



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Caracterización molecular del RNA largo no  
codificante del virus PMeV-Mx mediante el  
desarrollo de una clona infectiva.**

Tesis que presenta

**ALETHIA FERNANDA TORIZ BRAVO**

En opción al título de

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Bioquímica y Biología Molecular

Mérida, Yucatán, México

2022

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*

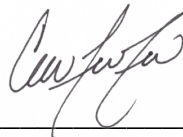
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alethia Fernanda Toriz Bravo** titulado “**Caracterización molecular del RNA largo no codificante del virus PMeV-Mx mediante el desarrollo de una clona infectiva**”, fue realizado en la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, Laboratorio 10, del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. Luisa A. López Ochoa**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



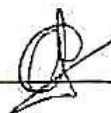
---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 6 de julio de 2022.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Alethia Fernanda Toriz Bravo.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Diseción molecular de los componentes genómicos de PMeV-Mx, un virus similar a umbravirus asociado a meleira de la papaya en México” con clave A1-S-19850, bajo la dirección de la Dra. Luisa A. López Ochoa

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al CONACYT por la beca otorgada 1063761 y por el financiamiento para el proyecto titulado “Disección molecular de los componentes genómicos de PMeV-Mx, un virus similar a umbravirus asociado a meaira de la papaya en México” con clave A1-S-19850, bajo la dirección de la Dra. Luisa A. López Ochoa.*

*A la Dra. Luisa López Ochoa asesora y directora de tesis por su guía y enseñanzas durante la maestría.*

*A los Dres. Stuart Macfarland y Edgard Maiss por el acceso al plásmido pDIVA indispensable para la construcción de la clona infectiva PMeV-Mx.*

*Sergio García Laynes y al Dr. Santy Peraza Echeverría por la clona pCAMBIA2200::GFP y el protocolo de agroinfiltración.*

*A los doctores que conforman mi comité tutorial y revisor:*

*Dra. Virginia A. Herrera Valencia.*

*Dra. Laura Conde Ferráez.*

*Dra. Luisa A. López Ochoa.*

*Dr. Hernán Villanueva Alonzo.*

*Dr. Jorge H. Ramírez Prado.*

*Por sus oportunos y enriquecedores comentarios, imprescindibles para el desarrollo de esta tesis.*

*Agradezco a:*

*MC. Roberto Ku y a la MC. Mildred Carrillo por el apoyo técnico brindado.*

*A mis compañeras y amigas de laboratorio L10.*

## DEDICATORIAS

*A mi familia.*

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	4
ANTECEDENTES .....	4
1.1    Importancia del cultivo de la papaya .....	4
1.2    Virus de la meleira de la papaya (PMeV) .....	6
1.3 <i>Umbravirus</i> .....	7
1.3.1    Similitud con otros taxones .....	8
1.3.2    Criterios de demarcación de especies en el género.....	9
1.4    Virus similares a <i>Umbravirus</i> .....	10
1.4.1    Virus similares a <i>Umbravirus</i> de la papaya .....	11
1.4.2    Virus de la meleira de la papaya variante mexicana (PMeV-Mx) .....	13
1.5    RNA largo no codificante (lncRNA). .....	14
1.5.1    RNA largo no codificante viral.....	14
1.6    Estructura secundaria del RNA .....	17
1.6.1    Estructuras secundarias de los lncRNA.....	18
1.7    Clones infecciosos de cDNA de virus de plantas.....	19
1.7.1    Métodos avanzados para el ensamblaje de clones infecciosos binarios .....	20
1.7.2    Método de ensamblaje de Gibson (GA).....	23
1.8    Inoculación de plantas con virus de mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
JUSTIFICACIÓN .....	26
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	28
CAPITULO II.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29

2.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx.....	29
2.1.2. Síntesis de la secuencia de longitud completa de PMeV-Mx.....	29
2.1.3. Vector pGEM®-T-Easy .....	30
2.1.4. Transformación de pGEM-T Easy::PMeV-Mx .....	31
2.1.5. Verificación de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx .....	31
2.1.6. Vector pDIVA.....	32
2.1.7. Verificación del vector pDIVA .....	33
2.1.8. Subclonación de PMeV-Mx en el vector pDIVA (GA).....	33
2.1.9. Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA) .....	33
2.1.10. Purificación de los amplicones.....	34
2.1.11. Ensamblaje de la clona infectiva (GA) .....	34
2.1.12. Ensayos de digestión con enzimas restricción.....	35
2.1.13. Verificación de la clona infectiva por PCR .....	35
2.1.14. Verificación de la clona infectiva por secuenciación de Sanger .....	35
2.1.15. Transfección de las clonas infectivas a <i>A. tumefaciens</i> .....	36
2.1.16. Establecimiento de la agroinfiltración.....	36
2.2. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL RNA LARGO NO CODIFICANTE DE PMeV-Mx.....	38
2.2.1. Secuencia y estructura secundaria 3'OH de PMeV-Mx.....	38
2.2.2. Análisis de la estructura secundaria del RNA largo no codificante de PMeV-Mx	38
2.2.3. Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx.....	38
2.3. DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL lncRNA .....	39
2.3.1. Estrategia para el diseño de cebadores para el Ensamble Gibson .....	39
2.3.2. Verificación de las mutantes .....	41
2.3.3. Transfección de la Mutante 1 a <i>A. tumefaciens</i> .....	41
2.4. MATERIAL VEGETAL.....	41
2.4.1. Germinación .....	42



CAPITULO III.....	43
RESULTADOS.....	43
3.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx.....	43
3.1.1.  Secuencia de longitud completa de PMeV-Mx.....	43
3.1.1.  Vector pDIVA.....	44
3.1.2.  Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA) .....	45
3.1.2.  Ensamble de clona infectiva (GA).....	46
3.2.    Verificación de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx.....	52
3.2.1.  Verificación de digestión con enzimas de restricción .....	52
3.2.2.  Cebadores para la verificación por PCR .....	54
3.2.3.  Verificación por PCR de colonia .....	55
3.2.4.  Verificación por PCR de DNA plasmídico .....	55
3.3.    Secuenciación de las clonas infectivas. ....	57
3.3.1.  Clona 1.....	57
3.3.2.  Clona 2.....	74
3.4.    Transfección directa a <i>A. tumefaciens</i> .....	77
3.5.    ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL lncRNA DE PMeV-Mx.....	78
3.5.1.  Análisis de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx .....	78
3.5.2.  Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx.....	82
3.5.3.  Análisis del extremo 3' OH de PMeV-Mx .....	83
3.6.    DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL lncRNA .....	86
3.6.1.  Diseño de cebadores para las mutantes del lncRNA .....	88
3.7.    Construcción de la Mutante 1 .....	89
3.7.1.  Verificación de la construcción de la Mutante 1 .....	91
3.8.    MATERIAL VEGETAL.....	92
CAPITULO IV. ....	97
DISCUSIÓN .....	97

CAPITULO V. ....	97
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	103
CONCLUSIONES.....	103
PERSPECTIVAS.....	104
BIBLIOGRAFÍA .....	105
ANEXO. 112	

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Virus de la papaya, en las principales regiones productoras del mundo. ....	5
<b>Tabla 2</b> RNA largos no codificantes que imparten resistencia a las respuestas inmunitarias antivirales. ....	15
<b>Tabla 3</b> RNA largos no codificantes codificados por virus y sus funciones. ....	16
<b>Tabla 4</b> Métodos de clonación adecuados para el ensamblaje de clones infecciosos .....	22
<b>Tabla 5</b> Cebadores para el ensamble de Gibson.....	45
<b>Tabla 6</b> Cebadores para la verificación del ensamble de la clona infectiva pCBL224.....	54
<b>Tabla 7</b> Virus cercanos a PMeV-Mx analizados.....	82
<b>Tabla 8</b> Cebadores para las mutantes lncRNA de PMeV-Mx.....	88

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Organización genómica del Virus de la roseta del maní (GRV) .....	8
<b>Figura 2</b> Relaciones filogenéticas de las RdRPs de Umbravirus y algunos otros virus de plantas .....	9
<b>Figura 3</b> Organización genómica de virus similares a Umbravirus. ....	12
<b>Figura 4</b> Representación esquemática de la organización genómica de PMeV-Mx.....	13
<b>Figura 5</b> Funciones reguladoras de los lncRNA en los ciclos replicativos virales .....	15
<b>Figura 6</b> Estructuras secundarias del RNA.....	18
<b>Figura 7</b> Flujo de trabajo para el ensamblaje de clones infecciosos de virus de plantas .....	21
<b>Figura 8</b> Diagrama de la estrategia experimental. ....	28
<b>Figura 9</b> Mapa de pGem®-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) .....	29
<b>Figura 10</b> Mapa genético de vector pGEM®-T Easy .....	30
<b>Figura 11</b> Mapa genético del vector pDIVA .....	32
<b>Figura 12</b> Cassette de expresión del vector binario pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224) .....	33
<b>Figura 13</b> Mapa genético del vector pCAMBIA2200 .....	37
<b>Figura 14</b> Cassette de expresión GFP .....	37
<b>Figura 15</b> Esquema para el diseño de cebadores para estrategia de ensamble de Gibson ....	40
<b>Figura 16</b> Análisis <i>in silico</i> de enzimas de restricción de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx.....	43
<b>Figura 17</b> Digestión de pGEM-T Easy::PMeV-Mx .....	44
<b>Figura 18</b> Vector pDIVA, indicando el sitio único de corte <i>Xba I</i> .....	44
<b>Figura 19</b> Digestión de pDIVA.....	45
<b>Figura 20</b> Posición de los cebadores para la amplificación del vector pDIVA y PMeV-Mx.....	46
<b>Figura 21</b> Amplicones para el ensamble de Gibson .....	47
<b>Figura 22</b> Diagrama del ensamble de la clona infectiva mediante método de Gibson .....	48
<b>Figura 23</b> Mapa genético de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx.....	49
<b>Figura 24</b> Resultado del ensamble <i>in vitro</i> de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx.....	50
<b>Figura 25</b> ADN plasmídico sin digerir de dos colonias de la clona infectiva pCBL224.....	52
<b>Figura 26</b> Análisis <i>in silico</i> de digestión de la clona infectiva con <i>Sal I</i> .....	53
<b>Figura 27</b> Digestión con enzimas de restricción .....	53
<b>Figura 28</b> Posición y tamaño de amplificación de los cebadores CB172/CB173 y CB21/CB187.....	54
<b>Figura 29</b> Verificación de las clonas por PCR de colonia .....	55
<b>Figura 30</b> Verificación de las clonas por PCR de ADN plasmídico .....	56

<b>Figura 31</b> Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 1 con el cebador CB21. ....	58
<b>Figura 32</b> Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona1 con el cebador CB187. ....	73
<b>Figura 33</b> Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 2 con el cebador CB21. ....	75
<b>Figura 34</b> Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 2 con el cebador CB97. ....	76
<b>Figura 35</b> Verificación de la colonia 3, de <i>A. tumefaciens</i> por PCR.....	77
<b>Figura 36</b> Esquema de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx .....	79
<b>Figura 37</b> Gráfico circular. Anotación de gráfico p-num.....	79
<b>Figura 38</b> Estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx .....	80
<b>Figura 39</b> Mutación de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx.....	81
<b>Figura 40</b> Gráfico circular de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx. ....	81
<b>Figura 41</b> Alineamiento múltiple de los lncRNA de virus similares a <i>Umbravirus</i> cercanos a PMeV-Mx.....	82
<b>Figura 42</b> Estructuras secundarias predichas de la secuencia que abarca la región conservada rica en purinas del lncRNA de PMeV-Mx y virus similares a <i>Umbravirus</i> .....	83
<b>Figura 43</b> Comparación de las características terminales 3 ' OH entre PMeV-Mx y virus cercanos. ....	86
<b>Figura 44</b> Esquema para el ensamble de las mutantes del lncRNA de PMeV-Mx.....	87
<b>Figura 45</b> Amplicones para generar la Mutante 1 .....	89
<b>Figura 46</b> Ensamble de Gibson de la Mutante 1.....	90
<b>Figura 47</b> Ensayo de digestión de la Mutante 1.....	91
<b>Figura 48</b> Verificación por PCR de la Mutante 1.....	92
<b>Figura 49</b> Tratamiento pregerminativo de semillas.....	93
<b>Figura 50</b> Plantas de <i>N. benthamiana</i> . ....	93
<b>Figura 51</b> Plantas de <i>C. papaya</i> . ....	93
<b>Figura 52</b> Material vegetal.....	94
<b>Figura 53</b> Agroinfiltración de plantas .....	95
<b>Figura 54</b> Tejido hojas de <i>N. benthamiana</i> de 5 semanas de edad, agroinfiltración .....	95
<b>Figura 55</b> Tejido hojas de <i>C. papaya</i> de 5 semanas de edad, agroinfiltración .....	96

## ABREVIATURAS

ASGV	Apple stem grooving virus- Virus del ranurado del tallo de la manzana.
BabVQ	Babaco virus Q- Virus Q del babaco.
BNYVV	Beet necrotic yellow vein virus- Virus de la vena amarilla necrótica de remolacha.
BRMV	Bean rugose mosaic virus- Virus del mosaico rugoso del frijol.
BSBMV	Beet soil-borne mosaic virus- Virus del mosaico de la remolacha transmitido por el suelo.
cDNA	DNA complementario.
CMoMV	Carrot mottle mimic virus- Virus imitador del moteado de la zanahoria.
CMoV	Carrot mottle virus- Virus del moteado de la zanahoria.
CP	Cápside.
CRLVRNAA	Carrot red leaf virus associated RNA- RNA asociado al virus de la hoja roja de la zanahoria.
CYVaV	Citrus yellow-vein associated virus- Virus asociado a las venas amarillas de los cítricos.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
GA	Gibson assembly- Ensamble de Gibson.
GRV	Groundnut rosette virus- Virus de la roseta de maní.
LMV	Lettuce mosaic virus- Virus del mosaico de la lechuga.
lncRNA	RNA largo no codificante.
MABYV	Melon aphid-borne yellows virus- Virus del amarilleo transmitido por el pulgón del melón.
PMeV-Mx	Virus mexicano de la meleira de la papaya.

RNA	Ácido ribonucleico.
RNAds	RNA bicatenario.
RNAm	RNA mensajero.
RNAmi	Micro RNA.
RNAss	RNA monocatenario.
RNA <sub>sn</sub>	RNA pequeño nuclear.
RNA <sub>ss</sub>	RNA monocatenario de sentido positivo.
SMV	Soybean mosaic virus- Virus del mosaico del frijol.
StrVA	Strawberry virus A- Virus de la fresa A.
TCV	Turnip crinkle virus- Virus de la arruga del nabo.

### RESUMEN

PMeV-Mx es un virus nuevo similar a *Umbravirus* asociado a la meleira de la papaya en México, esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas en el cultivo de papaya. El virus tiene un genoma de RNA de cadena sencilla, de 4.3 Kb, codifica para dos marcos de lectura abiertos y tiene un RNA largo no codificante (lncRNA). Al igual que los umbravirus, no codifica una proteína de la cápside, por lo que no es posible purificar partículas virales para confirmar la etiología de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es determinar si el genoma viral es necesario y suficiente para producir la enfermedad, así como caracterizar la secuencia del lncRNA. En este proyecto se desarrolló una clona infectiva de PMeV-Mx por el método de ensamble de Gibson, la cual se encuentra bajo el control del promotor CaMV 35S y de una Ribozima viral para el control de la expresión del RNA viral en plantas mediante agroinfiltración. Los resultados de este estudio son el primer acercamiento a la caracterización de la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx, donde se identificaron regiones putativamente involucradas en la replicación del virus, para las cuales se realizó el diseño de mutantes sitio dirigidas y se culminó con la construcción de una mutante ensamblada por el método de Gibson. Lo anterior permitirá, en un futuro cercano, la caracterización *in vivo* de estas regiones mediante el análisis de su expresión en plantas. Complementariamente, la construcción de una clona infectiva del Virus asociado a la meleira de la papaya en México (PMeV-Mx) podría contribuir a facilitar la investigación de la patogénesis viral, así como ayudar al esclarecimiento de la etiología de enfermedad en México.



### ABSTRACT

PMeV-Mx is a new Umbravirus-like associated with papaya meleira in Mexico, this disease causes serious economic losses in papaya cultivation. The virus has a single-stranded RNA genome of 4.3 Kb, encodes two open reading frames, and has a long non-coding RNA (lncRNA). Like the umbraviruses, it does not encode a capsid protein, so it is not possible to purify viral particles to confirm the etiology of the disease. The aim of this work was to determine if the viral genome is necessary and sufficient to cause the disease, as well as to characterize the sequence of the lncRNA. An infectious clone of PMeV-Mx was generated inserting the viral genome in a binary vector using Gibson assembly. The plasmid contains the CaMV 35S promoter and a viral Ribozyme to control viral RNA expression in plants. As an approach towards the characterization of the PMeV-Mx lncRNA, regions of secondary structure putatively involved in virus replication were identified for which the design of site-directed mutants was carried out, culminating in the construction of a mutant assembled by Gibson's method. This reverse genetic approach will allow, in the near future, the characterization of the secondary structure rich regions in plants. In addition, the construction of an infectious clone of PMeV-Mx could contribute to understand the etiology of the disease in Mexico and facilitate to identify genetic determinants of pathogenicity.

### INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo importante en todo el mundo. En el 2018 se produjeron en México un total 1,051,959 toneladas del fruto (FAOSTAT, 2018). Yucatán se encuentra entre los diez principales estados productores de papaya, dominando el mercado nacional junto con Chiapas y Colima, por la calidad del fruto que producen (Guzmán *et al.*, 2012).

En las regiones productoras de papaya más importantes del mundo, las principales enfermedades son causadas hongos del género *Colletotrichum* y por virus, las cuales provocan graves pérdidas económicas. Se han reportado más de diez especies de virus diferentes en papaya en todo el mundo. Sin embargo, los más importantes en América son tres: el Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P), el Virus del mosaico de la papaya (PapMV) y el complejo de virus de la meleira de la papaya, que comprende el Virus de la meleira de la papaya (PMeV) y virus de la meleira de la papaya 2 (PMeV2) (Sá Antunes *et al.*, 2020).

El complejo de Virus de la meleira de la papaya (PMeV y PMeV2), son el agente causal de la enfermedad conocida como meleira de la papaya o enfermedad pegajosa de la papaya (PSD), esta enfermedad se caracteriza por la exudación de látex líquido y acuoso en la superficie del fruto, el cual se oscurece después por exposición atmosférica y da como resultado un aspecto pegajoso de la fruta. Esta exudación también da lugar a la aparición de pequeñas lesiones necróticas en los bordes de hojas tiernas y áreas irregulares de color verde claro y amarillento en las frutas verdes (Sá Antunes *et al.*, 2020).

En México se observaron por primera vez síntomas similares a los de la enfermedad pegajosa de la papaya (PDS) también llamada meleira de la papaya en el 2008, en una plantación de papaya ubicada en el estado de Quintana Roo. Para el 2012, se identificó la presencia y ocurrencia de esta enfermedad en México en huertos de papaya del estado de Quintana Roo y en 29 municipios diferentes ubicados en diez productores de papaya del país (Perez-Brito, 2012). Hasta este año, se pensaba que la meleira era causada únicamente por el virus de RNAcd, PMeV. Pero los cebadores para PMeV de Brasil no funcionaban para detectar la enfermedad en México, donde el diagnóstico se confirmaba mediante la extracción de ácidos nucleicos donde una banda distintiva de RNAds de 12 Kb en un gel de agarosa, indicaba la infección de las plantas (Tavares *et al* 2004). En el 2015, Zamudio-Moreno *et al.*, analizaron plantas con síntomas de meleira en Quintana Roo, donde identificaron una secuencia parcial de 1,154 pb que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) cuya

identidad más cercana de la proteína parcial de 384 aminoácidos predicha es la RdRPs de un *Umbravirus*. Esta secuencia identificada pertenece a lo que ahora se conoce como el virus PMeV-Mx, un virus de RNAss de sentido positivo, cercano al género *Umbravirus*, asociado a la meleira de la papaya en México.

Los *Umbravirus* son un grupo de virus que infectan una diversidad de plantas, se caracterizan por no codificar una proteína de la cubierta o cápside (CP), además dependen para su transmisión por insectos de un virus asistente, que siempre es un miembro de la familia *Luteoviridae*. La trans-encapsidación del genoma de RNAss del umbravirus en la cápside del *Luteovirus* es necesaria para la transmisión (King, A. *et al.*, 2011).

El descubrimiento de esta nueva secuencia viral (PMeV-Mx) asociada a la meleira de la papaya en México, contribuyó para que Sa Antunes *et al.* 2016, reportaran un segundo virus similar a *Umbravirus* asociado al virus de la meleira de papaya en Brasil (PMeV2), el cual muestra similitud con PMeV-Mx en México. En Brasil existe evidencia de una coinfección por el complejo viral PMeV/PMeV2 asociado a la meleira de la papaya, y de que el genoma de PMeV2 se encapsida en la proteína de cubierta de PMeV, por lo que se asume que PMeV es necesario para la transmisión por insectos de PMeV2, y que éste último es el responsable de causar los síntomas de la enfermedad, sin embargo, esto último aún no se ha demostrado.

En México, PMeV-Mx es el único virus asociado a la meleira de la papaya, sin embargo, al ser un virus nuevo, se desconoce en gran medida el papel y la funcionalidad de sus componentes genéticos, los cuales podrían estar involucrados mecanismos de infección y múltiples procesos patológicos.

La secuencia completa de PMeV-Mx contempla un RNA lineal de 4,346 nt, que comprende dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2). El ORF1 codifica proteína hipotética de 320 aa y el ORF2 codifica una secuencia de 401 aa que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), respectivamente. Y una secuencia de RNA larga no codificante (lncRNA) de 1,900 nt que forma parte del genoma viral (López-Ochoa, *et al.*, en preparación).

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) son una clase de RNA de más de 200 nt de longitud que no tienen la capacidad de codificar proteínas.

Una característica de las secuencias de lncRNA es que se encuentran menos conservados que los genes codificadores de proteínas, y que otros RNA (RNAm, RNAmi,

RNAp), por lo que se ha debatido activamente sobre su funcionalidad debido a su baja conservación entre especies y su baja expresión (Ma *et al.*, 2013). Sin embargo, los lncRNA han sido tema de estudio reciente, y los hallazgos sugieren que juegan roles reguladores en múltiples procesos patológicos. Hasta la fecha han sido descubiertos varios lncRNA codificados por virus (Zhao, 2019) y se ha identificado que estos pueden modular la infectividad y el transcriptoma del hospedero (Shrestha & Bujarski, 2020).

Este proyecto se realizó un primer acercamiento a la caracterización del RNA largo no codificante de PMeV-Mx, mediante el análisis *in silico* de su secuencia primaria y estructura secundaria, donde se identificaron regiones involucradas putativamente en la replicación viral. Además, se desarrolló una clona infectiva de PMeV-Mx por el Método de ensamble de Gibson, que alberga una copia fiel y completa del genoma del virus. La cual se utilizó para realizar la mutación sitio dirigida de una de las regiones anteriormente identificadas en el lncRNA de PMeV-Mx. La clona infectiva y la mutante desarrollada en este proyecto, en un futuro cercano, serán útiles para la caracterización *in vivo* del lncRNA mediante agroinfiltración de plantas. Complementariamente, el desarrollo de la clona infectiva podría contribuir al esclarecimiento de la etiología de enfermedad en México.

## CAPÍTULO I.

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Importancia del cultivo de la papaya

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto tropical que se originó en el sur de México y América Central, existe evidencia de su domesticación dentro de las tierras bajas mayas por al menos 1500 ac. Hasta ahora se conocen múltiples usos para este fruto, pero es consumido principalmente como fruta fresca (Fuentes & Santamaría, 2014)..

La demanda del mercado de frutas tropicales ha crecido constante durante las últimas dos décadas. La papaya es un cultivo frutal importante en todo el mundo y su producción a nivel mundial se estima en 13,6 millones de toneladas (FAOSTAT, 2018). En México la producción total de papaya para el 2018 fue de 1,051,959 toneladas (FAOSTAT, 2018). Además, es el segundo mayor exportador de frutos tropicales en el mundo y el líder mundial en exportación de papaya con una elevada brecha respecto de los otros principales proveedores, el mayor volumen de papaya se exporta hacia Estados Unidos (82.07%) y Canadá (55.16%) (SIAP, 2017). Según estimaciones para el año 2024 (SAGARPA, 2017) la producción de papaya oscilaría entre las 1,115.87 miles de toneladas y se exportarían 254.53 miles de toneladas.

Los principales estados productores son Oaxaca, Colima, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Campeche, Jalisco, Yucatán y Sinaloa. Sin embargo, Chiapas, Colima y Yucatán dominan el mercado nacional e internacional por la calidad del fruto que producen (Guzmán *et al.*, 2012).

El cultivo de papaya se ve afectado por problemas fitosanitarios que afectan la calidad de la planta y del fruto, provocando graves pérdidas económicas, entre los principales factores se encuentran las enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos, fitoplasmas y virus. En las principales regiones productoras de papaya del mundo, las principales enfermedades son causadas por hongos del género *Colletotrichum* y por virus. Se han reportado más de 10 especies de virus diferentes en papaya en todo el mundo (Tabla 1). Sin embargo las más importantes en América son tres: el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P), el virus del mosaico de la papaya (PapMV) y el complejo de virus de la meleira de la papaya, que comprende el virus de la meleira de la papaya (PMeV) y el virus de la meleira la papaya 2 (PMeV2) (Sá Antunes *et al.*, 2020).

**Tabla 1** Virus de la papaya, por familia y género, en las principales regiones productoras del mundo.

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Especies de virus</b>
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Virus del tomate manchado marchito</i> , TSWV.
	<i>Tenuivirus</i>	<i>Virus de la hoja amarilla leve de la papaya</i> , PMYLV.
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Virus de la hoja rizada de la papaya</i> , PaLCV. <i>Virus del arrugamiento de la hoja de papaya</i> , PaLCrV. <i>Virus del rizado de la hoja de chile</i> , ChiLCuV. <i>El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi</i> ToLCNDV. <i>Virus del mosaico de la vena amarilla de Crotón</i> , CYVMV.
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Virus de la mancha anular de la papaya</i> , PRSV-P. <i>Virus del mosaico de la distorsión de la hoja de papaya</i> , PLDMV. <i>Virus del mosaico amarillo del calabacín</i> , ZYMV.
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Virus de la necrosis apical de la papaya</i> , PANV. <i>Virus de la necrosis caída de la papaya</i> , PDNV.
<i>Tombusviridae</i> <sup>a</sup>	<i>Carmovirus</i> <sup>a</sup>	<i>Virus del amarillamiento letal de la papaya</i> , PLYV.
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Virus del mosaico de la papaya</i> , PapMV.
NE <sup>b</sup>	NE <sup>b</sup>	<i>Virus de la meleira de la papaya</i> (PMeV <sup>c</sup> + PMeV-2 <sup>d</sup> ).

<sup>a</sup>La investigación molecular indica homología con la familia *Sobemoviridae* y el género *Sobemovirus*. Tomado de (Sá Antunes *et al.*, 2020).

<sup>b</sup>No establecido. Está en curso la caracterización molecular del genoma del virus.

<sup>c</sup>Clasificado provisionalmente en el género *Totivirus*.

<sup>d</sup>Clasificado tentativamente en el género *Umbravirus*

### 1.2 Virus de la meleira de la papaya (PMeV)

La enfermedad pegajosa o meleira de la papaya, fue observada por primera vez en la década de los 80s en Brasil. Los síntomas característicos de la enfermedad son una intensa exudación espontánea de látex de la superficie del fruto, que se oscurece a medida que se oxida por exposición atmosférica; bordes necróticos de las hojas jóvenes (Nakawaga *et al* 1988; Rodrigues *et al.*, 1989) En 1993, Kitajima y Col. proporcionaron evidencia de una causa viral, al reportar partículas virales isométricas de aproximadamente 50 nm en laticíferos de plantas enfermas, así como la obtención de RNA bicatenario (RNAds) del látex de frutos (Kitajima *et al.*, 1993). Posteriormente, para demostrar los postulados de Koch, Maciel-Zambolim y Col. (2003), purificaron partículas virales isométricas llenas y vacías de 42 y 38 nm respectivamente e inocularon plantas de papaya sanas, las cuales desarrollaron síntomas típicos de la enfermedad. También extrajeron ácidos nucleicos de las partículas virales purificadas, determinando que el genoma del virus, al que llamaron Virus de la meleira de la papaya (PMeV) era de RNAds de 12 Kb, confirmando la etiología de la enfermedad (Maciel-Zambolim *et al.* 2003).

