentata* Extract on Soil-Borne Pathogens of Pepper Plants. *Biological Agriculture & Horticulture - BIOL AGRIC HORTIC*, 22:21-29. doi: 10.1080/01448765.2004.9754985.

- Lozano G, Trenado HP, Fiallo-Olivé E, Chirinos D, Geraud-Pouey F, Briddon RW, Navas-Castillo J. 2016. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus Begomovirus, Geminiviridae) – definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. *Frontiers in Microbiology* 7: 162.
- Melgarejo, T. A., Kon, T., Rojas, M. R., Paz-Carrasco, L., Zerbini, F. M., & Gilbertson, R. L. 2013. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Journal of virology*, 87(10), 5397–5413. doi.org/10.1128/JVI.00234-13
- Mendez M., Rodríguez R., Ruiz J., Morales D., Adame C. F., Hernández-Castillo F. D., Aguilar C. N. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37:445-450, doi :10.1016/j.indcrop.2011.07.017.
- Michaelakis A., Theotokatos S.A., Koliopoulos G., Chorianopoulos N. G. 2007. Essential oils of *Satureja* species: insecticidal effect on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Molecules*, 12 (12), 2567-2578.
- Morales, F., Anderson, P. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*. 146:415–441 doi.org/10.1007/s007050170153.
- Morales F. 2006. History and Current Distribution of Begomoviruses in Latin America. *Advances in virus research*. 67. 127-62. 10.1016/S0065-3527(06)67004-8.
- Moreno-Limón S., González-Solís L. N., Salcedo-Martínez S. M., Cárdenas-Ávila M. L., Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32:193-205.

- Nava-Pérez E., García-Gutiérrez C., Camacho-Báez J. R., Vázquez-Montoya, E. L. 2012. BIOPLAGUICIDAS: Una Opción para el Control Biológico de Plagas. *Ra Ximhai*, 8(3b):17-29
- Peñuelas-Rubio O., Arellano-Gil M., Vargas-Arispuro I. C., Lares-Villa F., Cantú-Soto E. U., Hernández-Rodríguez S. E., Gutiérrez-Coronado M. A., Mungarro-Ibarra C. 2015. Bioactividad *in vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Polibotánica*, 40: 183-198.
- Peñuelas-Rubio O., Arellano-Gil M., Verdugo-Fuentes A. A., Chaparro-Encinas L. A., Hernández-Rodríguez S. E., Martínez-Carrillo J. L., Vargas-Arispuro I. C. 2017. *Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum* radialis-lycopersici in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-3.
- Philogenet B., Regnault-Roger C., Vincent C. 2004. Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. *In*: Regnault-Roger, C.; Philogenet, B., Vincent, C. (Ed). *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, pp 1-18.
- Polston J. E., Anderson P. L. 1997. The emergence of whitefly transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis*, 81:1358-1369.
- Qijian C., Ming'an O., Zujian W., Lianhui X., Qiying L. 2010. Anti-TMV Active Substances from *Coreopsis drummondii*: Anti-TMV Active Substances from *Coreopsis drummondii*. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2009 (5): 621-625. 10.3724/SP.J.1145.2009.00621.
- Rahman S., Ansari R. A., Rehman H., Parvez S., Raisuddin S. 2011. Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative

Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 734785. doi.org/10.1093/ecam/nep076.

Ramesh S. V., Sahu P. P., Prasad M., Praveen S., Pappu H. R. 2017. Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race. *Viruses*, 9(9): 256. doi.org/10.3390/v9090256.

Reveles-Torres L.R., Mena-Covarrubias, J., Salas-Muñoz, S., Martínez-Fernández M. y Mauricio-Castillo J.A. 2019. Diagnóstico e identificación de begomovirus en el cultivo de chile en los estados de Zacatecas y Durango. Folleto Técnico Núm 101. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 32 páginas

Rioja-Soto T.C. 2020. Los metabolitos secundarios de las plantas y potencial uso en el manejo de plagas agrícolas en agroecosistemas desérticos. *Idesia (Arica)*, 38(1), 3-5. doi.org/10.4067/S0718-34292020000100003).

Rios M. Y. 2015. Chemistry and biology of the genus *Flourensia* (Asteraceae) *Chem. Biodivers.*, 12(11):1595-1634. doi:10.1002/cbdv.201400220.