En el 2008, se observaron síntomas similares a la meleira de la papaya en una plantación de papaya ubicada en el estado de Quintana Roo, en México. Para el 2012, se estudió la presencia y ocurrencia de PMeV en México en huertos de papaya del estado de Quintana Roo y en 29 municipios diferentes ubicados en diez productores de papaya del país. La presencia del virus se confirmó en siete estados, utilizando el protocolo basado en la observación de ácidos nucleicos en geles de agarosa, donde se observó una banda distintiva de RNAds de 12 Kb así como una banda de 4.5 Kb en todas las plantas infectadas (Perez-Brito, 2012). Cabe mencionar que los cebadores disponibles hasta ese momento para el diagnóstico de PMeV de Brasil (Araujo *et al.*, 2007), no permitían el diagnóstico por RT-PCR del virus presente en México (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Pérez-Brito comunicación personal). Por esta razón, Zamudio-Moreno y Col. generaron y secuenciaron una minibiblioteca de cDNA obtenida del látex de frutos de plantas sintomáticas de la Península de Yucatán, identificando una secuencia parcial de 1,154 pb que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). La identidad más cercana de la proteína parcial predicha, es la RdRP del Virus asociado a la vena amarilla de los cítricos (CYVV), con 42% de identidad, otras secuencias cercanas pertenecen a las RdRP de miembros del género *Umbravirus*, como son: el Virus imitador del moteado de zanahoria (CMoMV) (39%), Virus del moteado de la zanahoria (CMoV) (38%) y el Virus de la roseta del maní (GRV) (37%). Estos virus poseen un genoma de RNA de cadena sencilla (RNAs). Con la secuencia obtenida se logró realizar el diagnóstico de la enfermedad en

México, así como de una muestra de látex de frutos de una planta sintomática de Brasil por RT-PCR. Al comparar las secuencias nucleotídicas de tres amplicones obtenidos del diagnóstico de ambos países, se encontró que uno de 173 pb compartía hasta 98 % de identidad, sugiriendo que se en México se encontraba una variante del mismo virus, al cual se le denominó Variante mexicana del virus de la papaya (PMeV-Mx; Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). Posteriormente, en 2015, Abreu y Col. reportaron la primera secuencia completa y organización genómica de PMeV de Brasil, que corresponde a un virus de genoma RNAds de 8,7 kb, con dos marcos de lectura abiertos, el ORF1 codifica la proteína de la cápside y el ORF2 codifica a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). Este virus está relacionado filogenéticamente con los micovirus, miembros de la familia *Totiviridae* (Abreu *et al.*, 2015). Al comparar la secuencia de PMeV con la de PMeV-Mx los autores de este trabajo señalaron que PMeV y PMeV-Mx no estaban relacionados (Abreu *et al.*, 2015). Ante estos hallazgos, un año después, Sá Antunes y Col retomaron la purificación de partículas virales de plantas sintomáticas de Brasil, encontrando un segundo genoma de 4.5 Kb dentro de la proteína de la cápside de PMeV, el cual nombraron PMeV2, un virus similar a *Umbravirus* (Sá Antunes *et al.*, 2016).

### 1.3 *Umbravirus*

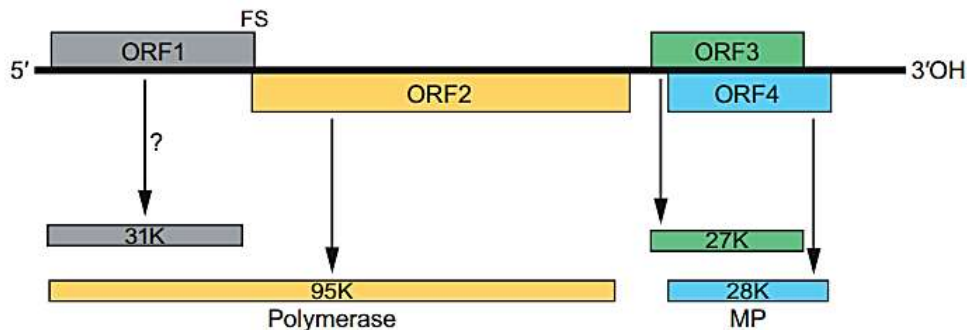
Los *Umbravirus* se caracterizan por no codificar una proteína de la cubierta (CP). El nombre del género *Umbravirus* se deriva del latín *umbra*, que significa sombra o un no invitado que viene con un invitado, este nombre refleja la forma en que los *Umbravirus* dependen para sobrevivir de un virus asistente, que siempre es un miembro de la familia *Luteoviridae* (King, A. *et al.*, 2011). Aunque todos los *Umbravirus* dependen de un virus auxiliar, para la transmisión por insectos vectores, varios de ellos son tan importantes o más importantes que sus colaboradores en la causa de los síntomas de la enfermedad. En la mayoría de los casos, no se ha demostrado que los *Umbravirus* contribuyan con funciones esenciales para el éxito biológico de sus virus auxiliares asociados (King, A. *et al.*, 2011) y se ha demostrado que varios de ellos son tan importantes o más importantes que sus virus ayudadores en la causa de los síntomas de la enfermedad.

Los miembros del género *Umbravirus* de la familia *Tombusviridae*, tienen un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo con una longitud de aproximadamente 4.0 a 4.2 Kb (Lim *et al.*, 2019). Su genoma está organizado comúnmente por cuatro marcos de lectura abiertos principales (ORF) (Figura 1). ORF2 se superpone a ORF1 y se traduce después de un -1 desplazamiento del marco ribosómico. Los análisis comparativos han demostrado que el



ORF2 codifica una polimerasa que se asemeja a las de especies del género *Luteovirus* (familia *Luteoviridae*) y varios otros géneros de virus vegetales. El ORF3 y ORF4 se superponen casi por completo en diferentes marcos de lectura y probablemente se traducen a partir de un RNA subgenómico (Syller, 2003a).

El producto putativo de ORF4 es una proteína de movimiento reconocida para controlar la propagación sistémica (de célula a célula) de un virus. Las funciones de ORF1 y ORF3 están claras. El producto de ORF1 podría ser una proteína de replicación. El producto putativo de ORF3 juega un papel como una proteína de movimiento responsable del transporte de virus a larga distancia. Esta proteína se une al RNA viral para formar complejos de ribonucleoproteínas citoplasmáticas que pueden servir para proteger el RNA viral y pueden ser la forma en que se desplaza a gran distancia a través del floema. Las partículas de ribonucleoproteína parecen representar una estructura nueva que pueden utilizar los *Umbravirus* como alternativa a los viriones clásicos (Syller, 2003).

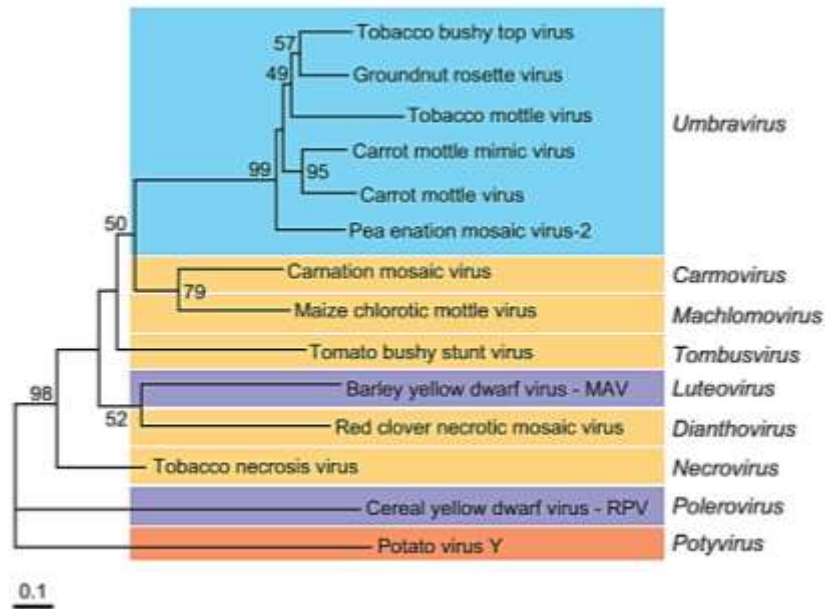


**Figura 1** Organización genómica del Groundnut rosette virus (Virus de la roseta del maní (GRV)). La línea horizontal continua representa el RNA del genoma, y los bloques numerados de los ORF numerados correspondientemente (King, A. *et al.*, 2011).

### 1.3.1 Similitud con otros taxones

Las comparaciones de secuencias de aminoácidos muestran que las RdRPs putativas codificadas por el RNA genómico de los *Umbravirus* pertenecen al llamado supergrupo 2 de RNA polimerasas, al igual que las de los virus de los géneros *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Luteovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus* y *Tombusvirus* (King, A. *et al.*, 2011).

Dado que estas enzimas son las únicas proteínas universalmente conservadas de los virus de RNA de cadena positiva, el género *Umbravirus* podría considerarse perteneciente o cercano a la familia *Tombusviridae* (Figura 2) (King, A. *et al.*, 2011).



**Figura 2** Relaciones filogenéticas de las RdRPs de Umbravirus y algunos otros virus de plantas (King, A. *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Criterios de demarcación de especies en el género

Los criterios que delimitan las especies del género son:

- Rango de hospederos naturales.
- Patrón de bandas de RNAs (teniendo en cuenta que algunas bandas pueden representar especies de RNA satélite).
- Identidad de secuencia de nucleótidos menor al 70%.
- Hibridación escasa o nula con sondas de cDNA que representan la mayor parte del genoma.

#### 1.4 Virus similares a *Umbravirus*

Los virus similares a *Umbravirus* o *Umbravirus-like* virus, son un grupo de virus vegetales se encuentran estrechamente relacionados con el género *Umbravirus*, compartiendo características como la ausencia de una secuencia codificante para la proteína de la cápside. Esta característica hace que los *Umbravirus* siempre se encuentran asociados con un virus auxiliar de la familia *Luteoviridae* (luteovirus, polerovirus y enamovirus) para su infección. Este mismo evento caracteriza a los RNAs asociados a los tombusvirus (tRNAA) otro grupo de virus recientemente descritos que no codifican una proteína de cápside, y que, aunque pueden replicarse de forma independiente en células individuales, dependen de un polerovirus auxiliar para el movimiento sistémico y la transencapsidación (J. Liu *et al.*, 2021). Para los *Umbravirus-like* virus no se ha podido identificar la presencia de un virus auxiliar de la familia *Luteoviridae* en plantas infectadas. En el caso del *umbravirus-like* virus de la meileira de la papaya 2 (PMeV2), este está asociado exclusivamente con un virus auxiliar de la familia *Totiviridae* (Sá Antunes *et al.*, 2020). Por lo que, no se puede descartar que los *Umbravirus-like* virus tengan asociaciones mutualistas con virus de diferentes familias. O en su caso no necesite de un virus auxiliar para causar infección, tal como el virus asociado al amarillamiento de las venas de los cítricos (CYVaV) que no se ha encontrado asociado a un virus auxiliar, y que ha sido suficiente para causar los síntomas de la enfermedad (Kwon *et al.*, 2021). Para los *Umbravirus-like* virus como PMeV-Mx, PMeV2- Au, PpVQ y BabVQ tampoco se ha podido encontrar un virus auxiliar asociado.

En cuanto su clasificación filogenética el primer acercamiento a la clasificación de estos virus fue por (Kwon *et al.*, 2021) mediante el análisis de secuencias de aa de los dominios conservados de las RdRps de miembros seleccionados de la familia *Tombusviridae*, donde se propone que miembros de virus similares a *Umbravirus* pueden formar un nuevo género dentro de la familia *Tombusviridae*.

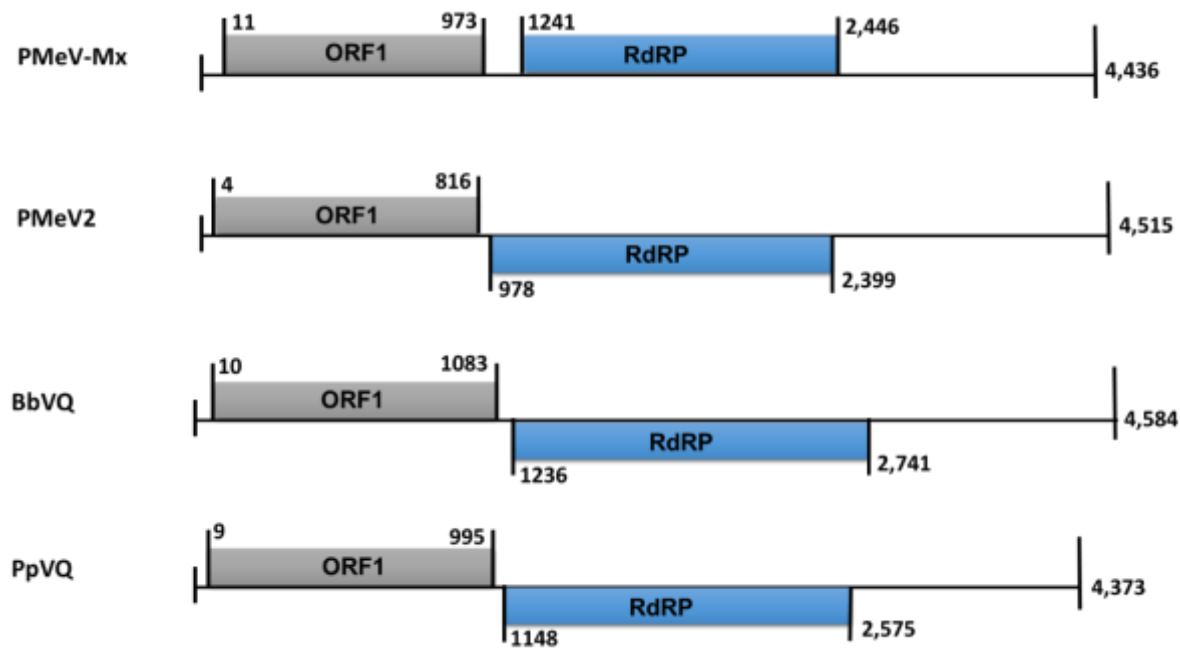
Recientemente Liu y Col., (2021), propusieron una clasificación para estos RNA asociados similares a *Umbravirus* (uRNAA) mediante la caracterización biológica y estructural de sus secuencias. Entre las características que comparten son:

- Codifican una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) después de un evento de cambio de marco ribosómico -1.
- Tienen una longitud de 2,7 a 4,6 Kb.
- Se encuentran estrechamente relacionados con los *Umbravirus*.

Además (J. Liu *et al.*, 2021) proponen tres clases de uIRNAA, que se soportan por una serie de análisis de sus relaciones evolutivas basadas en dominios estructurales distintivos.

### 1.4.1 Virus similares a *Umbravirus* de la papaya

recientemente se han identificado nuevos virus similares a *umbravirus* asociados a síntomas de la enfermedad pegajosa de la papaya (pds). en 2015, el grupo de la dra. López ochoa liberó una secuencia parcial de pmev-mx de 4,285 nt en el genbank, con número de acceso kf214786.1. esta secuencia comparte hasta 70% de identidad con pmev2 (sa antunes *et al* 2016). pmev-mx y pmev2 además muestran similitud con otro virus similar *umbravirus* (*umbra-like virus*) encontrado en ecuador en plantaciones de papaya. interesantemente este virus, al que se denominó virus q de la papaya (ppvq papaya virus q., quito-avila *et al.* 2015), no estaba asociado a síntomas de meleira sino a síntomas de la mancha anular de la papaya, causada por el virus del mismo nombre (prsv-p por sus siglas en inglés). prsv y ppvq se encontraron en hojas de plantas sintomáticas. se dispone de una secuencia parcial de nucleótidos para ppvq, que incluye la región del orf2 y parte del lncrna la cual tiene 76.6 % y 46.74 % de identidad con pmev-mx y, con pmev2 respectivamente. para ppvq, solo se dispone de una secuencia parcial que incluye el orf2, que codifica para el rdp (quito-avila *et al.*,2015), mientras que para pmev2 y pmev-mx se sabe que tienen un orf1 que codifica para una proteína putativa de función desconocida, que no se parece significativamente a las secuencias peptídicas reportadas en las bases de datos (sa antunes *et al.*, 2016; zamudio moreno *et al.*, 2015; quito-avila *et al.*, 2015).



**Figura 3** Organización genómica de virus similares a Umbravirus. (PMeV-Mx: datos no publicados, PMeV2: KT921785, PpVQ: KP165407 y BabVQ: MT113181.1).

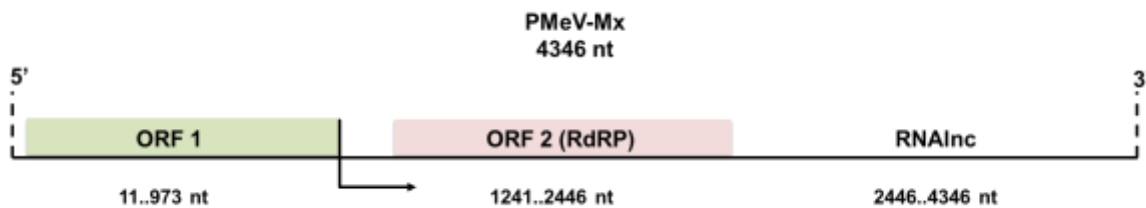
En 2019, se reporta por primera vez la enfermedad pegajosa de la papaya (PDS) en Queensland, Australia (Pathania *et al.* 2019). Aunque la secuencia del virus asociado a la enfermedad no está disponible, se ha reportado se trata de virus similar a PMeV-Mx y a PMeV2. Al igual que el caso de México, no fue posible identificar a un virus asociado al PMeV por secuenciación masiva, ni por RT-PCR con los cebadores para el diagnóstico de PMeV (Abreu *et al* 2007).

Para el 2020, se reportó la secuencia completa de un cuarto virus similar a *Umbravirus* de papaya en la planta llamada babaco o papaya de monte, una especie relacionada con la papaya (*Carica papaya*) perteneciente al género *Vasconcellea* x *heilbornii*, y familia *Caricaceae*. El nuevo virus denominado Babaco virus Q tiene un genoma que consta de 4,584 nucleótidos organizados en dos marcos de lectura abiertos no superpuestos (ORF 1 y 2), una región no codificante (NCR) de 10 nt de longitud en el extremo 5' y una NCR de 1,843 nt de longitud en el extremo 3'. Las comparaciones de secuencia de ORF 2 revelaron homología con la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRP) de varios virus del género *Umbravirus* y virus relacionados con los *Umbravirus*. El análisis filogenético de la RdRP colocó al nuevo virus en un clado que incluye virus similares a *Umbravirus* reportados de papaya como PpVQ, PMeV-

Mx y PMeV2. Así como algunos virus asociados a cítricos, opuntia, huéspedes de maíz y caña de azúcar (Cornejo-Franco *et al.*, 2021).

#### 1.4.2 Virus de la meleira de la papaya variante mexicana (PMeV-Mx)

Zamudio-Moreno *et al.* (2015), analizaron plantas con síntomas de meleira en Quintana Roo, donde identificaron una secuencia parcial de 1,154 pb que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) cuya identidad más cercana de la proteína parcial de 384 aminoácidos predicha es la RdRPs de un *Umbravirus*. Esta secuencia identificada pertenece a lo que ahora se conoce como el virus PMeV-Mx, el único virus que se ha encontrado asociado a la meleira de la papaya en México. La secuencia completa de PMeV-Mx, contempla un RNA lineal de 4,346 nt (López-Ochoa, *et al.*, datos sin publicar), con una organización genómica que comprende dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) que pertenecen a una proteína hipotética de 320 aa y a una secuencia de 401 aa que codifica para una RdRP, respectivamente, además de una secuencia larga de RNA no codificante de 1,900 nt (Figura 4).



**Figura 4** Representación esquemática de la organización genómica de PMeV-Mx. El RNAss+ viral de 4,346 nt contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF): El ORF1 codifica una proteína hipotética y el ORF2 una RdRP putativa, el genoma también posee una secuencia de RNA largo no codificante de 1,900 nt.

La caracterización de las propiedades genómicas de PMeV-Mx se encuentra en curso, en el caso la secuencia de lncRNA de 1,900 nt de PMeV-Mx, los antecedentes para estas secuencias no codificantes, sugieren que podría jugar un rol importante en la replicación viral, dada su naturaleza e implicación en los ciclos replicativos virales (Wang *et al.*, 2017).

### 1.5 RNA largo no codificante (lncRNA).

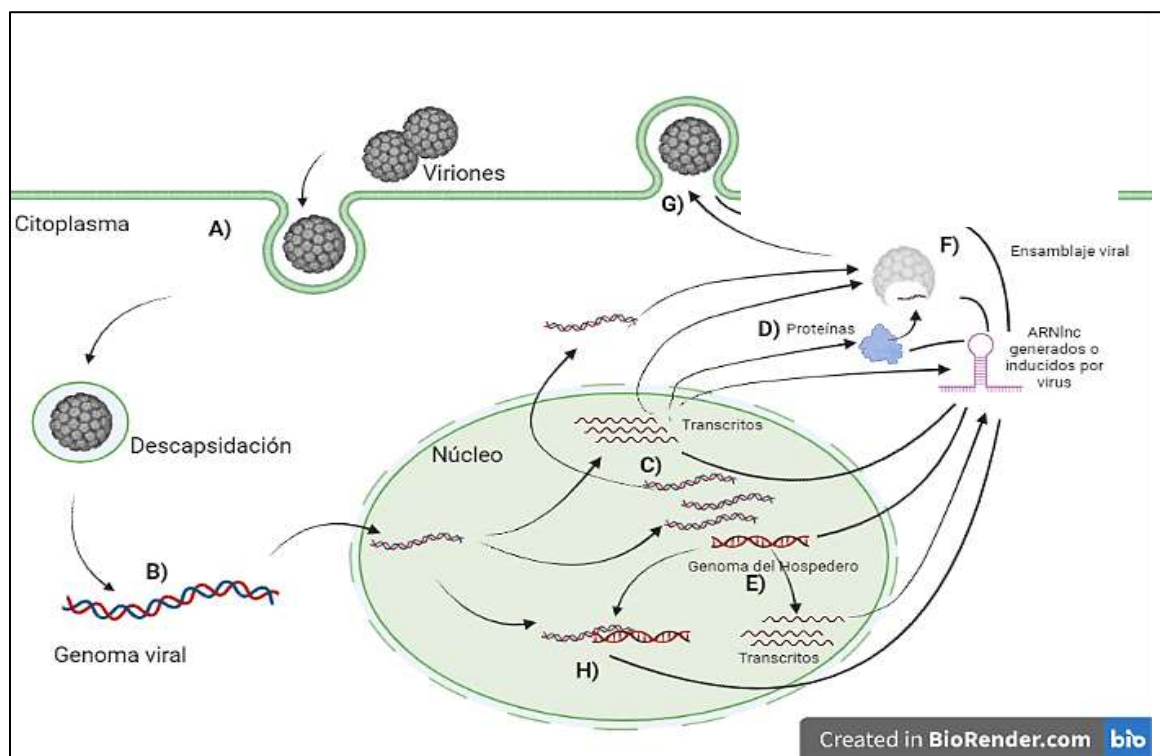
Los RNA largos no codificantes (lncRNA) son una clase de RNA de más de 200 nt de longitud que no se traducen a proteínas.

Una característica de los lncRNA es que se encuentran menos conservados que los genes codificadores de proteínas, y que otros RNA bien estudiados como RNAm, RNAmi, RNApn), se ha debatido activamente sobre su funcionalidad debido a su baja conservación entre especies y su baja expresión (Ma *et al.*, 2013). Sin embargo, sus secuencias promotoras y las ubicaciones genómicas están tan conservadas como los genes codificantes, indicando que su expresión está bajo estricto control regulatorio y limitaciones evolutivas (P. Wang, 2019).

#### 1.5.1 RNA largo no codificante viral

Los lncRNA se observan en una gran diversidad de especies, incluidas animales, plantas, levaduras, procariontes y virus. Estos últimos, han sido tema de estudio reciente, los hallazgos sugieren que los lncRNA juegan roles reguladores en múltiples procesos patológicos (Z. Wang *et al.*, 2017a). Se ha observado que, durante la infección por virus, la célula hospedera genera varios lncRNA para contrarrestar la infección. Del mismo modo, los propios virus también expresan muchos lncRNA para resistir la actividad antiviral celular (W. Liu & Ding, 2017).

En la Figura 5, se observan las funciones reguladoras de los lncRNA en el ciclo de vida viral (Z. Wang *et al.*, 2017).



**Figura 5** Funciones reguladoras de los lncRNA en los ciclos replicativos virales. Una vez que el virus ingresa a la célula hospedera al unirse a los receptores de la superficie celular (A y B), los lncRNA generados o inducidos por virus facilitan sus ciclos de vida mediante el incremento de la transcripción (C) y traducción (D) del gen viral, promoviendo la replicación viral (E) y empaquetado del genoma (F), aumentando la liberación del virión (G) y manteniendo la latencia viral (H) (Modificado de Z. Wang *et al.*, 2017).

Los virus regulan la expresión tanto de sus genes virales como de los genes de la célula hospedera, por interacción con DNA, RNA y proteínas durante el proceso de infección, y como resultado, los virus son compatibles con los lncRNA autocodificados como con los lncRNA del hospedero (W. Liu & Ding, 2017). En la tabla 2 se describen algunos de los lncRNA generados por virus que han demostrado su papel en la impartición de resistencia a las respuestas inmunitarias antivirales (Tabla 2) (Z. Wang *et al.*, 2017).

**Tabla 2** RNA largos no codificantes que imparten resistencia a las respuestas inmunitarias antivirales (tomada de Z. Wang *et al.*, 2017).

Origen	(Nombre, familia y tipo de genoma del virus)	Función
EBER1 y EBER2	Virus de Epstein-Barr, Herpesviridae, DNAds	Unido a PKR y derogando su actividad
VAI RNA y VAII RNA	Adenovirus humano, Adenoviridae, DNAds	Inhibir la activación de PKR; Interferir con la actividad de Dicer
SfRNA	West Nile, <i>Flaviviridae</i> , RNAss	Escisión perturbadora de DNAds; Inhibir el Dicer de RNase; Reprimir la expresión de IFN
SfRNA	Virus del dengue, <i>Flaviviridae</i> , RNAss	Escisión perturbadora de DNAds; Inhibiendo el Dicer de RNAsa
SfRNA	Virus de la encefalitis japonesa, <i>Flaviviridae</i> , RNAss	Prevención de la apoptosis de las células hospederas; obstruir la producción de interferón, la translocación nuclear y la activación de IRF-3
Beta 2.7	Citomegalovirus humano, <i>Herpesviridae</i> , DNAds	Prevención de la respuesta al estrés de la célula hospederas, apoptosis y disfunción metabólica

Entre las funciones biológicas de los lncRNA se han descrito: incrementan la expresión génica viral, mantienen la latencia viral, promocionan del ensamblaje viral, aumentan la



liberación de viriones, e imparten resistencia a las respuestas inmunitarias antivirales del hospedero (Z. Wang *et al.*, 2017). Hasta la fecha han sido descubiertos varios lncRNA codificados por virus (Tabla 3) (Zhao, 2019), sin embargo, la mayoría fueron aislados de virus patógenos de humanos y sus funciones están bien caracterizadas.

**Tabla 3** RNA largos no codificantes codificados por virus y sus funciones (Tomado de Zhao, 2019).

Nombre del lncRNA	Fuente	Funciones y características
<b>β2.7</b>	Citomegalovirus humano	Actúa en combinación con el complejo enzimático mitocondrial, evitando que las células sufran apoptosis y permitiendo la producción continua de energía.
<b>sfRNA</b>	Arbovirus	Fragmento del extremo 3' del RNA viral, resistente a la exonucleasa Xrn1 del hospedero; abundancia correlacionada con patogenicidad viral.
<b>Aspro5</b>	Virus de inmunodeficiencia humana	Transcrito por la región terminal 5' del VIH; inhibe la actividad del promotor del VIH y silencia la expresión génica viral.
<b>HBx-LINNE1</b>	Virus de la hepatitis B	El genoma del VHB se inserta en el brazo corto del cromosoma 8 dando como resultado transcripciones quiméricas que conducen a una mayor malignidad y migración celular.
<b>EBERs</b>	Virus de Epstein-Barr	Transcrito por la RNA polimerasa III y tiene un terminal de poliadenilación 5'. El virus de Epstein-Barr se expresa altamente en latencia y regula el sistema inmunológico innato del hospedero.
<b>HSURs</b>	Herpesvirus	Incluye HSUR1 y HSUR2; que puede inducir la degradación de miR-27 y regular la expresión génica de las células T del hospedero.
<b>Vas</b>	Adenovirus humano	Induce la formación de complejos silenciadores de RNA y muestra una mayor expresión durante la replicación viral.
<b>RNA PAN</b>	Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi	RNA poliadenilado que se une al factor de transcripción IRF-4 para inhibir la respuesta inmune innata de la célula hospedera e influye en la acumulación de RNAm de KSHV en focos nucleares.
<b>ASP RNA</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana 1	Promueve el silenciamiento epigenético del VIH-1 5'LTR y la latencia proviral a través de la vía PRC2

Actualmente el enfoque y búsqueda de lncRNA virales en plantas ha tomado relevancia puesto que se han identificado lncRNA derivados de virus para muchos virus de plantas, que

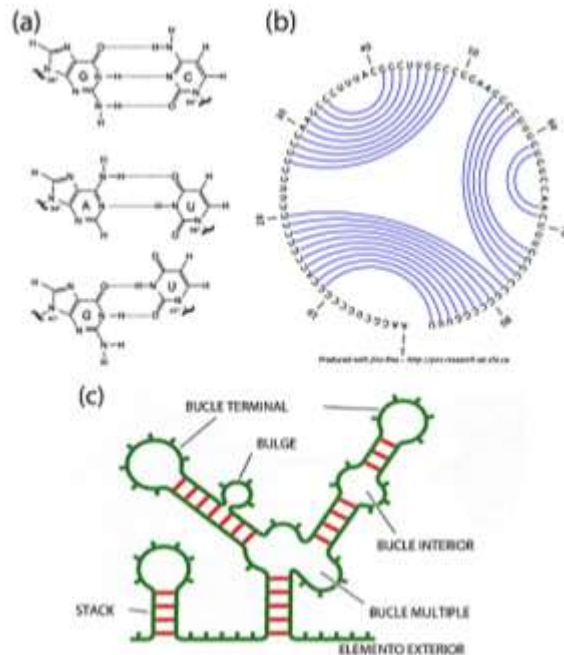
pueden modular la infectividad y transcriptoma del hospedero. Los lncRNA relacionados con virus de plantas pueden derivarse a partir de: viroides, RNA satélite, y de origen viral (Shrestha & Bujarski, 2020).

En cuanto a los lncRNA de la planta hospedera y las respuestas de la planta a los patógenos/virus, en general, se ha descubierto que los lncRNA juegan un papel en la modificación de la arquitectura de la cromatina e interactúan con factores de transcripción y traducción, con proteínas de cascadas de señalización o con otros factores de la célula hospedera. Estos lncRNA probablemente podrían actuar para derribar los sistemas de defensa celular. Comprender la relevancia de los lncRNA para las enfermedades en términos de desarrollo de virulencia e inmunidad antiviral puede facilitar el diseño de nuevas estrategias antivirales (Shrestha & Bujarski, 2020).

### **1.6 Estructura secundaria del RNA**

Las bases de una secuencia de RNA pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, formando un par de bases, siendo los más importantes los pares de bases tipo Watson-Crick (o canónicos), G-C, C-G, A-U y U-A, pero también los pares wobble G-U y U-G. Dadas esas posibilidades de emparejamiento dos nucleótidos elegidos al azar forman un par (son compatibles) con una probabilidad del 37.5 %. No obstante, en secuencias reales –y por lo tanto no aleatorias– el número de bases que forman pares en la estructura secundaria suele ser más alto, p. ej., en un RNAt, alrededor del 60 %. La formación de pares de bases esta esquemáticamente dibujado en la Figura 6. (Dotu *et al.*, 2018).

En general, se forman zonas con varios pares de bases seguidos, formando así un apilamiento o *stack*. La longitud de un *stack* se mide en número de pares de bases consecutivos. Si un *stack* es suficientemente largo, forma una estructura de doble hélice, también llamado dúplex. Una observación fundamental en el plegamiento del RNA es que si la molécula forma enlaces consigo mismo, necesariamente tiene que formar por lo menos un bucle para acercar los nucleótidos suficientemente. Ese bucle se llama bucle terminal, aunque es más común llamarlo bucle horquilla o *hairpin loop*. Una molécula necesita espacio para realizar este giro, lo que implica que hay por lo menos dos o tres nucleótidos dentro del bucle que no pueden participar en la formación de un par de bases. Este argumento también prohíbe la formación de pares de bases entre bases vecinas. En una estructura secundaria un nucleótido o está sin aparear o forma parte de un solo par. Las bases sin aparear que no se encuentran en un bucle, son llamadas exteriores (Dotu *et al.*, 2018).



**Figura 6** Estructuras secundarias del RNA. **(a)** Pares de bases Watson-Crick G-C (arriba), Watson-Crick A-U (centro) y wobble G-U (abajo). **(b)** Representación circular de la estructura secundaria. Las líneas curvadas indican pares de bases. **(c)** Elementos de estructuras secundarias. Los pares de bases (líneas rojas) se pueden apilar y formar apilamientos o *stacks*. Las bases sin aparear aparecen como parte de elementos externos o dentro de bucles. Entre los bucles se distinguen los bucles terminales (en inglés, *hairpin*), con un par que cierra el bucle, los *bulges* y bucles interiores, que tienen dos pares que cierran el bucle, y los bucles múltiples, que tienen más que dos pares que cierran el bucle. *Bulges* son bucles con bases sin aparear en un solo lado de la cadena, bucles interiores tienen bases sin aparear en los dos lados (Tomado de Dotu *et al* 2018).

### 1.6.1 Estructuras secundarias de los lncRNA

Dos características importantes de las moléculas de RNA son su flexibilidad intrínseca y su propensión a adoptar múltiples conformaciones. Las moléculas de RNA a menudo muestran múltiples conformaciones dinámicas y se representan mejor como un conjunto de estructuras (Dethoff *et al.*, 2012).

Los lncRNA regulan los procesos celulares fundamentales que desempeñan funciones clave en la epigenética, la regulación transcripcional y traslacional, y el andamiaje de estructuras o compartimentos subcelulares clave. Sus funciones requieren inherentemente que los lncRNA reconozcan dianas moleculares en la célula, modulan la función de las proteínas, contribuyan a dar forma a la arquitectura nuclear y aseguren la dirección correcta de los factores de transcripción y traducción. En este contexto, las estructuras de lncRNA garantizan

una regulación eficaz de la expresión génica al dar forma a las interfaces de reconocimiento de RNA-proteína y al proporcionar un andamio para el ensamblaje de complejos de ribonucleoproteínas. Independientemente de su arquitectura estructural exacta, el estudio de las propiedades bioquímicas y biofísicas de lncRNA específicos es la única forma de determinar experimentalmente las propiedades moleculares de estos objetivos y de facilitar su comprensión estructura-funcional (Chillón & Marcía, 2020).

Se espera que la función del lncRNA esté estrechamente relacionada con sus características estructurales de una manera similar a la relación entre función y estructura en las proteínas (Jones & Sattler, 2019).

### **1.7 Clones infecciosos de cDNA de virus de plantas**

Un clon infeccioso (como cDNA o como copias de RNA transcrito *in vitro*) de un virus de RNA es un plásmido que contiene el cDNA genómico de longitud completa del virus. Bajo el control de promotores adecuados, el cDNA genómico viral puede transcribirse *in vitro* o *in vivo* en el RNA genómico viral, estableciendo la infección en las plantas hospedera (Nagyová & Šubr, 2007).

Los clones infecciosos de cDNA son herramientas poderosas para investigar virus de plantas. Pueden aplicarse a estudios básicos de ciclos de vida virales e interacciones virus-hospedero, y sirven como conjuntos de genes virales para el diseño de estrategias antivirales y para el desarrollo de vectores virales (Nagyová & Šubr, 2007). Sin embargo, la construcción de clones infectivos de virus de RNA y DNA generalmente requiere laboriosos pasos de clonación y subclonación. Además, la inestabilidad del genoma del virus RNA se informa con frecuencia después de su introducción en el vector y su transferencia a *Escherichia coli* (Nagata & Inoue-Nagata, 2015). La toxicidad e inestabilidad de algunas secuencias virales para el hospedero procariótico hace que los clones infecciosos construidos sean propensos a la mutación. Una posible causa de este fenómeno es que existen sitios de unión ribosomal crípticos presentes en las secuencias de cDNA del virus. Esto puede promover la expresión de proteínas virales que son tóxicas para las células hospederas en *E. coli*, especialmente en condiciones de alto número de copias (Guo *et al.*, 2020).

Los genomas completos de virus vegetales modificados pueden usarse para la introducción de genes heterólogos en plantas. Esencialmente, el vector viral es un clon infeccioso del virus con un sitio de clonación adecuado introducido y con el gen no funcional para la transmisión natural del virus (Pasin *et al.*, 2019).

Los clones infecciosos ofrecen información valiosa sobre la genómica funcional viral, son útiles en los estudios de expresión y replicación de virus de RNA utilizando mutagénesis *in vitro* (deleciones, inserciones, sustituciones) y complementación, así como en la investigación de recombinación natural o inducida, mecanismos de defecto que interfiere en la génesis del RNA y del RNA satélite. Pueden contribuir notablemente al análisis de las interacciones virus-hospedero (por ejemplo, transporte intercelular). Los clones infecciosos pueden considerarse conjuntos de genes virales para el desarrollo de estrategias antivirales (Pasin *et al.*, 2019).

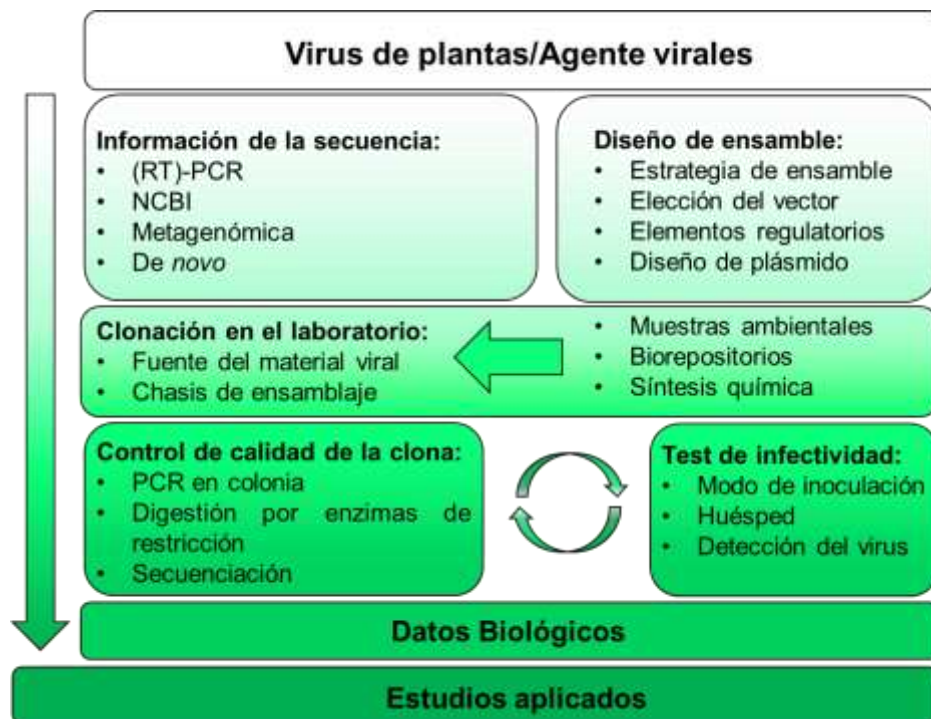
Por lo general, se usa un sistema procariótico para la preparación de clones infecciosos: los genomas virales se clonan en plásmidos bacterianos para una simple manipulación y aplicación de una técnica de laboratorio estandarizada, así como para la multiplicación de las construcciones obtenidas en una escala preparativa. Pueden ocurrir algunas complicaciones que surgen por la inestabilidad del cDNA clonado en *E. coli*, lo que da lugar a mutaciones puntuales o deleciones más grandes. La razón es una posible toxicidad de determinadas secuencias virales para las bacterias (Pasin *et al.*, 2019).

A veces, el problema puede eliminarse mediante la sustitución de la cepa de *E. coli* o el vector de clonación. Alternativamente, los intrones eucariotas pueden insertarse en regiones críticas del genoma, que inactivan los genes en las células procariotas y se eliminan mediante empalme después de la transfección de la planta hospedera. Después de la preparación satisfactoria del clon de cDNA de longitud completa, hay varios factores que influyen negativamente en su infectividad (Pasin *et al.*, 2019).

### **1.7.1 Métodos avanzados para el ensamblaje de clones infecciosos binarios**

El objetivo principal del ensamblaje de clones infecciosos es la construcción de vectores plasmídicos que albergan una copia fiel de los genomas del virus, que en condiciones adecuadas pueden desencadenar una infección vegetal que imita a las naturales. En otra parte se han descrito protocolos detallados paso a paso (Nagata e Inoue-Nagata, 2015; Peremyslov y Dolja, 2007), y en la Figura 7 se muestra un resumen del flujo de trabajo para el ensamblaje de clones infecciosos de virus de plantas. Una vez que se identifican los agentes virales y subvirales, se llevan a cabo análisis de secuencia, diseño de ensamblaje y clonación en laboratorio para obtener clones de virus, es decir, vectores plasmídicos con copias completas de genomas de virus. Después de los controles de calidad de los clones (QC) y las pruebas de infectividad, los clones infecciosos se utilizan para la caracterización biológica de virus nuevos.

Los clones infecciosos pueden tener usos en estudios de investigación aplicada, para el mejoramiento de cultivos y el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas (Pasin *et al.*, 2019).



**Figura 7** Flujo de trabajo para el ensamblaje de clones infecciosos de virus de plantas. A la derecha, y de arriba a abajo, se muestran los pasos representativos del flujo de trabajo (Modificado de Pasin *et al.*, 2019)

Durante décadas, los enfoques más comunes para el ensamblaje de construcciones de DNA y clones infecciosos se han aprovechado de las especificidades de las endonucleasas de restricción para crear extremos compatibles que se unieron mediante DNA ligasas. La presencia o falta de sitios de restricción en el vector y en las secuencias virales fueron las principales limitaciones para el ensamblaje de insertos grandes y múltiples. Se han desarrollado métodos de clonación para superar estas limitaciones, permitiendo así un alto rendimiento en el ensamblaje de construcciones de DNA (Tabla 4).

Los métodos basados en superposición de secuencias resuelven las principales limitaciones del uso tradicional de enzimas de restricción en el ensamblaje de clones infecciosos.

El sistema In-Fusion se ha utilizado para generar clones infecciosos de virus de RNA, el primer reporte de su uso fue en el desarrollo de una clona infecciosa de PLDMV (el Virus del mosaico de la distorsión de la hoja de la papaya), un virus de RNA del género potyvirus, donde

después de su inoculación mecánica y se logró iniciar la infección sistémica en plántulas de *Carica papaya* L., las cuales desarrollaron síntomas similares a los causados por el virus de tipo silvestre (Tuo *et al.*, 2015).

Otro método de clonación desarrollado para la construcción de clones infectivos de virus de RNA de plantas, es el sistema de clonación sin fisuras GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) permite el ensamblaje de fragmentos en un solo paso y se utilizó inicialmente para construir clones agroninfectiosos del Virus del torrado del tomate (ToTV) (Wieczorek *et al.*, 2015).

Sin embargo, el uso de estos métodos no se ha popularizado para el estudio de virus de RNA de plantas, y han sido superados por el uso del método de ensamblaje de Gibson (Gibson *et al* 2009).

**Tabla 4** Métodos de clonación adecuados para el ensamblaje de clones infecciosos binarios (Tomado de Pasin *et al.*, 2019)..

Sistema de clonación	Componente	Usos
Golden Gate	Endonucleasa Tipo IIS, DNA ligasa	n.r., no reportado.
GeneArt seamless cloning kit	Patentado	Wieczorek <i>et al.</i> (2015)
In-Fusion	DNA polimerasa del virus vaccinia	Wang <i>et al.</i> (2015)
Gibson assembly	Exonucleasa de DNA T5, DNA polimerasa de Phusion, DNA ligasa Taq	Blawid and Nagata (2015)
NEBuilder HiFi DNA assembly	Patentado	Pasin <i>et al.</i> (2017)
<i>In vivo</i> yeast assembly	Vectores de plásmidos con origen de levadura	Youssef <i>et al.</i> (2011)
<i>In vivo</i> bacterial assembly (recombineering)	Cepas de <i>E. coli</i> RecET / Red $\alpha\beta\gamma$ - expresión.	n.r., no reportado.

### 1.7.2 Método de ensamblaje de Gibson (GA)

Se han descrito enfoques para simplificar y acelerar la construcción de clones de cDNA infecciosos de longitud completa para virus de plantas, basados en estrategias de clonación que implican ligación *in vitro* o recombinación homóloga en levadura.

Durante el ensamblaje de Gibson se producen moléculas de DNA circulares cerradas. El ensamblaje de Gibson usa tres enzimas juntas en una sola reacción: la exonucleasa T5 elimina los nucleótidos (15 nt) en los extremos 5' de los fragmentos de DNA diana, creando proyecciones monocatenarias en los extremos 3'. La DNA polimerasa luego llena los huecos y la DNA ligasa sella las mellas (Pasin *et al.*, 2019).

La exonucleasa T5 no compite con la DNA polimerasa, por lo que la reacción se puede realizar en un solo tubo. El procedimiento tiene la ventaja de no requerir enzimas de restricción para el ensamblaje y produce secuencias ensambladas sin "cicatrices" (nucleótidos residuales después de la manipulación del ensamblaje) (Bordat *et al.*, 2015).

Gibson y Col., (2015) desarrollaron un sistema de recombinación *in vitro* más rápido y eficiente usando ensamblaje de Gibson (GA), para diseñar un clon infeccioso del virus del mosaico de la lechuga (LMV). El ensamblaje de Gibson permitió la clonación de los plásmidos esperados sin ninguna delección. Todas las plantas inoculadas mostraron síntomas característicos de la infección por LMV. Este fue el primer informe del uso del método de ensamblaje de Gibson para construir clones infecciosos de cDNA de longitud completa de un genoma de *Potyvirus* (Bordat *et al.*, 2015).

Este método se utilizó en el 2015 por Blawid & Nagata para la construcción de una clona infectiva del Virus del mosaico de ampollas del tomate (ToBMV, por sus siglas en inglés), y desde su aplicación, esta tecnología se ha utilizado exitosamente para el desarrollo de clonas infectivas para el estudio de virus de RNA de plantas.

Bijora y Col (2017), aplicaron el método de ensamblaje Gibson (GA) isotérmico de un solo paso para construir un clon agroinfeccioso del virus del mosaico rugoso del frijol (BRMV). BRMV pudo propagarse en los tejidos de la planta y generar de manera eficiente una infección sistémica, lo que confirmó la eficiencia del procedimiento de clonación GA para producir el primer clon agroinfeccioso de BRMV para frijol y soya.

En el 2018, Laufer y Col., desarrollaron clonas infectivas de dos miembros de la familia *Benyviridae* y del género *Benyvirus*, el virus del mosaico transmitido por el suelo de la



remolacha (BSBMV) y el virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha (BNYVV). Estos clones infecciosos representaron una poderosa herramienta para la identificación de determinantes moleculares específicos del hospedero -patógeno.

El método de ensamblaje de Gibson se ha utilizado actualmente para el desarrollo de las primeras clonas infectivas de virus como el Virus del surco del tallo de la manzana (ASGV) (Zhang *et al.*, 2019), el Virus del mosaico de la soya aislado de Shanxi (SMV) (D. Wang *et al.*, 2021) y recientemente el Virus amarillo transmitido por el pulgón del melón (MABYV) (Liu *et al.*, 2022). Con la finalidad del esclarecimiento de enfermedades que afectan a cultivos económicamente importantes, y que se encuentran asociadas a múltiples infecciones virales.

### **1.8 Inoculación de plantas con virus de mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Las plantas pueden inocularse usando moléculas infecciosas de DNA o RNA, que pueden obtenerse de muestras de plantas infectadas o clones infecciosos basados en plásmidos. Para los virus de RNA, las copias de cDNA de los genomas del virus pueden ser promovidos por promotores de bacteriófagos y transcritas *in vitro* para generar genomas de RNA infecciosos. Los clones de plásmidos de virus de DNA y virus de RNA cuyos genomas de cDNA son promovidos por secuencias promotoras activas en plantas pueden inocularse directamente a las plantas mediante métodos físicos, es decir, con la ayuda de abrasivos o dispositivos biolísticos (Nagyova y Subr, 2007).

*A. tumefaciens* se puede utilizar para la transformación estable o transitoria de células vegetales con moléculas de DNA exógenas. Un descubrimiento importante en virología vegetal fue la demostración de que *A. tumefaciens* puede iniciar infecciones víricas mediante el tratamiento de las hojas del hospedero con cepas bacterianas que albergan clones infecciosos de virus vegetales. Brevemente, se insertan copias únicas o múltiples de genomas de virus entre los bordes izquierdo y derecho del T-DNA de un plásmido adecuado para la replicación de *Agrobacterium* (Nagyová & Šubr, 2007).

Una vez que las bacterias entran en contacto con los tejidos vegetales, los cassettes de T-DNA se transfieren a las células hospederas, y la transcripción y traducción de las secuencias de T-DNA desencadenan la síntesis de los componentes virales necesarios para iniciar infecciones autónomas. Los cassettes de T-DNA no requieren una integración estable en los genomas del hospedero, y la expresión transitoria es suficiente para lograr la infección de la planta. Esta característica, junto con la promiscuidad de *Agrobacterium* y su amplia gama de

hospederos, hacen que la agroinoculación sea un método aplicado con éxito a gran diversidad de plantas (Pasin *et al.*, 2019).

Dada su simplicidad y conveniencia, la agroinoculación es, por lo tanto, la forma más eficiente y universal de administrar a las plantas virus de DNA o RNA y agentes subvirales, como viroides y satélites. Se han reportado clones infecciosos binarios para muchas especies de virus, satélites y viroides con genomas mono o multipartitos, y que pertenecen a familias filogenéticamente diversas (Pasin *et al.*, 2019).

La clonación de virus de RNA requiere pasos de manipulación adicionales, por ejemplo, síntesis de cDNA e inclusión de secuencias promotoras y terminadoras que regulan la expresión de componentes virales en plantas (Nagyova y Subr, 2007).

### JUSTIFICACIÓN

La meleira de la papaya es una de las principales enfermedades causadas por virus que provocan graves pérdidas económicas en el cultivo de papaya. En Brasil la enfermedad se ha asociado a dos virus, PMeV y PMeV2, de RNAds y RNAss respectivamente. En México la enfermedad se ha asociado a un virus filogenéticamente relacionado con PMeV2, denominado PMeV-Mx. Igualmente, en Australia, recientemente se identificó un virus similar a PMeV2 y PMeV-Mx asociado a la meleira de la papaya. PpVQ, es otro virus similar a *Umbravirus* de papaya, el cual no se ha asociado a la enfermedad. En vista de estas aparentes contradicciones, se requiere demostrar la etiología la enfermedad.

Debido a que los virus similares a *Umbravirus* de papaya no codifican una proteína de la cápside, no es posible purificar partículas virales para inocular plantas y así demostrar los postulados de Koch. Una herramienta poderosa para la caracterización de la etiología de las enfermedades es el desarrollo de clonas infectivas que alberguen una copia fiel y completa del genoma del virus. Por tanto, en este trabajo se planteó generar una clona infectiva de PMeV-Mx.

PMeV-Mx es un virus similar a *Umbravirus*, cuyo genoma se conforma por dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) y una secuencia larga no codificante de RNA (lncRNA) de 1900 nt. Se desconoce en gran medida el papel y la funcionalidad de los componentes genéticos del virus, los cuales podrían estar involucrados en procesos patogénicos asociados a la enfermedad. Se sabe que los lncRNA son susceptibles a formar estructuras secundarias, y se han registrado múltiples funciones por parte de estas secuencias. Los hallazgos sugieren que juegan roles reguladores en múltiples procesos patogénicos. Por tanto, es necesario estudiar el lncRNA de los virus similares a *Umbravirus* de papaya, para identificar secuencias conservadas y estructuras secundarias que puedan tener una función biológica, como a nivel experimental. En este trabajo se tomó ventaja de la construcción de una clona infectiva para generar una mutante del lncRNA.

### **HIPOTESIS**

- El RNA largo no codificante de PMeV-Mx juega un rol importante en su replicación.
- PMeV-Mx es el agente causal de la enfermedad de la meleira de la papaya en México.

### **OBJETIVO GENERAL**

- Generar herramientas moleculares para estudiar el papel del PMeV-Mx en la meleira de la papaya en México y las funciones de su RNA largo no codificante.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Generar una clona infectiva de longitud completa del virus.
- Identificar mediante análisis *in silico*, regiones conservadas y de estructura secundaria del lncRNA.
- Generar al menos una mutante de las regiones identificadas en el lncRNA de PMeV-Mx.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

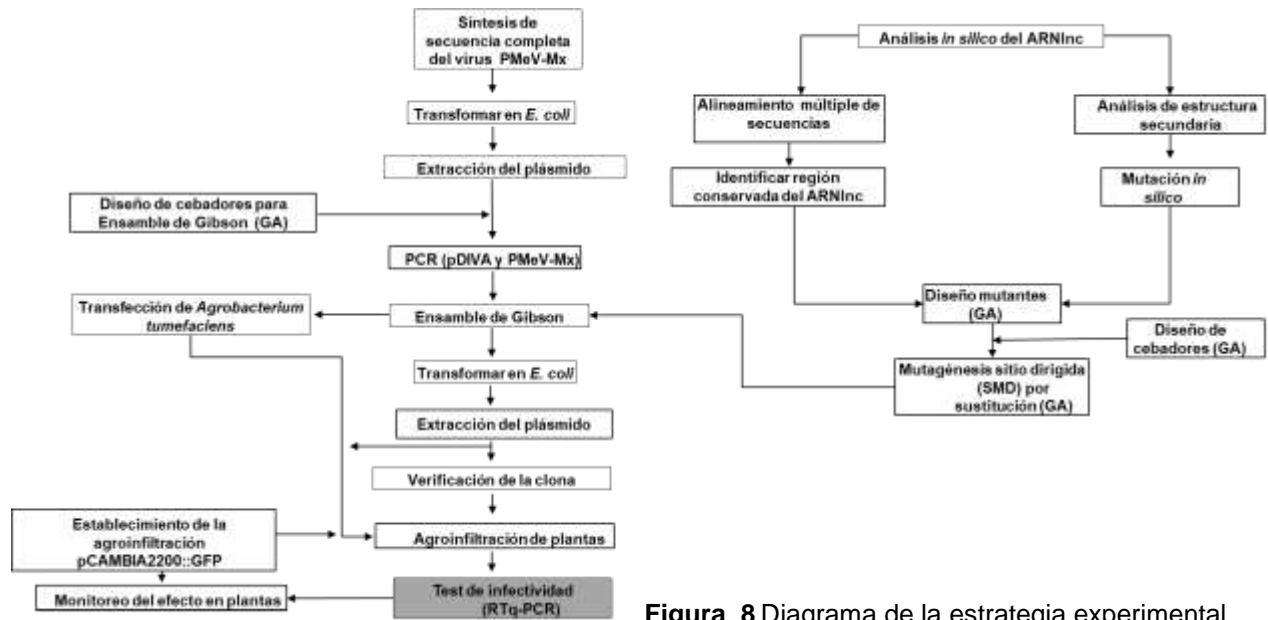


Figura 8 Diagrama de la estrategia experimental.