Rodríguez-Guadarrama A. H., Guevara-González R. G., De Jesús R. S., Feregrino-Pérez A. A. 2018. "Antifungal activity of Mexican endemic plants on agricultural phytopathogens: a review, 1-11. doi: 10.1109/CONIIN.2018.8489793.

Rodríguez-Negrete EA, Morales-Aguilar JJ, Domínguez-Duran G., Torres-Devora G., Camacho-Beltrán E., Leyva-López NE, Méndez-Lozano J. 2019. La secuenciación de alto rendimiento revela la diversidad diferencial de especies de begomovirus en plantas no cultivadas en el Pacífico norte de México. *Virus*, 11 (7), 594. doi: 10.3390 / v11070594

- Rodríguez- Tarduchy G. 2014. Cuantificación de ácidos nucleicos . 2020, servicio de genomica del IIBm (SQP) Sitio web: <https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/CUANTIFICACION+DE+%C3%81CIDOS+NUCLEICOS+V2.pdf/04333940-c6ff-4419-ad85-cfd1e04dbca8>
- Rojas M. R., Hagen C., Lucas W. J., Gilbertson R. L. 2005. Annual Review of Phytopathology, 43(1): 361-394.
- Rusak G., Krajacić M., Pleše N. 1997. Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagenin flavonoid isolated from *Centaurea rupestris* L. Antiviral Research, 36(2):125-129. DOI: 10.1016/s0166-3542(97)00045-4.
- Salazar R., Pozos M.E., Cordero P., Perez J., Salinas M. C. Waksman N. 2018. Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. Pharm. Biol, 46: 166-170.doi:10.1080/13880200701498952.
- Sambrook J., Russell R. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N. Y.
- Sarukhán J., 2017. Capital natural de México. Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Sreelakshmi Y., Gupta S., Bodanapu R., Chauhan V., Hanjabam M., Thomas S., Mohan V., Sharma S., Srinivasan R., & Sharma, R. 2010. NEATTILL: A simplified procedure for nucleic acid extraction from arrayed tissue for TILLING and other high-throughput reverse genetic applications. Plant methods. 6. 3. 10.1186/1746-4811-6-3.

- Trejo-Márquez M. A., Vargas-Martínez M.G., Sánchez-Soto A., Lira Vargas A., Pascual-Bustamante S., Granados López G., y Villavicencio González A. G. 2015. Extracción de Compuestos Bioactivos de Plantas del Desierto Mexicano para su Aplicación en Envases Activos para Zorzamora. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16 (1), 101-107.
- Valero Martínez M.C. 2016. Optimización de la Técnica de Agroinfiltración para la producción de proteínas en *Nicotiana benthamiana*. <http://hdl.handle.net/10251/60877>
- Van Dijk P, Van Der Meer FA, Piron PGM. 1987. Accessions of Australian *Nicotiana* species suitable as indicator hosts in the diagnosis of plant virus diseases. *Neth. J. Plant Pathol.* 93:73–85
- Wang X. Y., Zhang C. W., Huang W. T., Yue J., Dou J. J., Wang L. Y., Wang Q., Cheng Y. Q. 2020. Crude garlic extract significantly inhibits replication of grapevine viruses. *Plant Pathology*, 69: 149–158.
- Yazdi E., Mulabisana S., Prinsloo J., Cloete G., Kritzinger M., Q. 2018. Plants containing cardiac glycosides showing antiphytoviral activity against Potato virus Y (PVYNTN) on tobacco plants. *Journal of Plant Protection Research*, 58(4): 397-403. [doi.org/10.24425/jppr.2018.124648](https://doi.org/10.24425/jppr.2018.124648).
- Zerbini F. M., Briddon R. W., Idris A., Martin D. P., Moriones E., Navas-Castillo J., Rivera-Bustamante R., Roumagnac P., Varsani A. e ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Perfil: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98: 131-133.
- Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 13: 20.
- Zhao L., Feng C., Wu K., Chen W., Chen Y., Hao X., Wu Y. 2017. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. *Pesticide*

Biochemistry and Physiology, 135: 15–26. doi:  
10.1016/j.pestbp.2016.07.003.

Zhao W., Zeng X., Zhang T., Wang L., Yang G., Chen Y. K., Miao M. 2013. Flavonoids from the bark and stems of *Cassia fistula* and their anti-tobacco mosaic virus activities. *Phytochemistry Letters*, 6(2): 179–182. doi: 10.1016/j.phytol.2012.12.006.

Zhou XP. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual Review of Phytopathology* 51: 357–381