CAPITULO II.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx

2.1.2. Síntesis de la secuencia de longitud completa de PMeV-Mx

La síntesis de la secuencia completa de PMeV-Mx de 4,366 nt, se sintetizó por la empresa Biomatik, dicha secuencia está insertada en el vector pGEM-T Easy, un vector de clonación de 3,015 pb, de uso común, con resistencia a Ampicilina y un alto número de copias. La clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) mide 7,339 pb.

Construct Map:

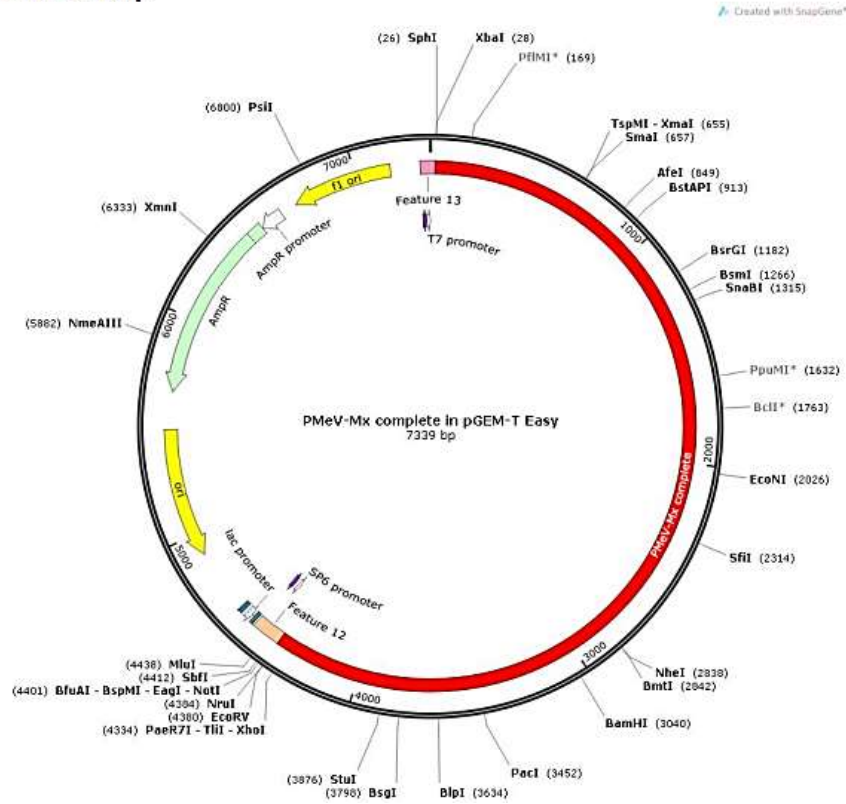


Figura 9 Mapa de pGem®-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) (Biomatik, Corporation 2022).

### 2.1.3. Vector pGEM®-T-Easy

El vector pGEM®-T-Easy es un sistema conveniente para clonar productos de PCR (Figura 10). Contiene una timidina terminal en ambos extremos que permite complementarse con las deoxiadenosina generado por la Taq polimerasa en el extremo 3' del fragmento. Este vector provee resistencia a ampicilina (AmpR), es de alto número de copias, contiene los promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6 que flanquean el sitio de clonación múltiple ubicado dentro de la región codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) se utilizó con la finalidad de obtener un alto de número de copias de la secuencia viral PMeV-Mx, para su subclonación en el vector pDIVA (clona infectiva (pCBL224). Dada la naturaleza del vector y su fácil manipulación, será útil para trabajos complementarios sobre el estudio de bioquímico y molecular de las proteínas virales de PMeV-Mx aún no caracterizadas, así como la síntesis *in vitro* de RNA.

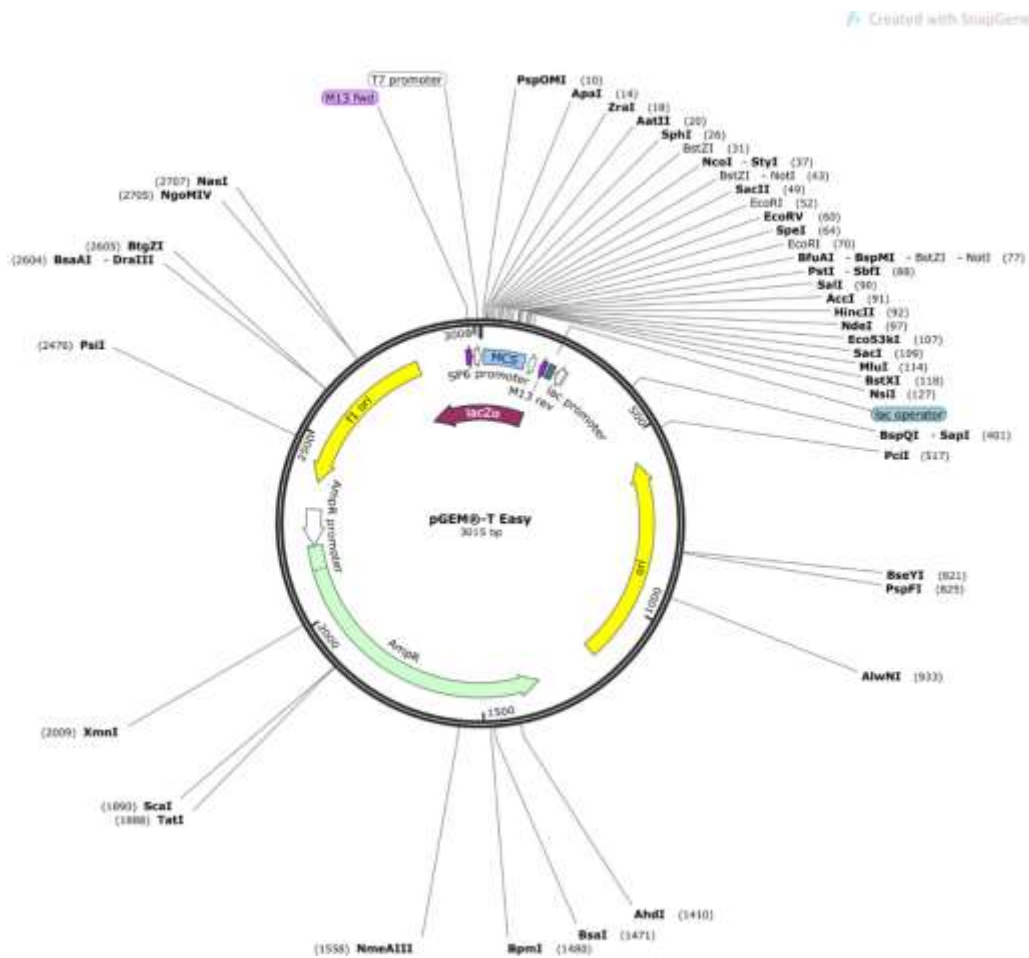


Figura 10 Mapa genético de vector pGEM®-T Easy, tomado de Addgene.

#### **2.1.4. Transformación de pGEM-T Easy::PMeV-Mx**

pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) se transformó en la cepa *E. coli* XL blue químicamente competentes (Sambrook y Russell., 2001) almacenadas a -80°C, mediante choque térmico: se mezclaron suavemente por separado, los 2 µL (10 ng/µL) con 100 µL de células competentes. Posteriormente se incubaron en hielo por 20 minutos, después a 37 °C por 90 segundos, se transfirió a hielo y se incubó dos minutos, se añadió un mL de medio LB y se dejó incubando a 37 °C por 1:30 hrs en agitación constante de 200 rpm, luego se tomó 100 µL de cultivo y se inoculó en incubaron a 37 °C por toda la noche. Por último, se picaron las colonias y se crecieron en tubos con tres mL de LB y ampicilina a una concentración 100 µg/mL, en agitación constante de 200 rpm a 37 °C durante toda la noche. La extracción de plásmido se realizó por lisis alcalina mediante el protocolo de Birnboim, 1983.

#### **2.1.5. Verificación de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx**

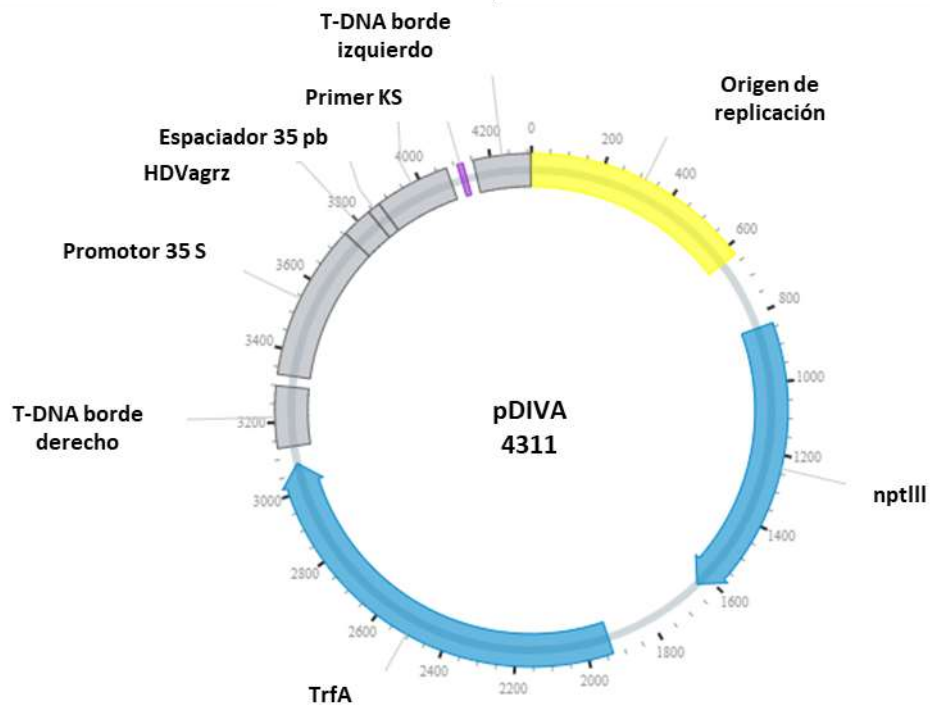
La clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) fue completamente secuenciada por empresa Biomatck, para garantizar la integridad de la síntesis química. Una vez recibida se verificó mediante digestión con enzimas de restricción. Las enzimas se escogieron con base en un análisis *in silico* de la secuencia utilizando el programa ApE (v3.1.1).

Los ensayos de digestión se realizaron con la enzima *Xba I* y *Sal I* de New England Biolabs, con amortiguador CutSmart® a un volumen de 15 µL y 100 ng/µL de DNA plasmídico. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas. Se cargaron los 15 µL de la reacción y 100 ng de plásmido sin digerir en un gel de agarosa al 0.8%, se corrió el gel en una cámara de electroforesis a 90V por 35 minutos, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó.



### 2.1.6. Vector pDIVA

El vector pDIVA es un vector binario de DNA de cadena doble de 4,311 pb (KX665539), cuenta con un promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CaMV), la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV-agrz) y el gen que codifica para una aminoglucósido fosfotransferasa (*nptIII*) que confiere resistencia a los grupos de antibióticos de Kanamicina, Gentamicina, Neomicina y Estreptomicina (Figura 11). Este vector se utilizó para subclonar el genoma de PMeV-Mx, ya que contiene los elementos genéticos necesarios para la inoculación de las plantas de papaya mediada por *A. tumefaciens* (Agroinoculación) como son los bordes Izquierdo y derecho que delimitan el DNA de transferencia (Sparkes *et al.*, 2006).



**Figura 11** Mapa genético del vector pDIVA (Acc. No. KX665539) (Laufer *et al.*, 2018).

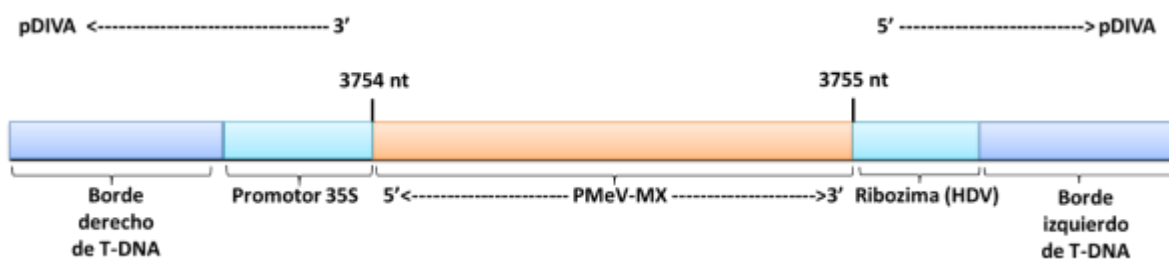
### 2.1.7. Verificación del vector pDIVA

Se transformó el vector pDIVA y una vez obtenido el DNA plasmídico del vector pDIVA (Birnboim, 1983), se verificó por un ensayo con enzimas de restricción.

La digestión se realizó con la endonucleasa de restricción *Xba I* de New England Biolabs, con CutSmart® Buffer en una reacción final de 15 µL para la digestión de 100 ng/µL de DNA plasmídico, siguiendo el protocolo estándar proporcionado por NEB antes mencionado.

### 2.1.8. Subclonación de PMeV-Mx en el vector pDIVA (GA)

Para la construcción de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224), el genoma de PMeV-Mx se insertó en la posición 3,754 del vector pDIVA, entre el promotor CaMV 35S y la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV-agrz), los cuales se encuentran flanqueados por el borde derecho izquierdo de T-DNA del vector binario pDIVA (Figura 12). El cassette de expresión muestra la disposición y localización de los elementos genéticos indispensables para la transferencia y expresión de PMeV-Mx en plantas, mediante *A. tumefaciens*.



**Figura 12** Cassette de expresión del vector binario pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224). No. de accesoión KX665539.

### 2.1.9. Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA)

Se diseñaron los cebadores para la amplificación por PCR de las secuencias a ensamblar de la clona infectiva (pDIVA y PMeV-Mx) por el método de Gibson (Sección de resultados 3.1. 2), según lo sugerido por el manual de instrucciones de Gibson Assembly® Master Mix de New England Biolabs. Se diseñaron dos pares de cebadores

(PMeV-Mx (CB172 y CB 172) y el vector pDIVA (CB189 y CB188) con la herramienta Gene Construction Kit v. 4.5 y la temperatura de alineamiento con Tm Calculator v. 1.13.1.

Con los cebadores diseñados se amplificaron los fragmentos por PCR con la enzima de alta fidelidad Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) (New England Biolabs).

#### **2.1.10. Purificación de los amplicones**

Los productos amplificados por PCR correspondientes a PMeV-Mx y pDIVA se purificaron mediante el QIAquick PCR Purification Kit (50) (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **2.1.11. Ensamblaje de la clona infectiva (GA)**

Una vez amplificados y purificados los respectivos fragmentos que conforman la clona infectiva pCBL224, se procedió a la reacción de ensamblaje de Gibson con el Kit Gibson Assembly® de New England Biolabs, la cual se estableció en relación 1:3 vector-inserto, con una concentración de 0.3 pmol del fragmento amplificado de pDIVA de una longitud de 4,311 pb y 0.9 pmol del fragmento amplificado de PMeV-Mx de 4,378 pb, el volumen final de la reacción fue de 20 µL y se incubó durante una hora a 50°C.

Se tomaron 5 µL de la reacción de ensamblaje y se transformó en células XL blue y DH5α químicamente competentes, por choque térmico, se crecieron las placas a 37 °C. Tras la obtención de colonias, se crecieron en medio líquido LB y se extrajo el DNA plasmídico (Birnboim, 1983). El DNA se utilizó para ensayos de digestión con enzimas de restricción.

Además, se realizó la transformación con 5 µL de producto ensamblado y 5 µL de la purificación de la banda correspondiente a 8.6 Kb directamente del gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit) (Resultados, Figura 24, carril 4), en células competentes XL blue y DH5α, Se mostró el crecimiento de colonias, pero ninguna fue positiva.

Por lo anterior se realizó una dilución 1:4 de la reacción de ensamblaje de Gibson, se transformaron 2 µL en células competentes JM109 Single use, y se incubó en medio LB sólido con Kanamicina 50 mg/L. Además, se modificó la temperatura de crecimiento a 28 °C toda la noche. Se extrajo DNA plasmídico de las colonias (Birnboim, 1983) para su posterior análisis.

### **2.1.12. Ensayos de digestión con enzimas restricción**

Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia perteneciente a la clona infectiva pCBL224 (pDIVA::PMeV-Mx).

Las digestiones se realizaron con endonucleasas de restricción *Xba I* y *Sal I* de New England Biolabs, con CutSmart® Amortiguador en una reacción final de 15 µL para la digestión de 100 ng/µL de DNA plasmídico.

### **2.1.13. Verificación de la clona infectiva por PCR**

Se diseñaron los cebadores para la verificación de la clona infectiva por PCR de colonia y de DNA plasmídico, según lo sugerido por el manual de instrucciones de Gibson Assembly® Master Mix de New England Biolabs. Se diseñaron dos pares de cebadores con la herramienta Gene Construction Kit v. 4.5 y la temperatura de alineamiento con Tm Calculator v. 1.13.1 (Sección de resultados 3.2.2).

Los productos de PCR amplificados con dichos cebadores se corroboraron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8%, a 90V por 35 minutos, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para su observación.

### **2.1.14. Verificación de la clona infectiva por secuenciación de**

#### **Sanger**

Las clonas infectivas obtenidas 1 y 2 de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224), se secuenciaron en la empresa MACROGEN, los cebadores utilizados en la reacción fueron: CB21/CB187 y CB97. Su secuencia y posición respecto a la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx se mencionan en el apartado de Resultados 3.1.6.2. Cebadores para la verificación por PCR y 3.1.6.6 Secuenciación de las clonas infectivas. Adicionalmente se utilizó el cebador reverso CB97, que amplifica desde el nucleótido 4,669 de la clona infectiva. Y a partir del nucleótido 915, respecto al genoma de PMeV-Mx, hacia el extremo 5' del virus.

Una vez que se verificaron las clonas infectivas mediante los métodos descritos, se transfectaron a *A. tumefaciens*.

### 2.1.15. Transfección de las clonas infectivas a *A. tumefaciens*

Las clonas infectivas se transformaron con una concentración de 10 ng/ $\mu$ L de DNA de las clonas infectivas a *A. tumefaciens* cepa LBA4404. Complementariamente se realizó la transformación directa de una dilución 1:4 del ensamblaje de Gibson a *A. tumefaciens* según lo propuesto por (Tuo *et al.*, 2017).

Para todos los casos se siguió el protocolo de transformación por choque térmico de Sparkes, (2006), posteriormente se seleccionó una colonia por cada clona infectiva y se inoculó una en medio líquido YEB, que contiene estreptinomicina (100 mg/L) y rifampicina (50 mg/L) y antibiótico de selección Kanamicina (50 mg/L).

Se realizaron gliceroles al 30%, de las clonas transformadas con 700  $\mu$ L de cultivo y 300  $\mu$ L de glicerol, y se almacenaron a -80 °C.

### 2.1.16. Establecimiento de la agroinfiltración

Con el objetivo de estandarizar la agroinfiltración de la clona infectiva de PMeV-Mx, se agroinfiltraron hojas de plantas de *C. papaya* y *N. benthamiana* de cinco semanas de edad, con la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 transformada con el vector pCAMBIA 2200:GFP (García-Lynes *et al.*, datos no publicados) (Figura 13) mediante el protocolo mencionado con anterioridad (Norkunas *et al.*, 2018), se agroinocularon tres hojas basales por planta. Adicionalmente, se agroinocularon hojas de *N. benthamiana* y *C. papaya* con la bacteria sin transformar como control negativo. Las hojas agroinfiltradas se observaron transcurridos los tres días postinfiltración.

Para la construcción del cassette de expresión pCAMBIA2200:GFP, que lleva de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP S65T) que es una de las variantes diseñadas más utilizadas de la proteína fluorescente verde de tipo silvestre original, presenta una mutación en la posición 65 del aminoácido serina por una treonina y tiene un pico de excitación de 488 nm y de emisión de 507 nm. Su gen fue subclonado en el vector pAVA121 (Von Arnim *et al.*, 1998; García-Laynes, datos sin publicar) (Figura 14), esto permite visualizar la fluorescencia de la proteína en el tejido vegetal agroinfiltrado, en ensayos de expresión transitoria, mediante un estereomicroscopio Stemi DV4 (Carl Zeiss) que emite una longitud de onda de 200 nm, las muestras fueron observadas con objetivo 1.25X, que da un aumento de 10,0x a 40,0x.

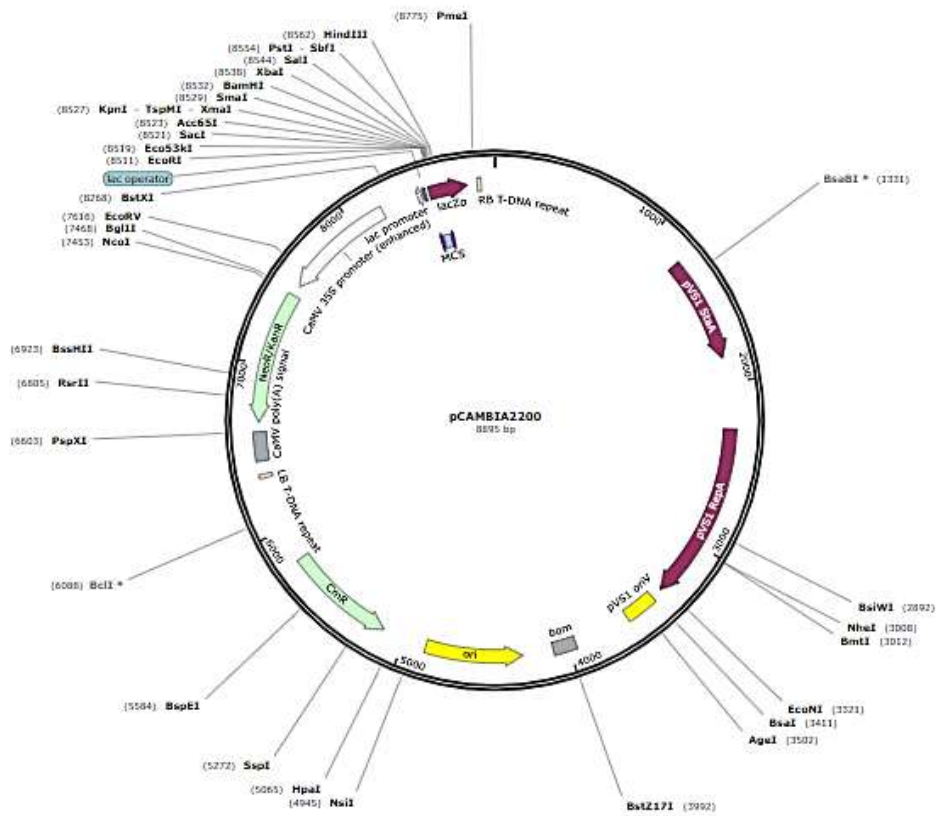


Figura 13 Mapa genético del vector pCAMBIA2200 (von Arnim *et al.*, 1998).

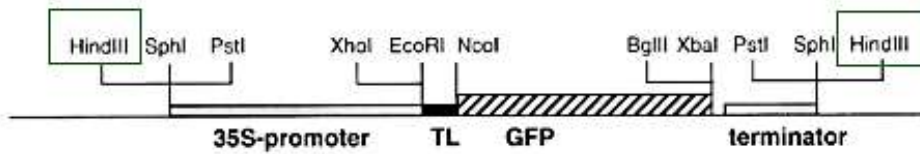


Figura 14 Cassette de expresión GFP (Von Arnim *et al.*, 1998; García-Laynes, datos sin publicar).

## 2.2. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL RNA LARGO NO CODIFICANTE DE PMeV-Mx.

### 2.2.1. Secuencia y estructura secundaria 3'OH de PMeV-Mx

Para el análisis de la secuencia y estructura secundaria del lncRNA se utilizó RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) que muestra la estructura secundaria óptima en notación entre corchetes (Formato Viena) basándose en la energía mínima libre y probabilidad de plegamiento. Complementariamente, se utilizó el programa RNA2Drawer versión en línea (<https://rna2drawer.app/>). Las estructuras generadas fueron analizadas, comparándolas con estructuras secundarias de virus cercanos a PMeV-Mx, virus similares a *Umbravirus* (*Umbravirus-like virus*) y *Tombusvirus*.

### 2.2.2. Análisis de la estructura secundaria del RNA largo no codificante de PMeV-Mx

Se realizó un análisis de la secuencia del lncRNA de PMeV-Mx utilizando el servidor web MFold v2.3 con la aplicación RNA Folding Form V2.3 (UNAFold web server) para identificar regiones con estructura secundaria en el lncRNA. Se identificó la región con mayor probabilidad de hibridación, para la mutagénesis *in silico*, dicha región fue seleccionada para la síntesis de la Mutante 1.

### 2.2.3. Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx

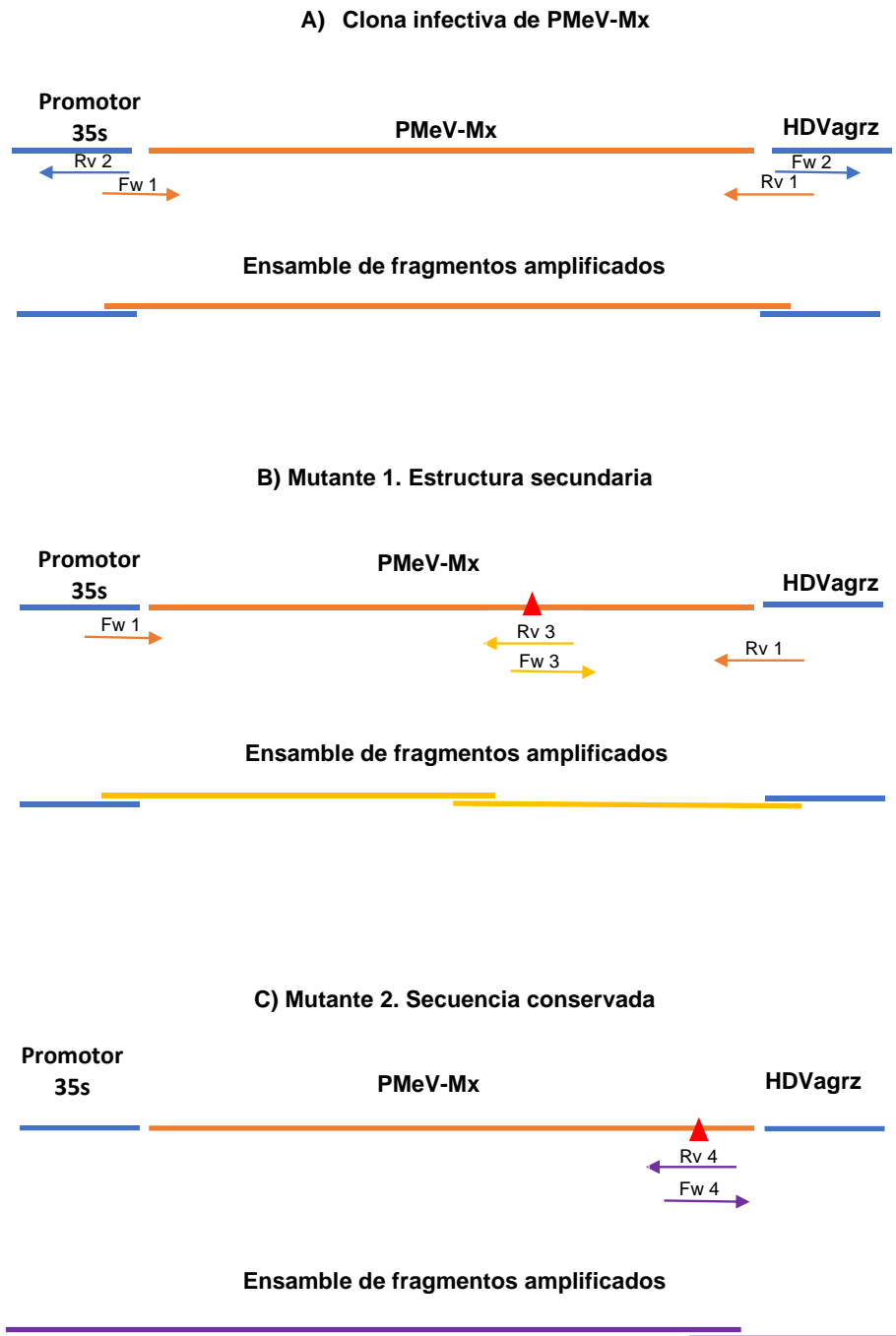
A pesar de la baja conservación de las secuencias primarias entre los lncRNA de virus similares a *Umbravirus*, se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica del lncRNA de PMeV-Mx, mediante un alineamiento múltiple de secuencias con el software BioEdit v. 7.2.5., en busca de regiones conservadas entre el lncRNA de PMeV-Mx y los lncRNA de los virus más cercanos a éste: Virus Q del babaco (Babaco virus Q, BabVQ) MT113181.1., Virus de la meleira de la papaya 2 (Papaya meleira virus 2 PMeV2) KT921785.1., Virus asociado a la vena amarilla de los cítricos (Citrus yellow-vein associated virus CyVaV) JX101610.1 y Virus A asociado a la fresa (Strawberry virus A StrVA) MK211275.1, para identificar regiones conservadas putativas que pudiesen tener una función. Dicha región se seleccionó para generar la mutante 2 del lncRNA.

## 2.3. DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL lncRNA

### 2.3.1. Estrategia para el diseño de cebadores para el Ensamble Gibson

A continuación, se muestra la estrategia utilizada para el ensamble de la clona infectiva pCBL224 (pDIVA::PMeV-Mx), y para la síntesis de las Mutante 1 y Mutante 2 (Figura 15), mediante el método de Gibson. Las secuencias 3' del promotor CaMV 35S y 5' de la ribozima HDV-agrz del vector pDIVA (Acc. No. KX665539) se muestran en azul, así como la secuencia completa del genoma de PMeV-MX en naranja, tanto para la clona infectiva de pDIVA::PMeV-Mx, como para la Mutante 1 y 2 (A), B) y C)). Las flechas indican las posiciones de los cebadores (PMeV-Mx: CB172 y CBx173, pDIVA: CB189 y CB188, Mutante 1: CB174 y CB175, y Mutante 2: CB176 y CB177). Y para cada caso, se muestra cómo se ensamblarán las secuencias una vez amplificadas (Anexo 1).





**Figura 15** Esquema para el diseño de cebadores para estrategia de ensamble de Gibson. A) Cebadores para Ensamblaje de pDIVA con PMeV-Mx. B) Cebadores para Ensamblaje de Mutante 1 ANRinc (Estructura secundaria). C) Cebadores para Mutante 2 IncRNA (Región conservada). Líneas azules. Promotor CaMV 35S y Ribozima (HDz). Líneas naranjas. Secuencia completa de PMeV-Mx. Triángulos rojos. Sitio aproximado de las mutantes. Mutante 1 (M1). Mutante 2 (M2). Flechas. Ubicación y dirección de los cebadores.

Los cebadores para el ensamble de Gibson de las mutantes 1 y 2, se diseñaron según lo sugerido por el manual de instrucciones de Gibson Assembly® Master Mix de New England Biolabs. Con la herramienta Gene Construction Kit v. 4.5 y la temperatura de alineamiento con Tm Calculator v. 1.13.1 (Sección de resultados 3.6.1.).

Los productos de PCR amplificados con la enzima de alta fidelidad Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) (New England Biolabs) con dichos cebadores se corroboraron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8%, a 90V por 35 minutos, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para su observación.

### **2.3.2. Verificación de las mutantes**

Para la verificación de las mutantes generadas se extrajo se siguió el flujo de trabajo aplicado anteriormente para la verificación de la clona infectiva pCBL224, el cual se basa en el respectivo ensayo con enzimas de restricción (*Xba I* (T<sup>^</sup>CTAGA) y *Sal I* (G<sup>^</sup>TCGAC)).

Complementariamente se realizó PCR de DNA plasmídico con los CB172 y CB173, con la enzima de alta fidelidad Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) (New England Biolabs). Los fragmentos amplificados tienen un tamaño de 4,378 pb y los cebadores CB21 posición y CB187 que amplifican un fragmento de 4,535 pb (Anexo 1).

### **2.3.3. Transfección de la Mutante 1 a *A. tumefaciens***

Se utilizó la cepa *A. tumefaciens* LBA4404, la cual se transformó con el DNA plasmídico de la Mutante 1 obtenida. Se transformó mediante el protocolo mencionado con anterioridad (Norkunas *et al.*, 2018). Se realizaron gliceroles al 30%, de la clona infectiva Mutante 1, transformada en *A. tumefaciens* con 700 µL de cultivo y 300 µL de glicerol, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## **2.4. MATERIAL VEGETAL**

Se germinaron plantas de *C. papaya* y *N. benthamiana* y se mantuvieron en cuarto de cultivo bajo de iluminación artificial con un ciclo de 16/8 hrs Luz-Oscuridad y con temperatura de 26-28 °C.

### **2.4.1. Germinación**

Las semillas de *N. benthamiana* y *C. papaya* se remojaron durante 1 hora y se seleccionaron las semillas que precipiten al fondo. Las semillas de *C. papaya* se sometieron a un tratamiento pregerminativo con  $\text{KNO}_3$  y ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), y posteriormente a un tratamiento germinativo en una cámara de germinación a condicionada de 30 a 35°C. Una vez germinadas las semillas para ambos casos se colocaron directo en sustrato, en proporción 3:1:1 (Sunshine Mix #3, vermiculita, perlita). En condiciones de 14 h de luz, 10 h de oscuridad hasta su germinación donde se transplantaron individualmente a macetas hasta su agroinfiltración. Se sembraron al menos 30 plantas de *N. benthamiana* y *C. papaya* consecutivamente en un lapso de 6 meses, con la finalidad de contar con material vegetal disponible para la agroinfiltración.

## CAPITULO III

## RESULTADOS

## 3.1. CONSTRUCCIÓN DE LA CLONA INFECTIVA pDIVA::PMeV-Mx

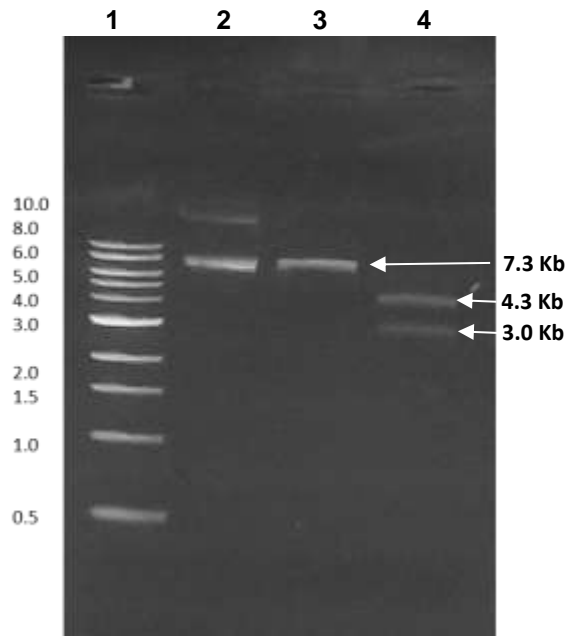
## 3.1.1. Secuencia de longitud completa de PMeV-Mx

El análisis *in silico* de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) arrojó que la enzima *Xba I* corta un solo sitio corriente abajo del promotor T7 y linealiza la clona, con un tamaño esperado de 7.3 Kb. Además, las enzimas *Nru I* y *Xba I* liberan la secuencia viral PMeV-Mx del vector pGEM-T Easy, los fragmentos liberados corresponden a 4.3 Kb y 3 Kb (Figura 16).



**Figura 16** Análisis *in silico* de enzimas de restricción de la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (Elaborado en ApE v3.1.1).

La primera digestión (100 ng/ $\mu$ L de DNA plasmídico) con la enzima *Xba I* (carril 3), y la doble digestión con las enzimas *Nru I* y *Xba I* (carril 4) se muestran en la Figura 17. El plásmido sin digerir y las reacciones de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 % en el orden antes señalado.



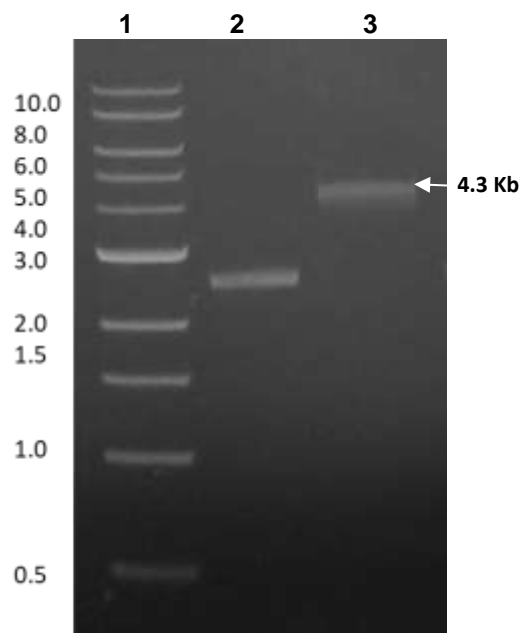
**Figura 17** Digestión de pGEM-T Easy::PMeV-Mx. **1.** Marcador de 1 Kb de NEBs. **2.** Plásmido sin digerir. **3.** Digestión con *Xba I*. **4.** Doble digestión *Xba I* y *Nru I*.

### 3.1.1. Vector pDIVA

El análisis *in silico* de la secuencia para el vector pDIVA muestra que la enzima *Xba I* corta un solo sitio en el nucleótido 3,324 corriente arriba del promotor CaMV 35S, linealizando la clona, con un tamaño esperado de 4.3 Kb (Figura 18). Esto se verificó mediante digestión (Figura 19).



**Figura 18** Vector pDIVA, indicando el sitio único de corte *Xba I* (Elaborado en ApE v3.1.1). (Elaborado en ApE v3.1.1).



**Figura 19** Digestión de pDIVA. 1. Marcador de 1 Kb de NEBs. 2. Plásmido sin digerir. 3. Digestión con *Xba I*.

### 3.1.2. Diseño de cebadores para el ensamble de la clona infectiva (GA)

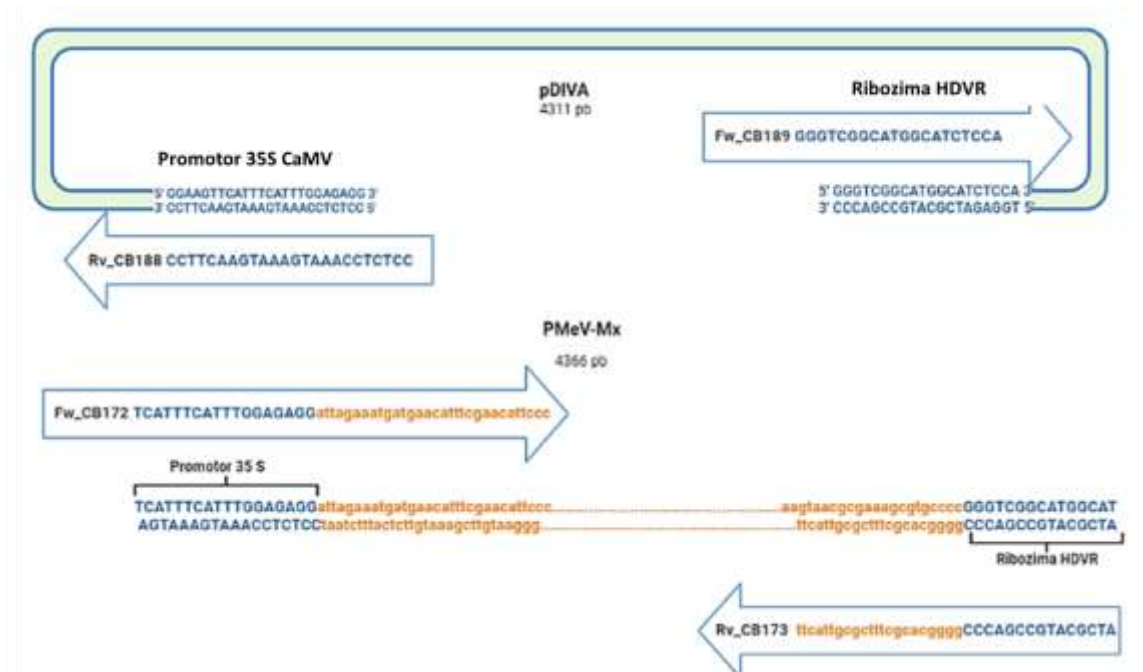
Se diseñaron los cebadores para la amplificación por PCR de las secuencias a ensamblar por el método de Gibson para la construcción de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224). El primer par de cebadores CB188 y CB189, con una  $T_m$  de 60° C amplifica la secuencia completa del vector pDIVA de 4,311 pb, para generar el vector abierto entre el extremo 3' del promotor CaMV35s y la ribozima. El segundo par de cebadores amplifica la secuencia de PMeV-Mx de 4,346 nt más secuencias complementarias a las secuencias de inserción en pDIVA, 18 nt en el cebador directo son complementarios al promotor CaMV 35S y 15 nt en el cebador reverso son complementarios a la Ribozima (HDV-agrz) de pDIVA, CB172 y CB173, respectivamente amplifican un fragmento de 4,378 pb con una  $T_m$  de 70 °C (Tabla 5).

**Tabla 5** Cebadores para el ensamble de Gibson

Cebadores para el ensamble de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)				
ID	No	Secuencia	Tamaño	Tm
pDIVA	CB189	5'GGGTCGGCATGGCATCTCCA3'	20nt	70 °C
	CB188	5'CCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC3'	25nt	
PMeV-Mx	CB172	5'tcatttcatttgagaggATTAGAAATGATGAACATTTTC	49nt	60 °C
	CB173	5'atgccatgccgacccGGGCACGCTTTCGCGTACTT	37nt	

**Nota.** En minúsculas se encuentran las secuencias que se sobrelapan al vector pDIVA.

La Figura 20 muestra la posición de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos, así como la longitud de los mismos, para el ensamble de la clona infectiva mediante el método de ensamble de Gibson.

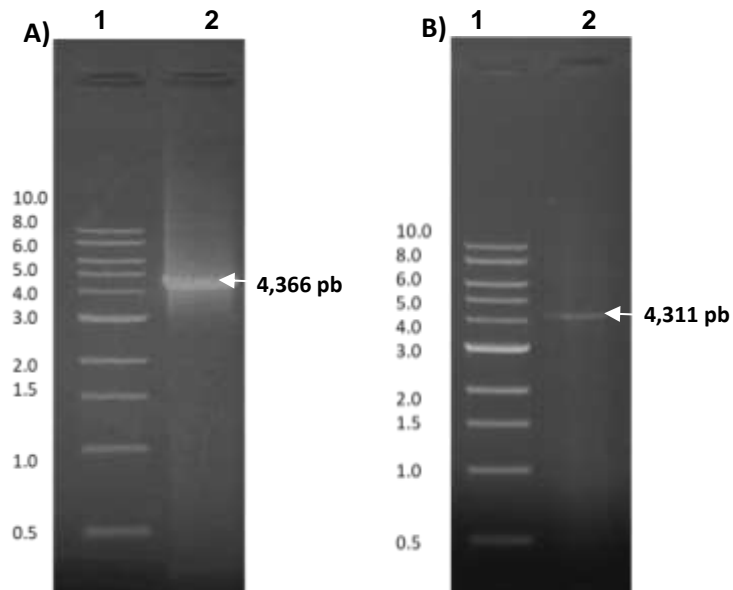


**Figura 20** Posición de los cebadores para la amplificación del vector pDIVA (CB188 y CB189) y de la longitud completa del genoma de PMeV-Mx (CB172 y CB173). En mayúsculas se indican las secuencias correspondientes a pDIVA y en minúsculas al genoma viral.

### 3.1.2. Ensamble de clona infectiva (GA)

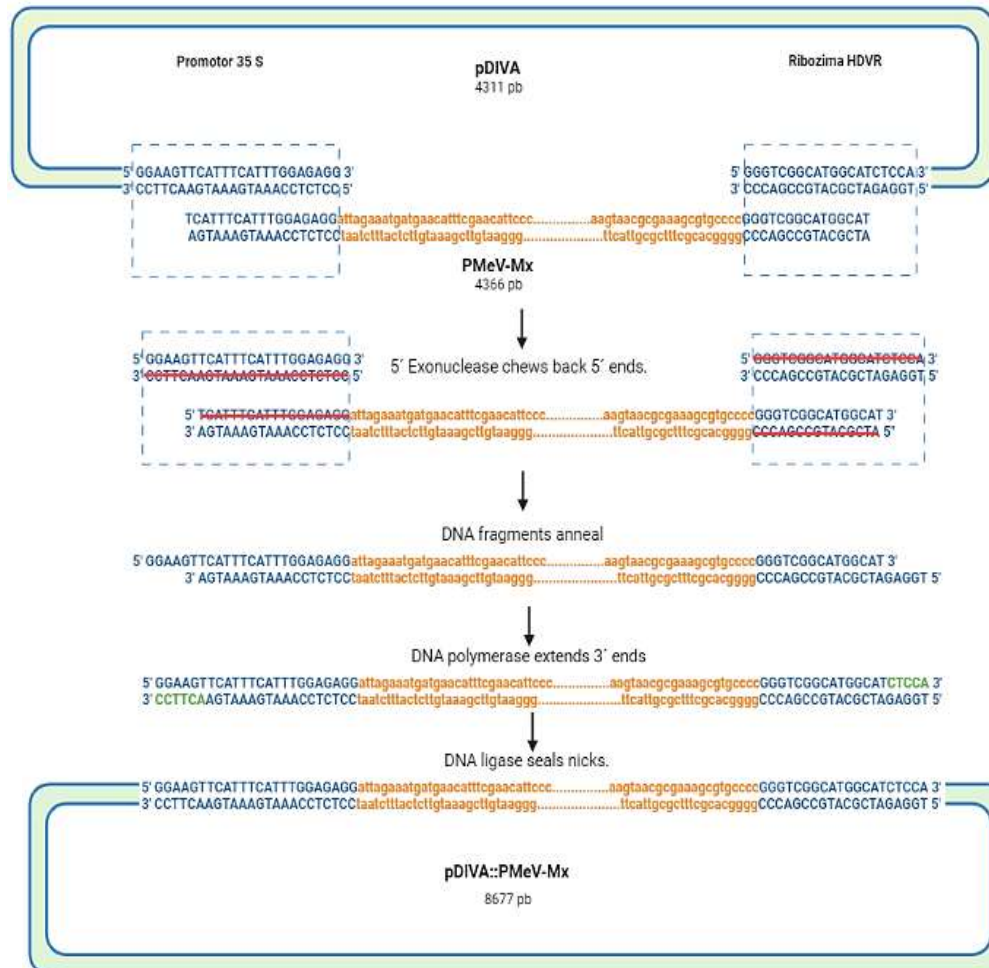
Para la obtención del genoma de PMeV-Mx flanqueado con secuencias del promotor CAMV35s y la Ribozima HDV-agrz (Figura 20), se hizo un PCR utilizando como templado la clona pGEM-T Easy::PMeV-Mx (pCBL227) y los cebadores CB172 y CB173 (Tabla 5). Para obtener el vector pDIVA linealizado entre el extremo 3' del promotor PCaM35s y la ribozima HDV-agrz, se hizo un PCR de pDIVA con los cebadores CB189 y CB188 (tabla 5). En la Figura 21, carril 2A y 2B, se muestran los amplicones obtenidos, ya purificados, de 4.37 y 4.31 Kb respectivamente, que corresponden a los tamaños

esperados. Posteriormente, ambos amplicones se ensamblaron *in vitro*, por el método de ensamblaje de Gibson (GA), la estrategia utilizada se muestra en la Figura 22, donde la clona infectiva (pCBL224) tiene un tamaño de 8,656 pb, en la Figura 23.

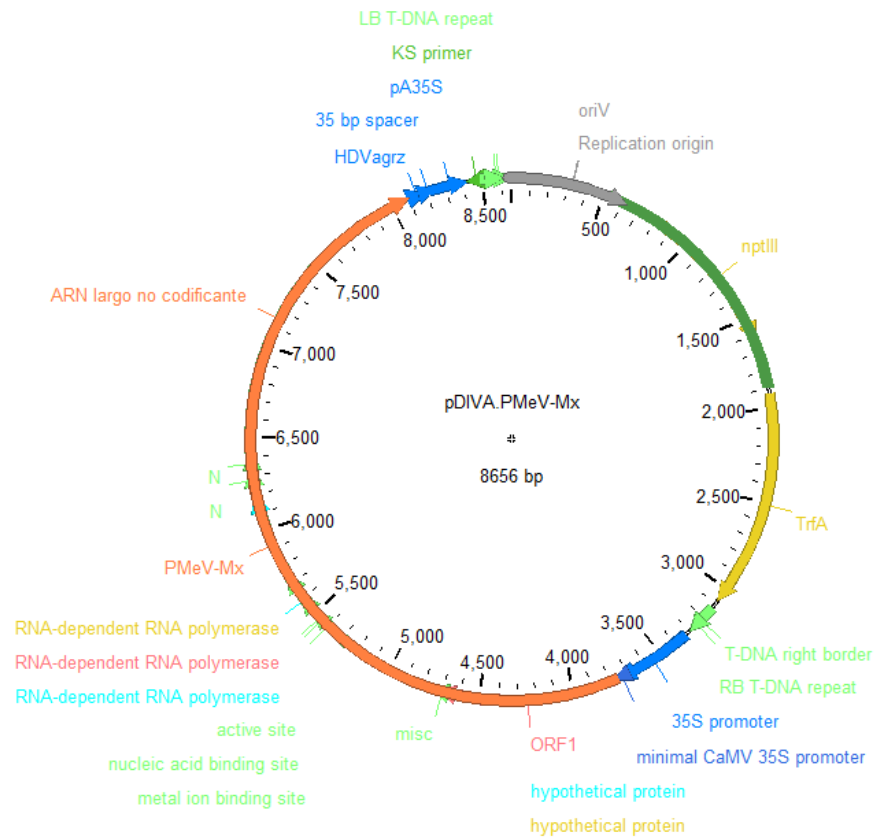


**Figura 21** Amplicones para el ensamble de Gibson. Carril 1, en A) y B), marcador de 1 Kb de NEBs. Carril 2, **A)** amplicón de PMeV-Mx con cebadores 172 y 173. **B)**, amplicón de pDIVA con cebadores 188 y 189. Gel de agarosa al 0.8%.



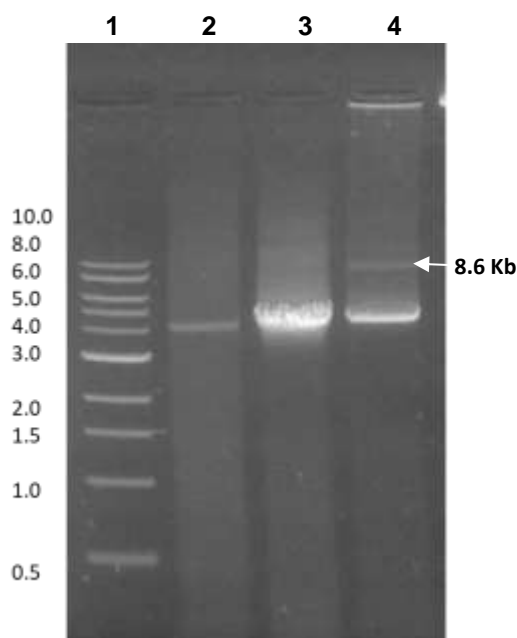


**Figura 22** Diagrama del ensamble de la clona infecciosa mediante método de Gibson. El genoma de PMeV-Mx se representa en letras minúsculas-naranjas. En azul y letras mayúsculas las regiones traslapadas del promotor CaMV35s y Ribozima de HRDV de los amplicones de pDIVA y genoma de PMeV-Mx.



**Figura 23** Mapa genético de la clona infecciosa pDIVA::PMeV-Mx, elaborado en ApE (v3.1.1).

Para verificar que la estrategia de ensamblado de Gibson *in vitro* hubiera funcionado bien, se tomaron 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción y se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 %. En el carril 4 de la figura 24 se observa una banda de 8.6 Kb, correspondiente al tamaño esperado para la clona infecciosa; en ese carril también se observa una banda de menor tamaño, de alrededor de 4.3 Kb, que corresponde con el tamaño de los amplicones no ensamblados de pDIVA y PMeV-Mx, que se corrieron en el mismo gel como testigos, (Figura 24, carriles 2 y 3).



**Figura 24** Resultado del ensamble *in vitro* de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx. 1. Marcador 1 Kb de NEBs. 2. pDIVA. 3. PMeV-Mx. 4. Ensamble de Gibson.

Una vez habiendo verificado que estaba ocurriendo el ensamblado *in vitro*, se purificó por gel el producto del ensamblado y se resuspendió en 50  $\mu$ L, de los cuales se tomaron 5  $\mu$ L para transformar células competentes de *E. coli* de las cepas XL blue y DH5 $\alpha$ . También se transformó con el producto de la reacción sin purificar. En ambos casos no se pudo observar el crecimiento de colonias positivas en las placas de Petri con medio LB selectivo. La toxicidad en *E. coli* se ha reportado previamente para algunos genomas de virus de plantas durante la construcción de clonas infectivas (Ouillet *et al.*, 1989; Fakhfakh *et al.*, 1996; citado por (Klenov & Hudak, 2021). Para reducir la toxicidad y obtener colonias positivas, se emplearon varias estrategias: a) utilizar una menor cantidad de la reacción de ensamblado de Gibson, b) reducir la temperatura de incubación de 37  $^{\circ}$ C a 28  $^{\circ}$ C, utilizar una cepas de *E. coli* de alta eficiencia o bien cepas de *E. coli* tolerantes a la toxicidad y d) realizar la transformación directa del producto de ensamblado de Gibson en *Agrobacterium tumefaciens*, sin pasar por una selección previa en *E. coli* (Tuo *et al.*, 2017).

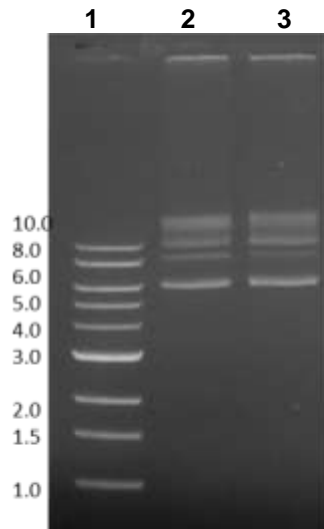
En cuanto a la transformación del ensamblado purificado y no purificado en células competentes de *E. coli* de las cepas XL blue y DH5 $\alpha$ , se obtuvieron un gran número de

colonias que crecieron en las placas medio de selección con Kanamicina. Se picaron al menos 10 colonias, para cada caso y se cultivaron en medio líquido suplementado con Kanamicina; el crecimiento en medio líquido fue normal para el total de las colonias analizadas. Sin embargo, para ninguno de los cultivos se logró obtener ADN plasmídico, ya sea mediante el método de extracción de lisis alcalina o el método de extracción por el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), lo que puede ser un indicativo de toxicidad de la secuencia viral en las cepas de *E. coli*.

Finalmente, como resultado de la transformación de 2  $\mu$ L una dilución 1:4 de la reacción de ensamblaje de Gibson, en células competentes Single-Use JM109 (Promega Corporation), que fueron incubadas a 28 °C durante 3 días se obtuvieron dos colonias, 1 y 2, las cuales se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción y mediante PCR en colonia.

### **3.1.3. Extracción de DNA plasmídico**

Para verificar si las colonias obtenidas contenían el plásmido se crecieron por toda la noche las colonias 1 y 2 en medio LB líquido suplementado con Kanamicina (Km) y se incubaron a 28 °C. En este punto, se observaron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento, la colonia 1 mostró un crecimiento más lento respecto a la colonia 2. Se logró extraer DNA plasmídico por el método de lisis alcalina, observándose bandas de 6, 8, 10 y 12 Kb, donde las bandas de 6 y 8 kb corresponden a DNA de plásmido y las bandas mayores de 10 y 12 Kb a DNA cromosómico (Figura 25). La obtención de DNA cromosómico fue consistente en estas colonias, a pesar de haberse repetido la extracción en distintas ocasiones, el cual no se obtuvo utilizando colonias transformadas únicamente con el vector pDIVA (datos no mostrados). Lo anterior es otro indicativo de que las células de *E. coli* estaban bajo condiciones de toxicidad.



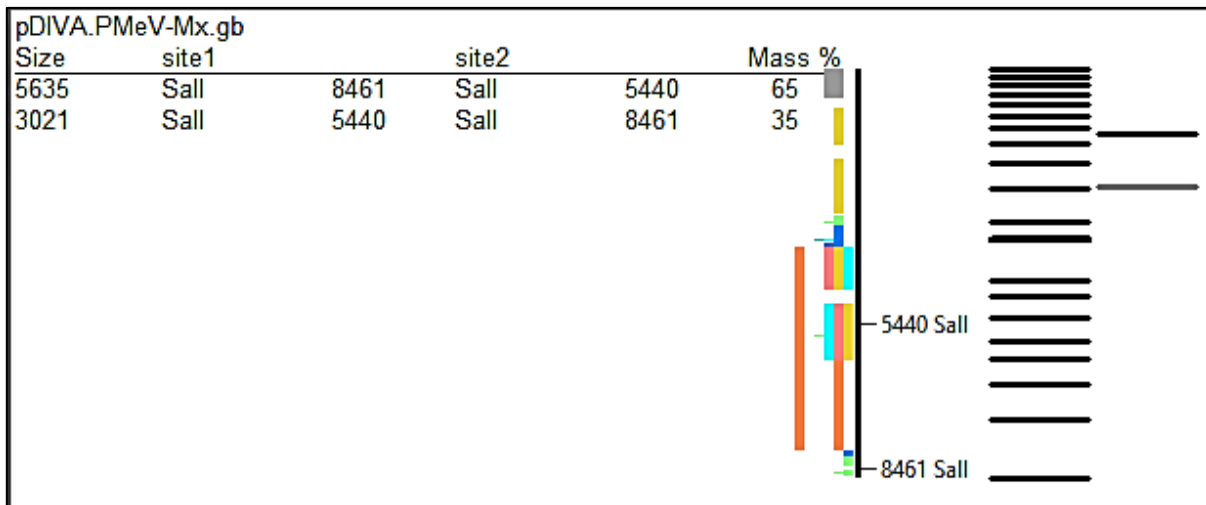
**Figura 25** ADN plasmídico sin digerir de dos colonias de la clona infectiva pCBL224. **1.** Marcador de 1 Kb de NEBs., **2.** Colonia 1., **3.** Colonia 2.

### 3.2. Verificación de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx

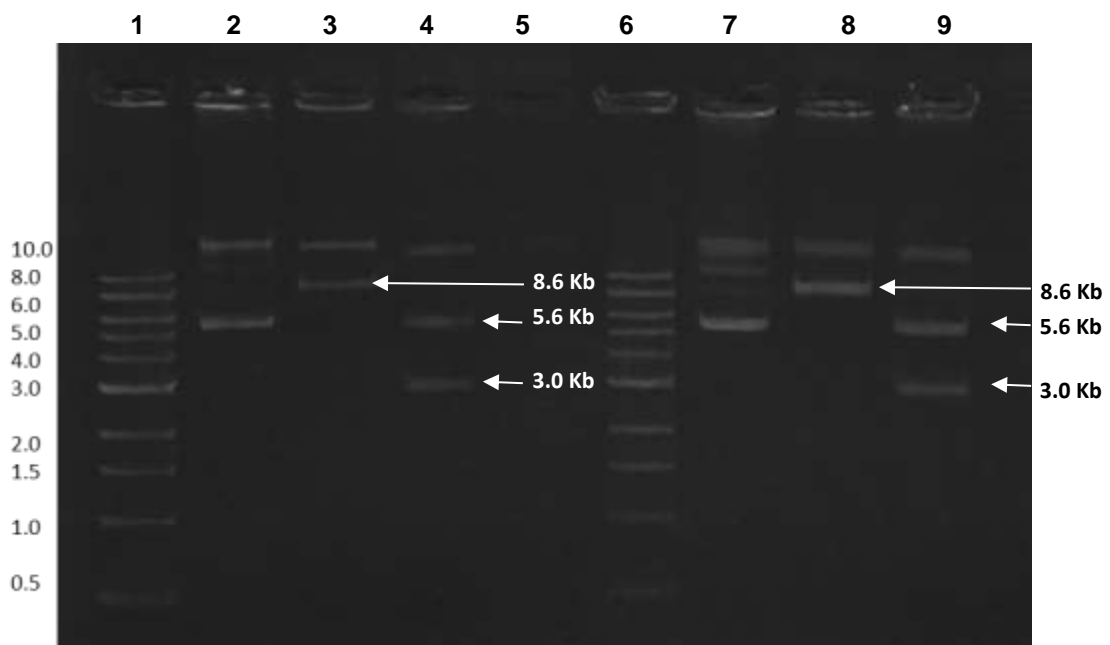
Se emplearon tres estrategias para determinar la correcta inserción del genoma de PMeV-Mx en pDIVA: 1) Digestión con enzimas de restricción, 2) PCR en colonia y 3) secuenciación de las uniones en los extremos del genoma con el vector.

#### 3.2.1. Verificación de digestión con enzimas de restricción

Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224), para identificar enzimas de restricción que cortaran una o más veces el plásmido, encontrándose que *Xba I* corta una vez en el nucleótido 3,324, linealizando, mientras que la enzima *Sal I* corta dos veces liberando dos bandas de 3 Kb y 5.6 Kb respectivamente (Figura 26). Como se muestra en la figura 27, la digestión de plásmido de las colonias 1 y 2 con *Xba I* y *Sal I*, produjo las bandas del tamaño esperado, indicando que ambas contenían el genoma completo de PMeV-Mx.



**Figura 26** Análisis in silico de digestión de la clona infectiva con *Sal* I (Elaborado en ApE v3.1.1). A la izquierda se muestran los dos sitios de corte y su posición, a la derecha un gel in silico.



**Figura 27** Digestión con enzimas de restricción. Marcador de 1 Kb de NEBs. **1 y 6** Colonia 1 y colonia 2., **2 al 4 y 7 al 9** respectivamente. **2 y 7** Plásmidos sin digerir., **3 y 8** Digestión con *Xba* I, **4 y 9** Digestión con *Sal* I.

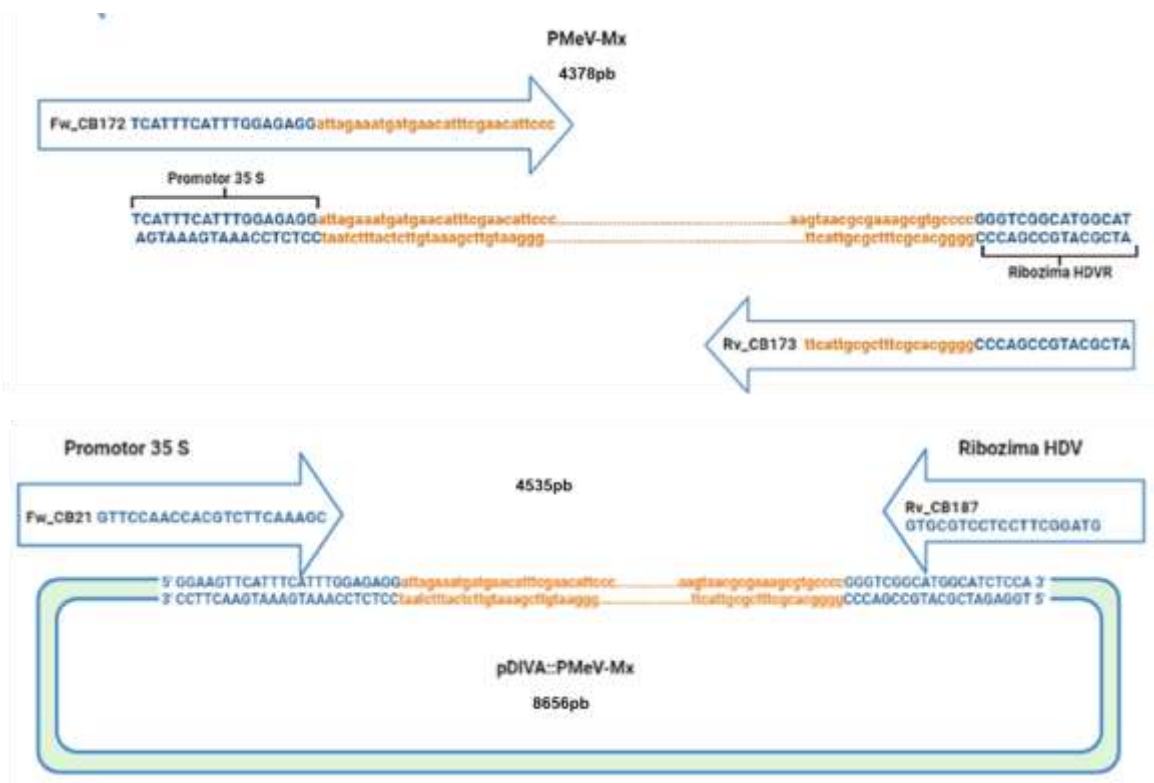
### 3.2.2. Cebadores para la verificación por PCR

Para comprobar el ensamble de la clona infectiva pCBL224 por PCR, se utilizó el previamente diseñado par de cebadores CB172 y CB173. Se diseñó un nuevo par de cebadores dirigidos contra el promotor CaMV 35S y a la ribozima HDV-agrz de pDIVA, respectivamente (CB21 y CB187) (Tabla 6) que amplifican un fragmento de 4,535 pb en el vector vacío y uno de 8,677 en la clona infectiva (Figura 28).

**Tabla 6** Cebadores para la verificación del ensamble de la clona infectiva pCBL224.

Cebadores para la verificación de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)				
ID	No.	Secuencia	Tamaño	Tm
1.	CB21	5'GTTCCAACCACGTCTTCAAAGC3'	22 nt	68 °C
	CB187	5'GTGCGTCCTCCTTCGGATG3'	19 nt	
2.	CB172	5'tcatttcatttggagaggATTAGAAATGATGAACATTTT CGAACAT TCCC3'	40 nt	70 °C
	CB173	5'atgcatgcccgacccGGGGCAGCTTTCGCGT TACTT3'	37 nt	

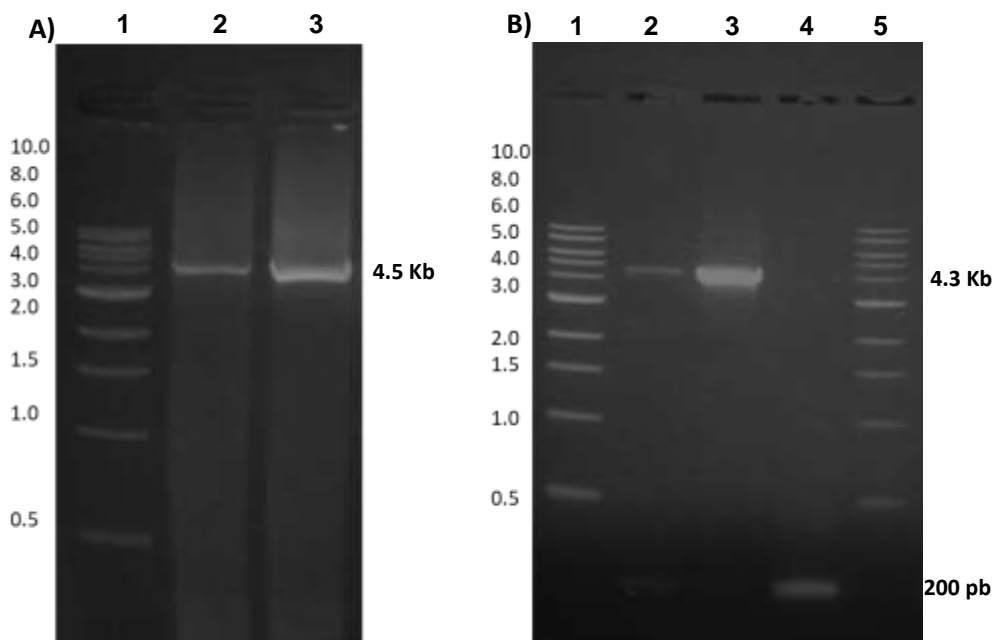
**Nota.** En minúsculas se encuentran las secuencias que se sobrelapan al vector pDIVA.



**Figura 28** Posición y tamaño de amplificación de los cebadores CB172/CB173 y CB21/CB187.

### 3.2.3. Verificación por PCR de colonia

Los resultados del PCR de las colonias 1 y 2 se muestran en la Figura 29, en los paneles A y B, con el primer y segundo par de cebadores, CB21/CB187 y CB172/CB173, respectivamente, que produjeron amplicones de 4.3 Kb y 4.5 Kb en ambas colonias, indicando que contienen el genoma de PMeV-Mx en pDIVA. Como control se utilizó el vector pDIVA vacío, el cual produjo un amplicón de 200 pb con los cebadores CB21/CB187 (B) carril 3).



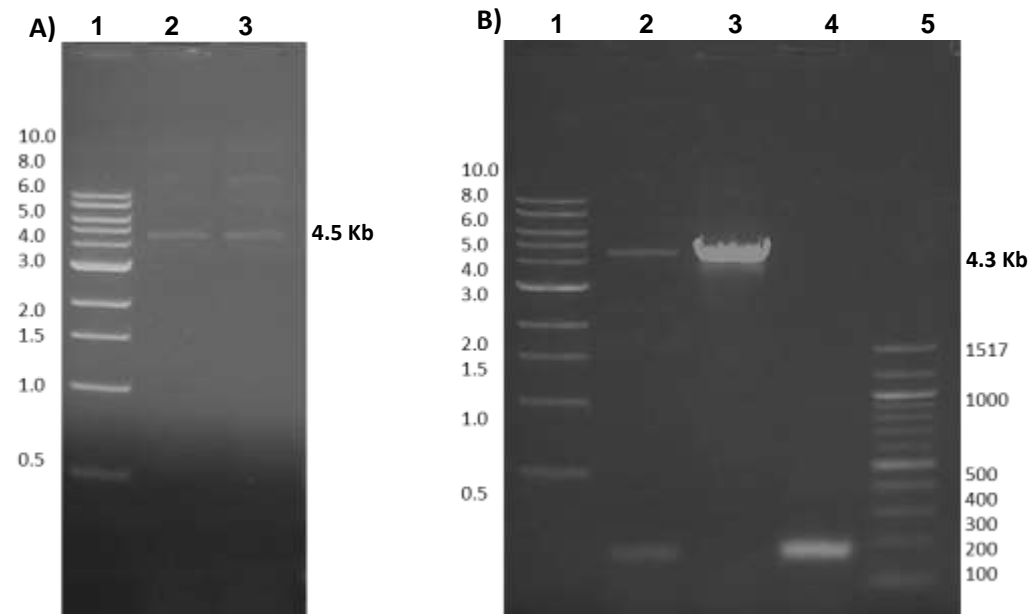
**Figura 29** Verificación de las clonas por PCR de colonia. Panel **A)** con cebadores CB21/187, Panel **B)** con cebadores PCR CB172/173. **1.** Marcador de 1 Kb de NEBs., **2.** Colonia 1., **3.** Colonia 2., **4.** pDIVA. **5.** Marcador de 1 Kb de NEBs.

### 3.2.4. Verificación por PCR de DNA plasmídico

Una vez extraído el DNA plasmídico de las colonias 1 y 2, se utilizó como templado para su amplificación por PCR con los cebadores de CB172/CB173 y CB21/CB187. La Figura 30 muestra los amplicones esperados de 4.3 Kb (A) y 4.5 Kb (B). En panel B, carril 3, se utilizó como control un amplicón de 200 pb del vector pDIVA vacío



con los cebadores CB21/CB187, que funciona como se esperaba. De manera interesante se observa para la colonia 1, con los cebadores para pDIVA (panel B), además de la banda de 4.3 Kb, una banda de 200 pb, lo cual sugiere que algunas de las bacterias de la colonia 1, tenían el plásmido vacío pDIVA.



**Figura 30** Verificación de las clonas por PCR de ADN plasmídico. **A)** cebadores CB21/187., **B)** cebadores CB172/173. **1.** Marcador 1 Kb NEBs. **2.** Colonia 1., **3.** Colonia 2., **4.** pDIVA., **5.** Marcador de 100 pb marcador de NEBs.

### 3.3. Secuenciación de las clonas infectivas.

Habiendo verificado la presencia de la inserción del genoma de PMeV-Mx en el vector pDIVA de las dos colonias, se llevó a cabo la secuenciación con los cebadores CB21 dirigido al promotor CaMV35S y cebador CB187 a la Ribozima de la clona infectiva pCBL224.

#### 3.3.1. Clona 1.

Se secuenció la Clona 1 con el cebador directo CB21 que se encuentra dirigido al promotor CaMV 35S de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224) en la posición 3,616, corriente arriba del extremo 5' de PMeV-Mx, el tamaño resultante fue una secuencia de 1,177 nt de longitud. El alineamiento de pares CLUSTALW de la secuencia Clona1\_CB21, con la secuencia de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx, arrojó una cobertura que parte desde el nucleótido 3,672 hasta el nucleótido 4,847, con un porcentaje de identidad de 99.82 %. La Figura 31 muestra el lineamiento de pares para ambas secuencias. En color azul se señala la cobertura del promotor CaMV 35S y en naranja 1,092 nucleótidos correspondientes a la secuencia completa del ORF1, y parte de la secuencia no codificante entre el ORF1 y ORF2 de PMeV-Mx.

Adicionalmente se secuenció la Clona 1 con el cebador reverso CB187, dirigido a la Ribozima HDV-agrz de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx, en la posición 8,142 nt. La longitud de la secuencia obtenida es de 1,207 nt, la cual se alinea desde el nucleótido 6,821, hasta el nucleótido 8,111 de pDIVA::PMeV-Mx. Abarcando parte la ribozima HDV-agrz del vector pDIVA, y corriente arriba del extremo 3' de PMeV-Mx, abarcando parte del RNA largo no codificante. El porcentaje de identidad (ID) entre ambas secuencias es de 99.84 % (Figura 32).

Clona1_CB21	-----CTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTC	49
pDIVA::PMeV-Mx	TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTC	3720
Clona1_CB21	CTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTTGAACA	109
pDIVA::PMeV-Mx	CTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTTGAACA	3780
Clona1_CB21	TTCCCGTGGGACGTCTCACCTCCCATGCCGTTTTAATTTGTTGAAGCTGGCAAGCAAGC	169
pDIVA::PMeV-Mx	TTCCCGTGGGACGTCTCACCTCCCATGCCGTTTTAATTTGTTGAAGCTGGCAAGCAAGC	3840
Clona1_CB21	TTGGAAAGCAAAATCCTCCTTCCAAGTTTGC GG GTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAGT	229
pDIVA::PMeV-Mx	TTGGAAAGCAAAATCCTCCTTCCAAGTTTGC GG GTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAGT	3900
Clona1_CB21	CTGGCACCTCACACGGTGGGCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAGT	289
pDIVA::PMeV-Mx	CTGGCACCTCACACGGTGGGCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAGT	3960
Clona1_CB21	TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTTGAGAAACATAGGTCACATGCAAATG	349
pDIVA::PMeV-Mx	TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTTGAGAAACATAGGTCACATGCAAATG	4020
Clona1_CB21	CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCGG	409
pDIVA::PMeV-Mx	CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCGG	4080
Clona1_CB21	AAGCTCTGTCATCTCAATCGCAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCTG	469
pDIVA::PMeV-Mx	AAGCTCTGTCATCTCAATCGCAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCTG	4140
Clona1_CB21	TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTAGGGCGAAGCCA	529
pDIVA::PMeV-Mx	TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTAGGGCGAAGCCA	4200
Clona1_CB21	GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGGTTAGGAGCTTGGTTGGGGAAAGGATGGCTG	589
pDIVA::PMeV-Mx	GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGGTTAGGAGCTTGGTTGGGGAAAGGATGGCTG	4260
Clona1_CB21	AGGAAGCCACTCGAATCGCTTCCGACGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCCG	649
pDIVA::PMeV-Mx	AGGAAGCCACTCGAATCGCTTCCGACGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCCG	4320
Clona1_CB21	ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCCG	709
pDIVA::PMeV-Mx	ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCCG	4380
Clona1_CB21	GGTTAGGGGAGGAACTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTCGAGAGG	769
pDIVA::PMeV-Mx	GGTTAGGGGAGGAACTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTCGAGAGG	4440
Clona1_CB21	AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGGA	829
pDIVA::PMeV-Mx	AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGGA	4500
Clona1_CB21	AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGTCTGCGCGGGCATTTTGGCCTACGCG	889
pDIVA::PMeV-Mx	AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGTCTGCGCGGGCATTTTGGCCTACGCG	4560
Clona1_CB21	CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCTG	949
pDIVA::PMeV-Mx	CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCTG	4620
Clona1_CB21	GACTGGACGCATCCCTTGCTGTCTGCTAGCGGTGAAACTCTGGCTTACGCCAACCATTA	1009
pDIVA::PMeV-Mx	GACTGGACGCATCCCTTGCTGTCTGCTAGCGGTGAAACTCTGGCTTACGCCAACCATTA	4680
Clona1_CB21	AGGACGAGGCAATCTCCCTGTTTCTGCTTTTTCTGGTTGGCCCGTAAGTACGTTTCCAGG	1069
pDIVA::PMeV-Mx	AGGACGAGGCAATCTCCCTGTTTCTGCTTTTTCTGGTTGGCCCGTAAGTACGTTTCCAGG	4740
Clona1_CB21	TGTGTCCCGTAGTTTTCGCGGTTCCAGCGGGCGCACCTATAAAGAAACTGCGTGGGGTTCT	1129
pDIVA::PMeV-Mx	TGTGTCCCGTAGTTTTCGCGGTTCCAGCGGGCGCACCTATAAAGAAACTGCGTGGGGTTCT	4800
Clona1_CB21	TACGGGGCCCTAAAGTCCGGGAGAGTACGTCCATCTACCCTAAGGTGG-----	1177
pDIVA::PMeV-Mx	TACGGGC-CCTAAAGTCCGGGAGAGTACGTCCATCTACCCTAAGGTGGTTGGCGGCTTGT	4859

**Figura 31** Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 1 con el cebador CB21.

pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	CGAACTCTTTGAGAGGCTTAAATTGGTTCCGCCGATGGCTTCCATTGGGATTACTAGGTG -----TCTTTGAGAGGCTTAAATTGGTTCCGCCGATGGCTTCCATTGGGATTACTAGGTG	6960 55
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	GCTACTGTGTATCGTTAGGGCGACCTTTTGATACCTGTACCGTCAAGTAGTTTCTTTGGT GCTACTGTGTATCGTTAGGGCGACCTTTTGATACCTGTACCGTCAAGTAGTTTCTTTGGT	7020 115
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TCCATGTCTGGTTGGTTTCCAGCCAATTAGAGGGCTAGATTCCGGCTCGACTATGGTTCCG TTCCATGTCTGGTTGGTTTCCAGCCAATTAGAGGGCTAGATTCCGGCTCGACTATGGTTCCG	7080 175
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TCAATTGGCTTGCAAGATAGGGTGGTTTGCATTA AAAACAGTTGGTATGATTCAGTAGAGT TCAATTGGCTTGCAAGATAGGGTGGTCTGCATTA AAAACAGTTGGTATGATTCAGTAGAGT	7140 235
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TATTGAAAGCTGTTTATGCGTGAAC TATTTAATTAACCTGTGCCTGGATGTA AATGCC TATTGAAAGCTGTTTATGCGTGAAC TATTTAATTAACCTGTGCCTGGATGTA AATGCC	7200 295
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	AGGAACTTCAACCCACAGCTATTTAACAACCCCTCTTGTCTGGTATTTAGTCGGGCGCT AGGAACTTCAACCCACAGCTATTTAACAACCCCTCTTGTCTGGTATTTAGTCGGGCGCT	7260 355
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TATTGACTGCTCTATTTGGAGTGAGT CACCCGGCACATTATTGAACAGACATTGGGGGCT TATTGACTGCTCTATTTGGAGTGAGT CACCCGGCACATTATTGAACAGACATTGGGGGCT	7320 415
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	CTGGCTAGTCGGGAAGATGGTTTGGATCAGAGACGCTCAGCCATTTGGATGGGCGGTTTG CTGGCTAGTCGGGAAGATGGTTTGGATCAGAGACGCTCAGCCATTTGGATGGGCGGTTTG	7380 475
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	CTATTGACCTCGGTATTTAGTCTCGACATAGGGCTTGATAAGCGTATTTTCAGTCGTAGG CTATTGACCTCGGTATTTAGTCTCGACATAGGGCTTGATAAGCGTATTTTCAGTCGTAGG	7440 535
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TATCTCCAGAGGTTCTGCAGTTGGCAGGCTCCATGTTAGAGCACCTATGGAACAGCCGA TATCTCCAGAGGTTCTGCAGTTGGCAGGCTCCATGTTAGAGCACCTATGGAACAGCCGA	7500 595
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	AAGCTGGGGACGGAAGGGTATATTTTATGGGAGTCTGCACACCTTCTTCTGTGGAAGTGG AAGCTGGGGACGGAAGGGTATATTTTATGGGAGTCTGCACACCTTCTTCTGTGGAAGTGG	7560 655
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TCCTGATAAAAATAACCCATTAACCACATGGGCTAAGGCCTGAGATGTAACGGGTTTTGG TCCTGATAAAAATAACCCATTAACCACATGGGCTAAGGCCTGAGATGTAACGGGTTTTGG	7620 715
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	GCTGACTGGCAAAGTGCTATTGGTGGGCTTGGTTGCGGCTCATATGCATGTGTGCTACTC GCTGACTGGCAAAGTGCTATTGGTGGGCTTGGTTGCGGCTCATATGCATGTGTGCTACTC	7680 775
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TCCAAATTGGGTCTCACCCCGAGGTTGGGGCTTGGGCGCTATTGTGTGTGTGCGTAACTT TCCAAATTGGGTCTCACCCCGAGGTTGGGGCTTGGGCGCTATTGTGTGTGTGCGTAACTT	7740 835
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	CTAATAGTTCTGTGGTTTGTAGCTCGCTGTGGATCATTGGTACGCATTTGTGGACTATCTG CTAATAGTTCTGTGGTTTGTAGCTCGCTGTGGATCATTGGTACGCATTTGTGGACTATCTG	7800 895
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	ATACGCGGGGCTAGATTTTCAGTTCTACAACGGAGCCAGCTAAGTTTTGCCAGGCAAGGGC ATACGCGGGGCTAGATTTTCAGTTCTACAACGGAGCCAGCTAAGTTTTGCCAGGCAAGGGC	7860 955
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TACGTTAGGCATCTGGAGTTCGGCTGTGGTCCAGATCCGGAACGCGGGTGATATTGGCTG TACGTTAGGCATCTGGAGTTCGGCTGTGGTCCAGATCCGGAACGCGGGTGATATTGGCTG	7920 1015
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	TGGATTGGCTATTGTGATACGCGCTCTATTACTGCTGTGGTCCGCTTCTTGAACGCGG TGGATTGGCTATTGTGATACGCGCTCTATTACTGCTGTGGTCCGCTTCTTGAACGCGG	7980 1075
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	GTTCTATTATGGTGTGGTTTGTAGAAAGCCGCTCACTAAACACGTAGTTTGTAGCCCTCGGGG GTTCTATTATGGTGTGGTTTGTAGAAAGCCGCTCACTAAACACGTAGTTTGTAGCCCTCGGGG	8040 1135
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	GGGGGACATAATACTCTCGAGTTTAAATTTGCTTGCAAAAAGTAACGCGAAAAGCGTGCCCG GGGGGACATAATACTCTAGAGTTTAAATTTGCTTGCAAAAAGTAACGCGAAAAGCGTGCCCG	8100 1195
pDIVA: :PMeV-Mx Clona1_CB187	GGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCAC GGTCGGCATGG-----	8160 1207

**Figura 32** Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona1 con el cebador CB187.

### 3.3.2. Clona 2.

La secuenciación de la Clona 2 con el cebador directo CB21 (Clona2\_CB21), dio como resultado una secuencia de 1,133 nt de longitud, la cual se alineó con la secuencia de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224), con una cobertura que parte desde el nucleótido 3,664 hasta el nucleótido 4,796, con un porcentaje de identidad de 99.80 %. La Figura 33 muestra el lineamiento de pares para ambas secuencias.

Para secuenciación de la Clona 2 con el cebador reverso CB97 (Clona2\_CB97), en la posición de 915 nt de PMeV-Mx, resultó una secuencia de 1,221 nt de longitud. La Figura 34 muestra el alineamiento de secuencias por pares de la Clona2\_CB97 contra la secuencia de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx.

El porcentaje de identidad (ID) entre ambas secuencias es de 100 %, la secuencia de la Clona2\_CB97 se alinea con parte de la secuencia del promotor CaMV 35S de pDIVA::PMeV-Mx desde el nucleótido 3,400, y cubre 866 nt de la secuencia del ORF1 de PMeV-Mx, terminando en el nucleótido 4,620 de pDIVA::PMeV-Mx.

Clona2 CB21	----TATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACC	50
pDIVA::PMeV-Mx	TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTT	3720
Clona2 CB21	CTCTATATAAGGAAGTTTCATTTTCAATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTTGAAC	117
pDIVA::PMeV-Mx	CTCTATATAAGGAAGTTTCATTTTCAATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTTGAAC	3780
Clona2 CB21	TTCCCGTGGGACGTCTCACCTCCCATGCCGGTTTTAATTTGTTGAAGCTGGCAAGCAAG	177
pDIVA::PMeV-Mx	TTCCCGTGGGACGTCTCACCTCCCATGCCGGTTTTAATTTGTTGAAGCTGGCAAGCAAG	3840
Clona2 CB21	TTGGAAAGCAAATCCTCCTTCCAAGTTTTCGCGGTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAG	237
pDIVA::PMeV-Mx	TTGGAAAGCAAATCCTCCTTCCAAGTTTTCGCGGTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAG	3900
Clona2 CB21	CTGGCACCTCACACGGTGGGCCCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAG	297
pDIVA::PMeV-Mx	CTGGCACCTCACACGGTGGGCCCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAG	3960
Clona2 CB21	TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTGAGAAACATAGGTCACATGCAAT	357
pDIVA::PMeV-Mx	TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTGAGAAACATAGGTCACATGCAAT	4020
Clona2 CB21	CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCGAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCG	417
pDIVA::PMeV-Mx	CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCGAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCG	4080
Clona2 CB21	AAGCTCTGTCTCAATCGCAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCT	477
pDIVA::PMeV-Mx	AAGCTCTGTCTCAATCGCAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCT	4140
Clona2 CB21	TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTTTCAGGCGCAAGCC	537
pDIVA::PMeV-Mx	TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTTTCAGGCGCAAGCC	4200
Clona2 CB21	GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGGTTAGGAGCTTGGTTGGGAAAAGGATGGCT	597
pDIVA::PMeV-Mx	GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGGTTAGGAGCTTGGTTGGGAAAAGGATGGCT	4260
Clona2 CB21	AGGAAGCCACTCGAATCGCTTCCGCGAGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCC	657
pDIVA::PMeV-Mx	AGGAAGCCACTCGAATCGCTTCCGCGAGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCC	4320
Clona2 CB21	ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCC	717
pDIVA::PMeV-Mx	ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCC	4380
Clona2 CB21	GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTCGAGAG	777
pDIVA::PMeV-Mx	GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTCGAGAG	4440
Clona2 CB21	AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGG	837
pDIVA::PMeV-Mx	AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGG	4500
Clona2 CB21	AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGTCTGCGCGGGCATTGTTGGCCTACGC	897
pDIVA::PMeV-Mx	AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGTCTGCGCGGGCATTGTTGGCCTACGC	4560
Clona2 CB21	CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCT	957
pDIVA::PMeV-Mx	CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCT	4620
Clona2 CB21	GACTGGACGCATCCCTTGCTGTCTGCGTAGCGGTGAAACTCTGGCTTACGCCAACCATT	1017
pDIVA::PMeV-Mx	GACTGGACGCATCCCTTGCTGTCTGCGTAGCGGTGAAACTCTGGCTTACGCCAACCATT	4680
Clona2 CB21	AGGACGAGGCAATCTCCCTGTTTCGTCCTTTTCTGGTTGGCCCGTAAGTACGTTTCCAG	1077
pDIVA::PMeV-Mx	AGGACGAGGCAATCTCCCTGTTTCGTCCTTTTCTGGTTGGCCCGTAAGTACGTTTCCAG	4740
Clona2 CB21	TGTGTCCCGTAGTTTCGCGGTTCCAGCGGGCGCACCTATAAAGAAACTGGCTGGGG---	1133
pDIVA::PMeV-Mx	TGTGTCCCGTAGTTTCGCGGTTCCAGCGGGCGCACCTATAAAGAAACTGGCTGGGGTTT	4800

**Figura 33** Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 2 con el cebador CB21.

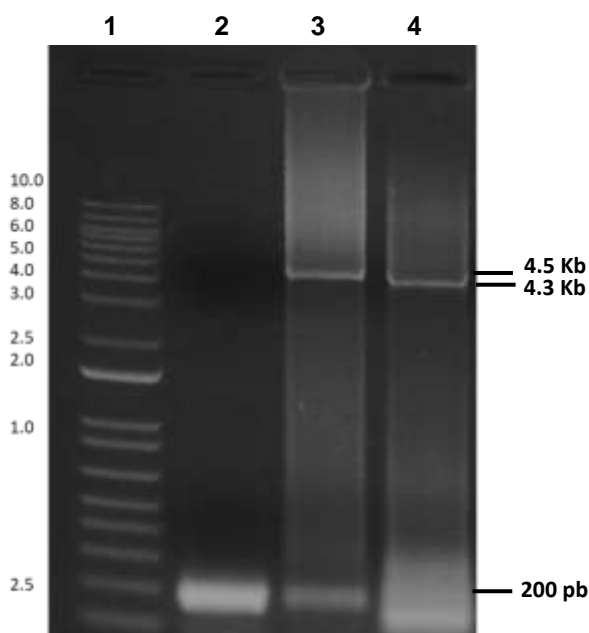
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTT ----- CCAAAGGGCTATTGAGACTTT	3420 21
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTT TCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTT	3480 81
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGG AAAGGCTATCGTTCAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCAC	3540 201
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	GAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG GAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG	3660 261
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTC TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTC	3720 321
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTGAAACA CTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTTGGAGAGGATTAGAAATGATGAACATTTGAAACA	3780 381
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TTCCCGTGGGACGCTCACCTCCCATGCCGTTTAAATTTGTTGAAGCTGGCAAGCAAGC CATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGG	3840 141
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TTGGAAAGCAAATCCTCCTTCCAAGTTTGCGGTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAGT TTGGAAAGCAAATCCTCCTTCCAAGTTTGCGGTGGGCGAAGGCCAAATCCTGGTGAGT	3900 501
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CTGGCACCTCACACGGTGGGCCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAGT CTGGCACCTCACACGGTGGGCCTTCTTCATCATCTCGACCTTCCCGAAGGCGAGGTAAGT	3960 561
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTTGAGAAACATAGGTCACATGCAAATG TTGCCCTTAGGAGGCCAGCTGGAGTTCAGTGGGTTGAGAAACATAGGTCACATGCAAATG	4020 621
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCGG CGGCCCGTCGATCTTCTCCTGCAGAACAAGGCAGGAATCCTATACGGACTCTGGTCCGG	4080 681
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	AAGCTCTGTCATCTCAATCGAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCTG AAGCTCTGTCATCTCAATCGAAGAAAGAGTGATAGAGTTGGGCGAATCTAGCCAAGCTG	4140 741
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTAGGGCGCAAGCCA TTAGGGTTCAGGTTCCGAGCCAAGATGGTGATAGACCTACGGCGGTTAGGGCGCAAGCCA	4200 801
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGTTAGGAGCTTGGTTGGGGAAAGGATGGCTG GTTCCGCTGTGGAGATTGAACCTATCAAGTTAGGAGCTTGGTTGGGGAAAGGATGGCTG	4260 861
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	AGGAAGCCACTCGAATCGCTTTCCGAGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCCG AGGAAGCCACTCGAATCGCTTTCCGAGCTTAGGCTGGGAGAGTAGATTGCCCTGGCCCG	4320 921
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCCG ACCCTGCTGGTGGGTTAGAGCGGGTACTAGAGCAAACCCGTACCATGATGGCTATTCCCG	4380 981
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTGAGAGG GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTGAGAGG	4440 1041
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTGAGAGG GGTTAGGGGAGGAACCTTGCTGAGGGATTCTTGGTGAGCCACCTCTGACATTGAGAGG	4440 1041
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGGA AGGTGGTGAATGGCTATCAGCGCGAAGTGGGGTGGGAGCGGCTCCACTGGCGGTTTGGGA	4500 1101
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGCTGCGCGGGCATTGTCCTACGCG AAATCTGGTCTCCATCTACGAAGATGGCCAGTCGCTGCGCGGGCATTGTCCTACGCG	4560 1161
pDIVA: :PMeV-Mx Clona2_CB97	CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCTG CCCCTAGCAGCGCTAATGCGTTGTTGGGAGAACACTGGCTGTTGGAGCAGTATGGTGCTG	4620 1221

**Figura 34** Alineamiento de pares ClustalW de resultados de secuenciación de la Clona 2 con el cebador CB97.

Los resultados de la secuenciación demuestran que la inserción del genoma completo en pDIVA es correcta en ambas colonias. No se encontraron mutaciones en las secuencias, salvo por un par de cambios hacia el final de secuencias, lo cual es normal en la secuenciación Sanger. Para determinar si existen mutaciones en el resto de la clona infectiva es necesario secuenciar el genoma completo de PMeV-Mx, empleando cebadores en ambos sentidos y comparar esas secuencias.

### 3.4. Transfección directa a *A. tumefaciens*

Como alternativa ante los problemas de toxicidad encontrados al transformar el en *E. coli*, se probó la transformación directa del producto del ensamblaje de Gibson de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, tal como lo reportan Tuo y Col. en 2017, obteniéndose una colonia resistente a Kanamicina, a la cual se le denominó Colonia 3. Se verificó la presencia del inserto mediante PCR en colonia con los juegos de cebadores, CB172/CB173 y CB21/CB187 respectivamente, y produjeron amplicones de 4.3 Kb y 4.5 Kb en ambas colonias, indicando que contienen el genoma de PMeV-Mx en pDIVA. Se utilizó al vector pDIVA vacío como control, el cual produjo un amplicón de 200 pb con los cebadores CB21/CB187 (Carril 1). Los amplicones esperados en la Figura 35, confirman una transformación de *A. tumefaciens* con la clona infectiva.



**Figura 35** Verificación de la colonia 3, de *A. tumefaciens* por PCR. **1.** Marcador de 1 Kb Plus. **2 y 3.** Productos de PCR obtenidos con los cebadores CB21/187., **3.** CB172/173.



Sin embargo, cuando se repitió el PCR de la colonia 3 con los cebadores arriba mencionados, días después haber cultivado la colonia estriándola en medio sólido LB fresco con Km, no fue posible volver a tener ningún producto de amplificación. Esto sugiere que las bacterias de *A. tumefaciens* se curaron, es decir, perdieron el plásmido, posiblemente como resultado de la toxicidad.

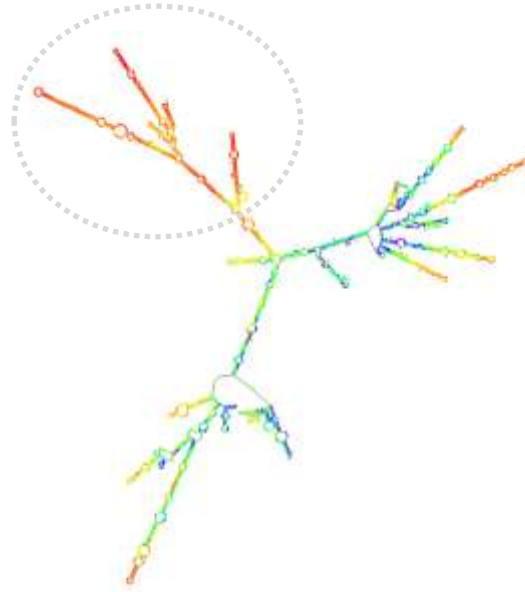
Por lo anterior se realizó un glicerol al 30 %, con 700  $\mu$ L de cultivo y 300  $\mu$ L de glicerol de la cepa amplificada inicialmente, y se almacenó a -80 °C, para analizarla posteriormente.

### **3.5. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL lncRNA DE PMeV-Mx**

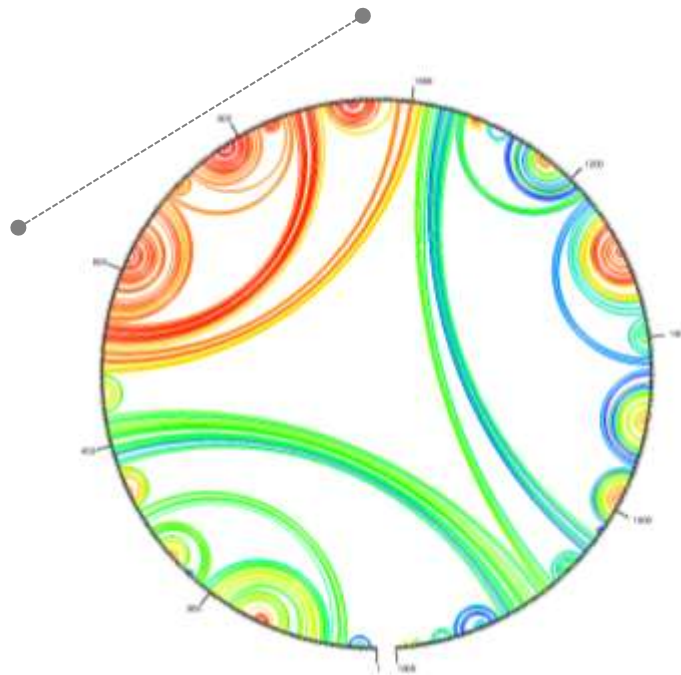
Para estudiar al lncRNA de PMeV-Mx se realizaron análisis *in silico*, tanto de predicción de estructura secundaria como alineamientos múltiples de secuencias. La primera para identificar regiones que pudiesen tener un papel importante en la replicación del virus, o bien en la regulación de la expresión de sus genes o un posible papel en los mecanismos de defensa de la planta. Los alineamientos múltiples, para identificar regiones conservadas con otros virus relacionados filogenéticamente al PMeV-Mx, que puedan tener una función. Posteriormente, se utilizaron los resultados aquí obtenidos para el diseño de mutantes en el lncRNA.

#### **3.5.1. Análisis de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx**

Los análisis de la estructura secundaria con la aplicación RNA Folding Form V2.3 (UNAFold web server) arrojaron información sobre la formación de estructuras secundarias con una alta probabilidad de plegamiento entre los nucleótidos 600 y 800 del lncRNA de PMeV-Mx. Una vez identificada esta región, se realizaron mutaciones *in silico* con substitución de 13 nt. Los análisis demostraron que una substitución de 13 nt es suficiente para provocar un cambio en la probabilidad de plegamiento, la cual disminuye en las estructuras de tallo y asa identificadas en esta región (Figura 38).

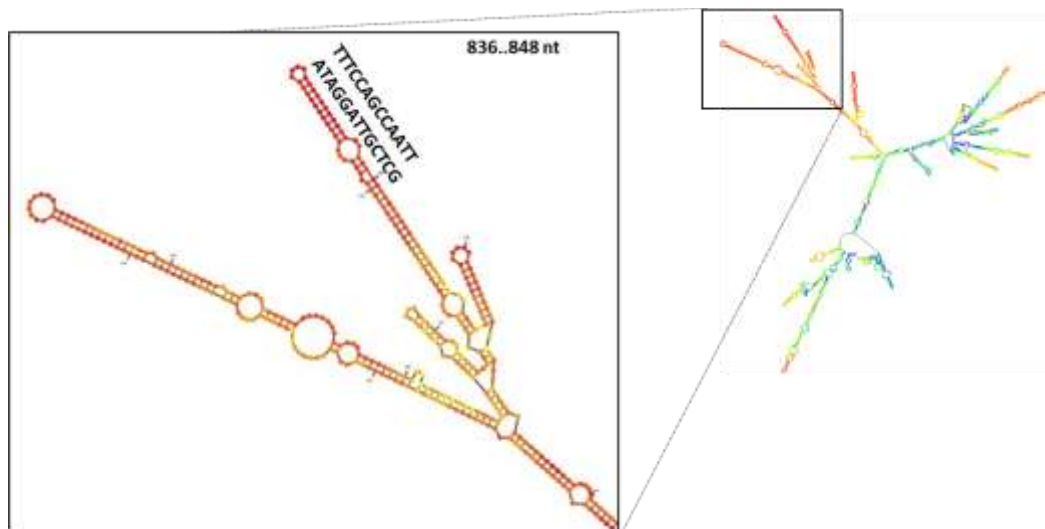


**Figura 36** Esquema de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx. Anotación de estructura p-num. Plegamiento del lncRNA a 28 °C.  $\Delta G = -752$  kcal / mol. El círculo punteado encierra la región con estructuras secundarias con mayor probabilidad de plegamiento (colores cálidos).



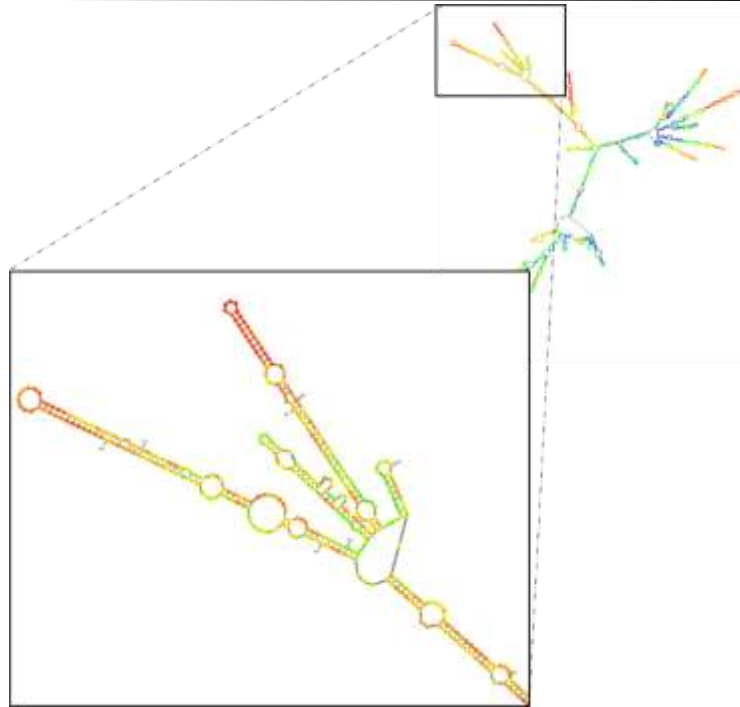
**Figura 37** Gráfico circular. Anotación de gráfico p-num. Las líneas punteadas marcan las regiones secundarias con mayor probabilidad de plegamiento (colores cálidos).

Dada la predicción de las estructuras secundarias del lncRNA de PMeV-Mx, se identificó una región potencial para obtener una mutante, tomando ventaja del desarrollo de la clona infectiva obtenida en este trabajo, dirigida a una de cuatro estructuras de tallo y asa que forman parte del múltiple *loop* seleccionado (Figuras 38 y 39).



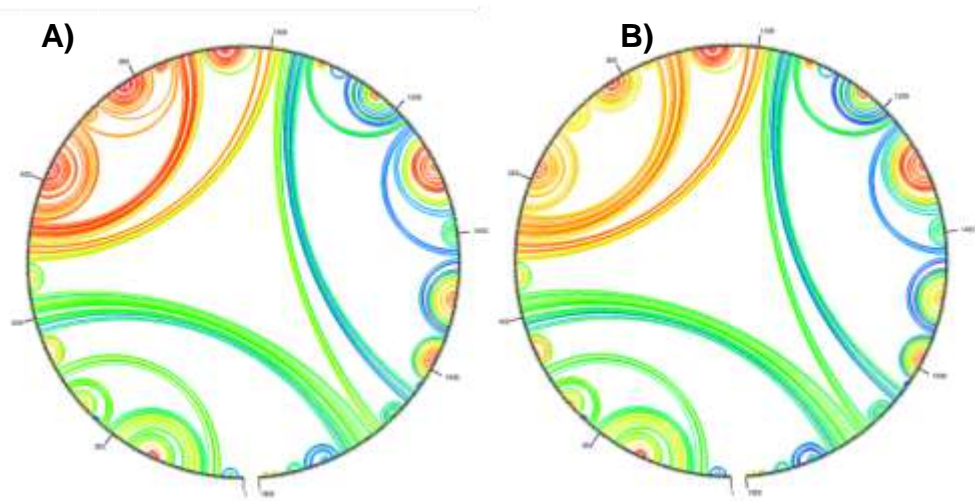
**Figura 38** Estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx. El recuadro muestra la región seleccionada para la mutación por sustitución.

Se substituyó la secuencia de 13 nt 5' **TTTCCAGCCAATT** 3' por la secuencia de 13 nt 5' **ATAGGATTGCTCG** 3', en la posición 836 a 848 del lncRNA, que corresponde a la posición 3,282 del genoma completo de PMeV-Mxy y la posición 7,036 de la clona infectiva de pDIVA:PMeV-Mx (pCBL224). Posteriormente se verificó el efecto de la sustitución en la estructura secundaria, tal como se muestra en la Figura 39, podemos observar un cambio de color de rojo a amarillo/verde en tres de cuatro tallos y asas, lo que significa una probabilidad menor de hibridación.



**Figura 39** Mutación de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx, por sustitución de 13 nt.

En la Figura 40 podemos observar de manera más clara el efecto de la sustitución (mutación *in silico*) sobre la estructura secundaria de PMeV-Mx, donde se observa una disminución en la hibridación de las bases que presentaban alta probabilidad de plegamiento, dicho disminución se ve reflejada con un cambio en el color de rojo (A) a amarillo (B).



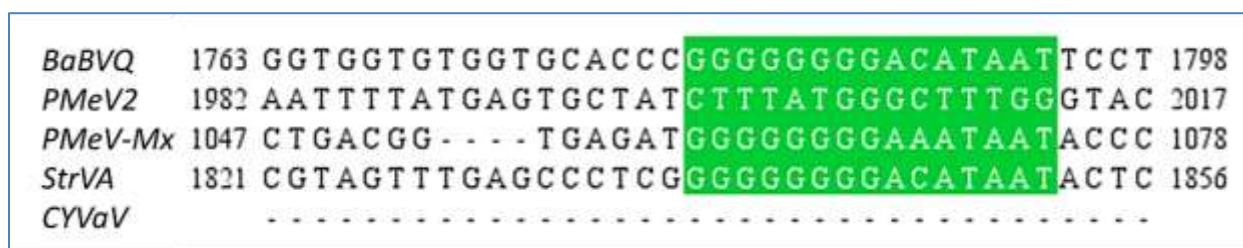
**Figura 40** Gráfico circular de la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx. Mutación *in silico* por sustitución de 13 nt. **A)** Gráfico circular de estructura sin mutación. **B)** Gráfico circular de estructura mutada. Las líneas punteadas indican la región de interés.

### 3.5.2. Análisis de la secuencia primaria del lncRNA de PMeV-Mx

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con las regiones correspondientes al lncRNA de los virus: Virus de la meleira de la papaya 2 (PMeV2) Acc. KT9211781., Virus Q del Babaco (BabVQ) Acc. MT113181., Virus asociado a la vena amarilla de los cítricos (CYVaV) Acc. JX101610.1. y Virus de la fresa A (StrVA) Acc. MK211275.1. (Tabla 7), los cuales son los más cercanos a PMeV-Mx. De manera interesante se encontró una gran divergencia en las secuencias de estos virus, lo cual es un reflejo de la falta de presión de selección por la ausencia de una región codificante. Sin embargo, el alineamiento permitió identificar una región conservada de polipurinas de 15 nt (GGGGGGGGACATAAT) en la posición 1,830 del lncRNA de PMeV-Mx y posición 4,284 del genoma completo de PMeV-Mx, que se encuentra conservada para los virus analizados, con excepción de CYVaV (Figura 41).

**Tabla 7** Virus cercanos a PMeV-Mx analizados.

No. Acc GenBank	Abreviatura	Nombre del virus
KT9211781	PMeV2	Virus de la meleira de la papaya 2
MT113181	BabVQ	Virus Q del babaco
JX101610.1	CYVaV	Virus asociado a la vena amarilla de los cítricos
MK211275.1	StrVA	Virus de la fresa A



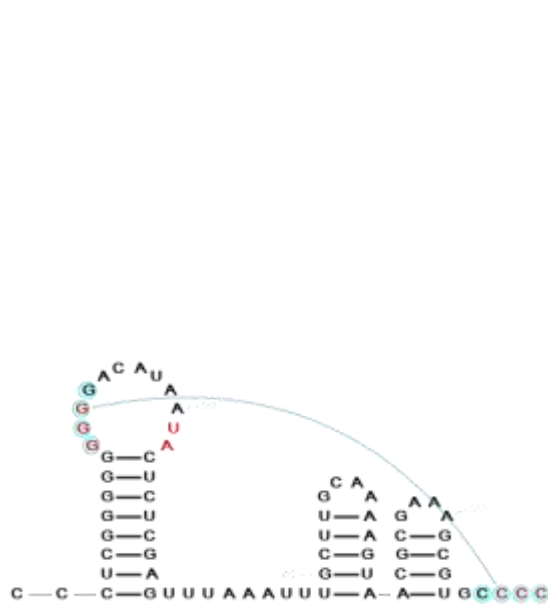
**Figura 41** Alineamiento múltiple de los lncRNA de virus similares a *Umbravirus* cercanos a PMeV-Mx. BabVQ: MT113181., PMeV2: KT9211781., StrVA: MK211275.1., CYVaV: JX101610.1., y PMeV-Mx: datos no publicados.



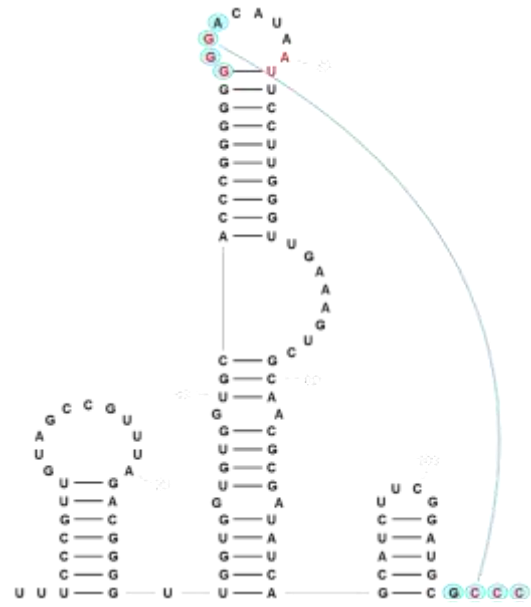
### CAPÍTULO III

---

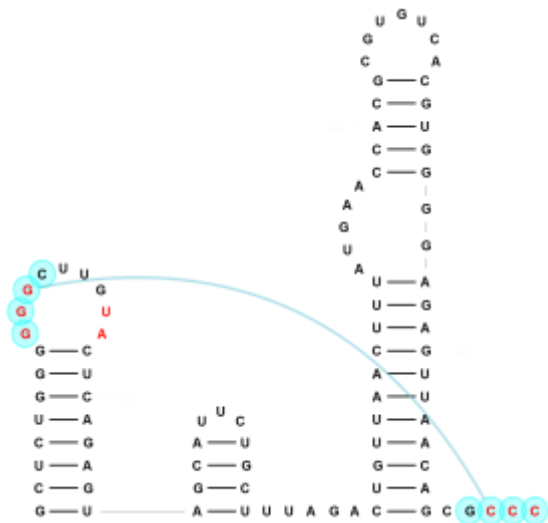
Una vez identificada la horquilla H5 conservada en el extremo final del lncRNA de PMeV-Mx, se realizaron comparaciones de estructura secundaria y de residuos conservados con otros virus filogenéticamente relacionados con “RNAs” similares Umbravirus (uRNAs) de clase 1, 2 y 3, BabVQ, CyVaV, StrVA y Tomato bushy stunt virus (TBSV) del género *Tombusvirus*. Encontrándose que las horquillas H5 se encuentran conservadas también en estos virus, además de un dominio de unión ARN-ARN denominado  $\Psi$ 1 y para PMeV-Mx, una horquilla gPr similar a la de los *Tombusvirus*.



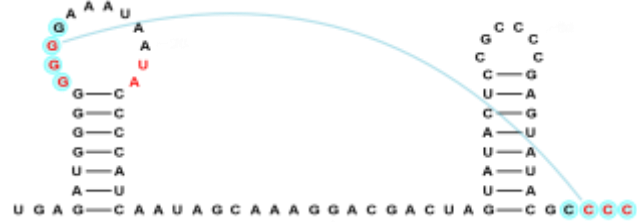
PMeV-Mx



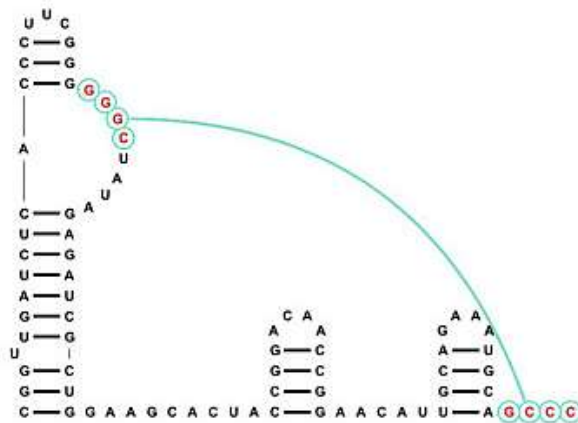
Class 1. BabVQ



Class 2. CYVaV



Class 3. StrVA



TBSV



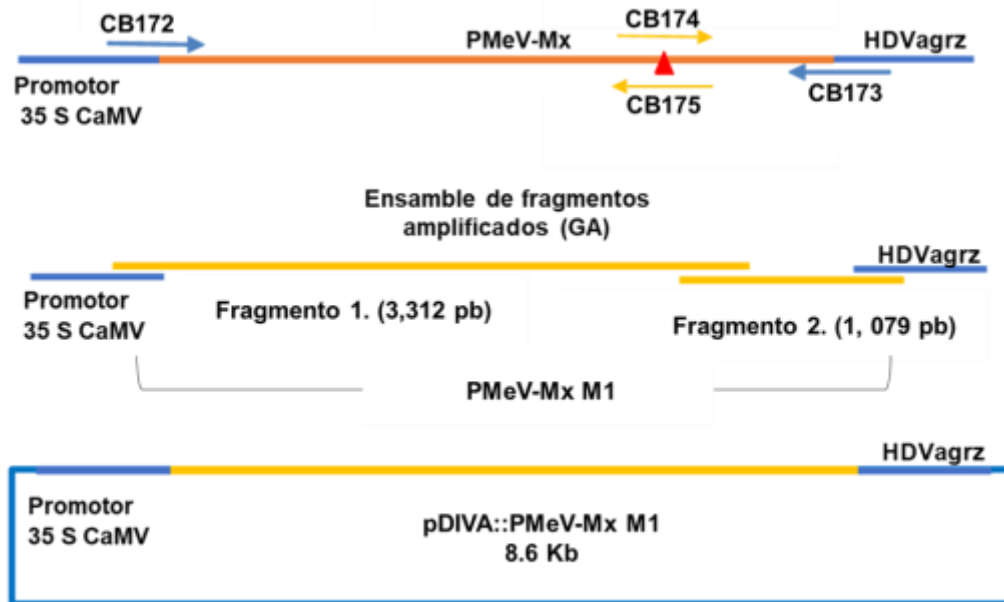
**Figura 43** Comparación de las características terminales 3' OH entre **PMeV-Mx**, uRNAs: Clase 1 **BabVQ** (MT113181), Clase 2. **CYVaV** (JX101610.1), Clase 3. **StrVA** (MK211275.1) y **TBSV** (M21958). Secuencias similares (Rojo). Pseudonudo H5 (Azul). Interacción RNA-RNA (Azul).

### 3.6. DISEÑO DE LAS MUTANTES DEL IncRNA

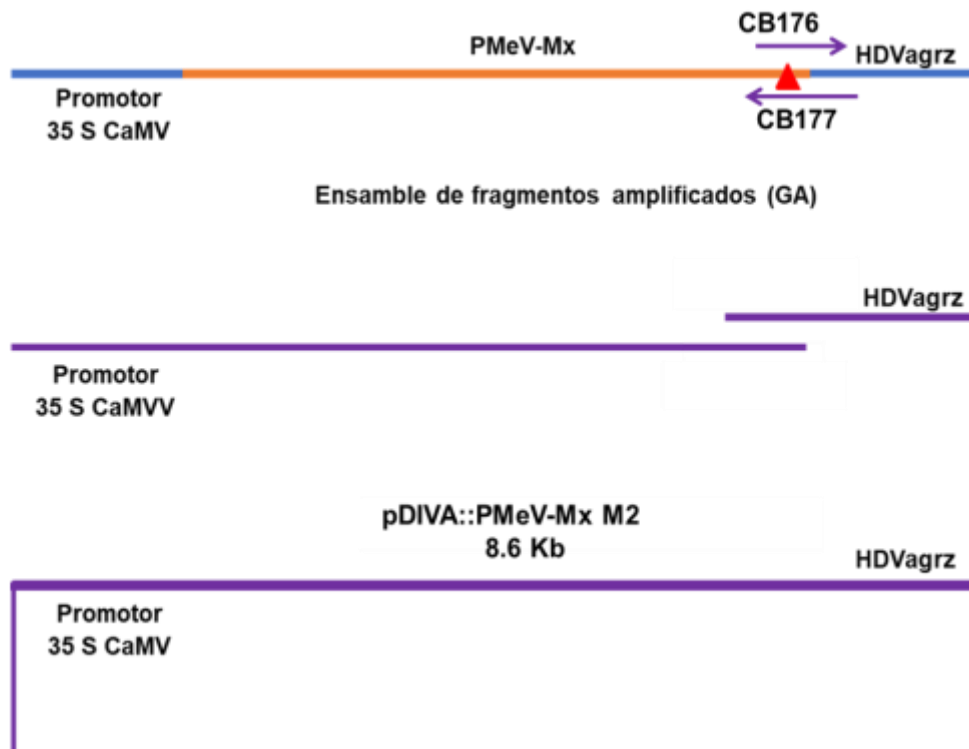
Los análisis de estructura secundaria y regiones conservadas del IncRNA de PMeV-Mx permitieron identificar regiones para el diseño de las mutantes 1 y 2. Estas mutantes se diseñaron, tomando ventaja de la técnica de ensamble de Gibson, ya que es posible introducir mutaciones en los cebadores. En la figura 44 se muestra un esquema de la estrategia utilizada para el ensamble las mutantes diseñadas, denominadas de ahora en adelante “Mutante 1 y Mutante 2”, mediante el método de Gibson. La Mutante 1 consta de la amplificación de dos fragmentos con los cebadores CB172 y CB175 (Fragmento 1-M1 y Fragmento 2-M1) con un tamaño esperado de 3,312 pb y 1,078 pb, respectivamente. Los fragmentos 1 y 2, se ensamblaron con el vector pDIVA linealizado de 4.3 Kb con los cebadores CB188 y CB189. El ensamble de los tres fragmentos amplificados (F1M1, F2M1 y pDIVA) tiene una longitud de 8.6 Kb.

La Mutante 2, corresponde al extremo terminal 3'OH del PMeV-Mx por lo que el diseño de ensamble consta de una amplificación completa de la clona infectiva (pCBL224) con los cebadores CB176 y CB177, esperando un tamaño de 8.6 Kb. Los cebadores antes mencionados incluyen la sustitución de 15 nt para generar la Mutante 2.

A) Mutante 1



B) Mutante 2



**Figura 44** Esquema para el ensamble de las mutantes del lncRNA de PMeV-Mx. A) Mutante 1. B) Mutante 2. Líneas azules. Promotor CaMV 35S y Ribozima (HDVagrz)., Líneas naranjas. Secuencia completa de PMeV-Mx., Líneas amarillas. Fragmentos Mutante 1., Líneas moradas. Fragmentos Mutante 2., Triángulos rojos. Posición aproximada de las mutantes., Flechas. Ubicación y dirección de los cebadores.

**3.6.1. Diseño de cebadores para las mutantes del lncRNA**

La Tabla 8 contiene los cebadores diseñados para la construcción de las mutantes por sustitución del lncRNA de PMeV-Mx, y sus características.

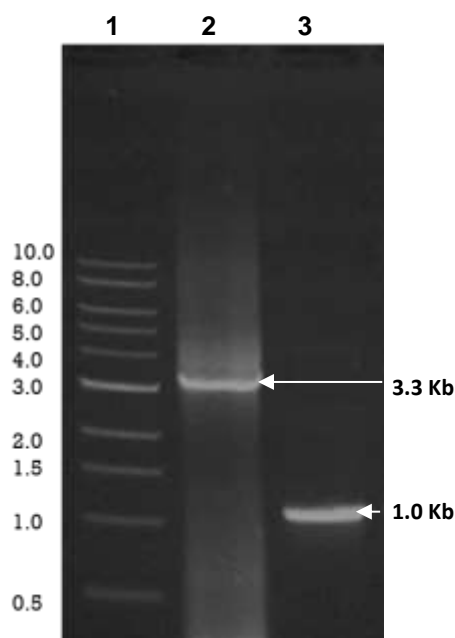
**Tabla 8** Cebadores para las mutantes lncRNA de PMeV-Mx.

Cebadores para el ensamble de las mutantes de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)							
ID	No	Secuencia	Tamaño total	Tm	Tamaño	Tms	% GC
<b>Mutante 1 estructura secundaria</b>							
3.	CB174	5' <b>ctctcgagcaatcctat</b> CCAACCAGACATGGAACC AAAGAACTACTTG3'	47 nt	71 °C	15 nt	43.4 °C	52
	CB175	5' <b>ggataggattgcucga</b> GAGGGCTAGATTCGGCTC GACTATGG3'	28 nt	72 °C	15 nt	43.4 °C	50
<b>Mutante 2 secuencia conservada</b>							
4.	CB176	5' <b>gtgagcggaagtagtga</b> CGAGGGCTCAAACACTACG TGTTTAGTGAG3'	43 nt	71 °C	15 nt	46.1 °C	50
	CB 177	5' <b>gtcactacttcc</b> GCTCACTCTCGAGTTTAAATTTG CTTGCAAAAGTAACGCG3'	51 nt	72 °C	15 nt	46.1 °C	39

**Nota.** En negritas, secuencias de solapamiento de CB174-F1M1 con CB175-F2M1, y CB176-F1M2 con CB177-F2M2 para la síntesis de mutantes 1 y 2.

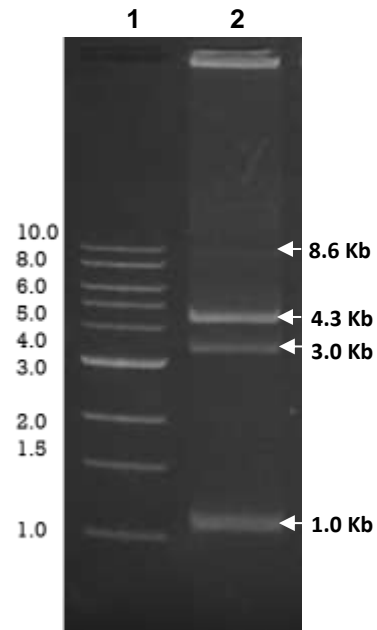
### 3.7. Construcción de la Mutante 1

En la Figura 45 se observa la amplificación y purificación del fragmento 1 con los cebadores CB172/CB175 y fragmento 2 con los cebadores CB173/CB174 que componen la Mutante 1, respectivamente. El tamaño de los amplicones es de 3.3 Kb, y 1.0 Kb para los fragmentos 1 y 2, respectivamente.



**Figura 45** Amplicones para generar la Mutante 1. **1.** Marcador de 1 Kb de NEBs., **2 y 3.** Fragmentos 1 y 2, obtenidos con cebadores CB172/CB175 y CB173/CB174.

Una vez amplificados y purificados los fragmentos 1 y 2 de la Mutante 1, estos fueron ensamblados con el vector pDIVA previamente amplificado con cebadores CB189 y CB188. En la Figura 46 se observa el resultado del ensamblaje *in vitro* de los fragmentos mediante el Método de ensamble de Gibson, descrito con anterioridad. Las bandas observadas de 3.3 Kb, 1 Kb corresponden al fragmento 1 y 2 de la mutante, la banda de 4.3 Kb corresponde al ensamble de los fragmentos 1 y 2, pero también puede corresponder al vector pDIVA con un tamaño de 4.3 Kb, finalmente la banda de 8.6 Kb corresponde a la mutante de la clona infectiva ensamblada con el vector pDIVA.

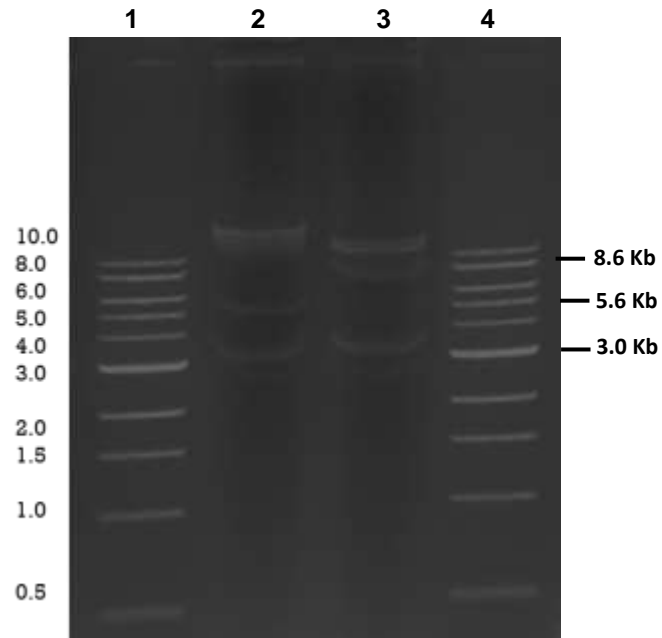


**Figura 46** Ensamble de Gibson de la Mutante 1. **1.** Marcador de Kb de NEBs. **2.** Producto del ensamble M1.

Posteriormente, al igual que con la clona infectiva, se purificó la reacción del ensamble de Gibson para la mutante 1 y se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 single use. Únicamente se obtuvo una colonia de la cual se extrajo DNA plasmídico para su verificación.

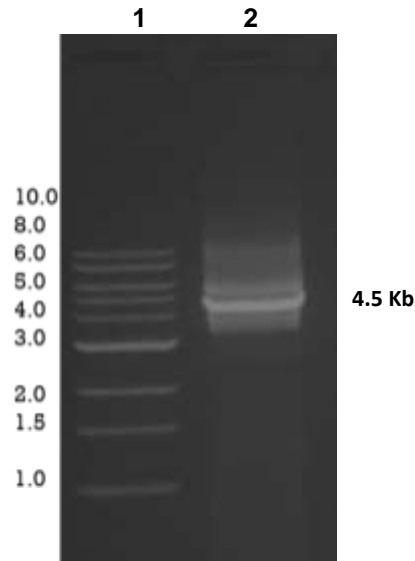
**3.7.1. Verificación de la construcción de la Mutante 1**

En la Figura 47 se observa el resultado de la digestión con la enzima *Sal I* que libera dos bandas de 3 Kb y 5.6 Kb y con la enzima *Xba I* que linealiza la Mutante 1, generando una banda de 8.6 Kb. Al igual que con la clona infectiva, también se observa DNA genómico, de tamaño superior a 10 Kb.



**Figura 47** Ensayo de digestión de la Mutante 1. **1 y 4.** Marcador de 1 Kb de NEBS., **2 y 3.** Digestión con *Sal I* y *Xba I* respectivamente.

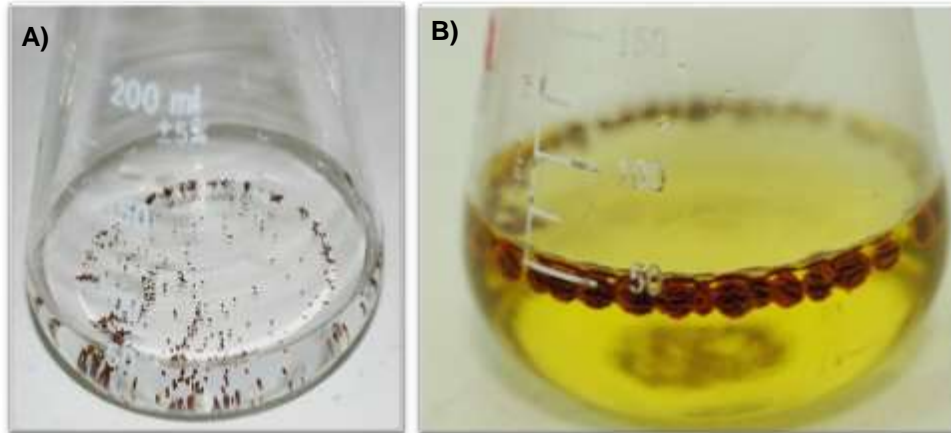
En la Figura 48 se puede observar la amplificación esperada de 4.5 Kb en un gel de agarosa al 0.8 %, que se realizó con los cebadores CB21 y CB187 para la verificación correcta del ensamblaje. Al plásmido resultante con la mutante 1 del lncRNA de PMeV-mx en se le denominó pCBL239.



**Figura 48** Verificación por PCR de la Mutante 1.

### 3.8. MATERIAL VEGETAL

En paralelo a la construcción de las clonas infectivas de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224), se germinaron 30 plantas hospedantes (*C. papaya*) y no hospedantes (*N. benthamiana*) de PMeV-MX, según los protocolos antes mencionados en la sección de metodología (Sección 2.4.) (Figura 49). Se seleccionaron las semillas viables y se germinaron en almácigos, posteriormente se trasplantaron a macetas de manera individual (Figura 50 y 51). La edad establecida para la agroinfiltración de las plantas es cinco semanas (Sparkes *et al.*, 2006), por tal razón, la obtención de material vegetal se realizó consecutivamente durante un periodo aproximado de seis meses, con la finalidad de contar con material vegetal disponible para agroinfiltración, una vez obtenidas las clonas infectivas (Clonas 1 y 2, obtenidas de *E. coli* y clona 3 proveniente de la transfección directa a *A. tumefaciens*) y Mutante 1 del lncRNA de PMeV-Mx obtenidas.



**Figura 49** Tratamiento pregerminativo de semillas de **A)** *N. benthamiana*. **B)** *C. papaya*.



**Figura 50** Plantas de *N. benthamiana* de cinco semanas de edad.

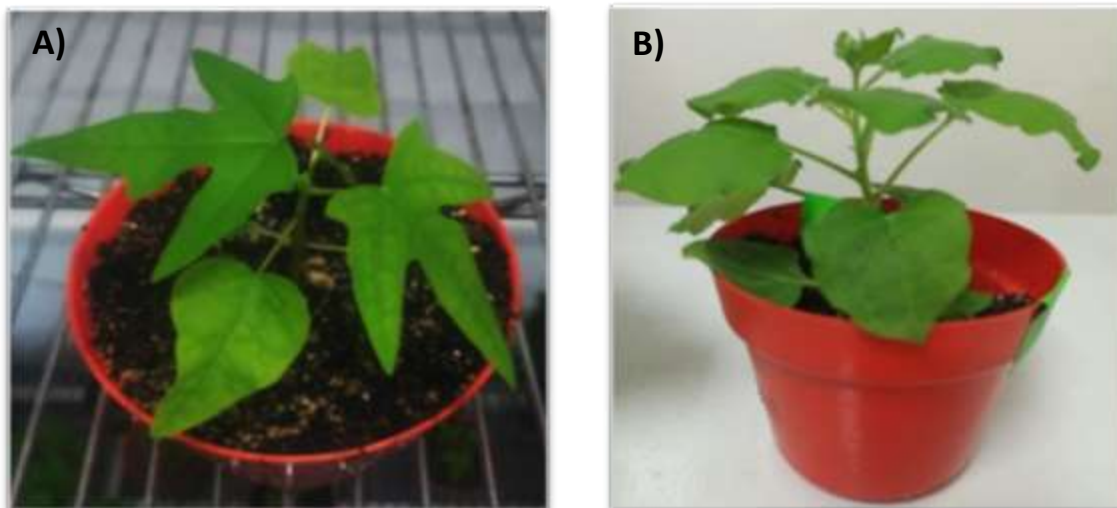


**Figura 51** Plantas de *C. papaya* de cinco semanas de edad.

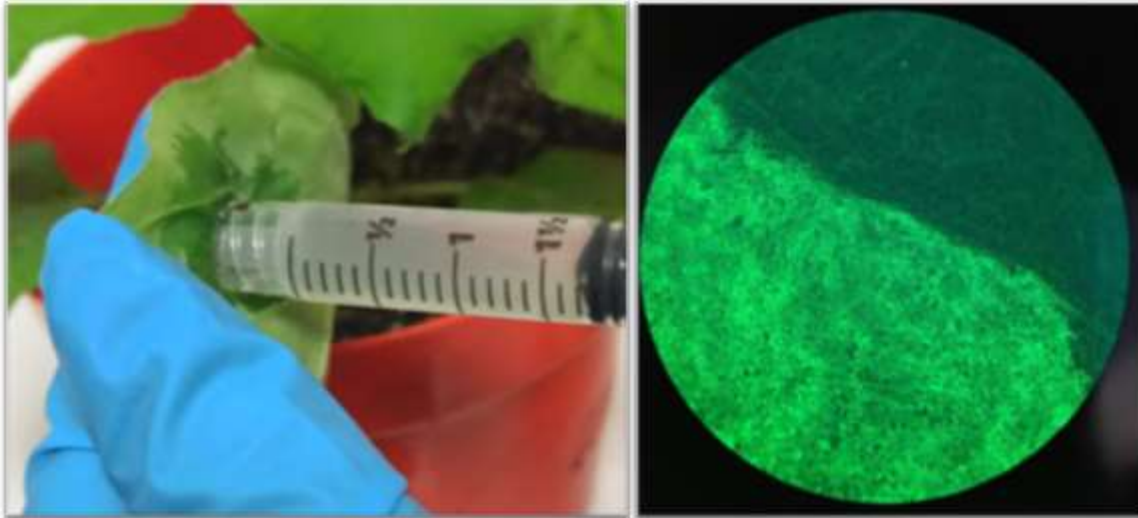


### 3.9. ESTABLECIMIENTO DE LA AGROINFILTRACIÓN

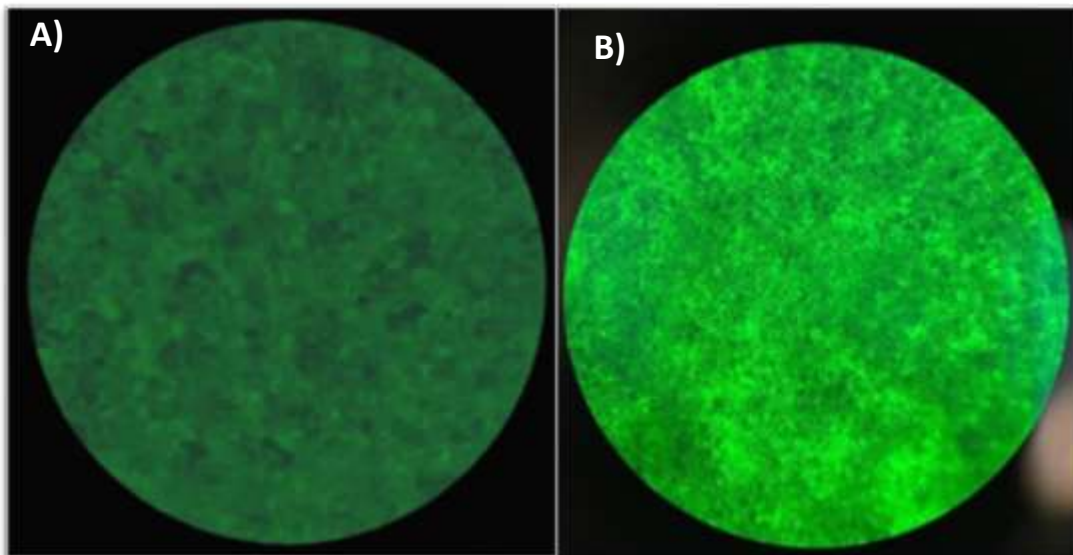
Para establecer el protocolo de agroinfiltración en el laboratorio, se utilizaron tres plantas de *N. benthamiana* y *C. papaya*, respectivamente, de cinco semanas de edad (Figura 52) que se agroinfiltraron con la cepa LBA4404 transformada con el vector pCAMBIA2200:GFP. Como control se agroinfiltraron tres plantas de *N. benthamiana* y *C. papaya*, respectivamente, con la cepa LBA4404 sin transformar. Transcurridos los 3 días postinfiltración, los fragmentos de hojas agroinfiltradas se observaron en el estereomicroscopio Stemi DV4, donde se observó la fluorescencia dada por la etiqueta de GFP en tejido vegetal agroinfiltrado con el vector pCAMBIA2200::GFP (Figura 54 y 55 B). La agroinfiltración con el vector pCAMBIA2200::GFP resultó exitosa para hojas de *N. benthamiana* y *C. papaya*, mismo que será útil para los futuros ensayos de agroinfiltración de las clonas infectivas (Clona 1 y 2), Colonia 3 de la transfección directa a *A. tumefaciens* y Mutante 1 obtenidas de pDIVA::PMeV-Mx. Sin embargo, en el caso del tejido de las hojas de *C. papaya* y debido a que su cutícula es más gruesa, respecto a la de *N. benthamiana*, fue más difícil la agroinfiltración, y la expresión fue menor (Figura 55 B)). Por tanto, se decidió utilizar el método de agroinyección para los futuros ensayos con las infectivas de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224) y mutantes.



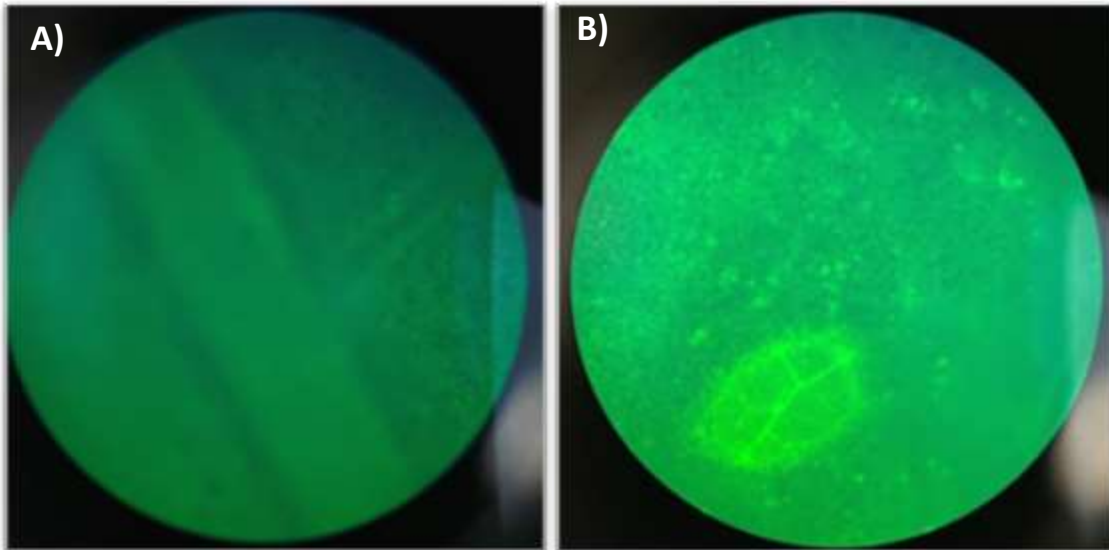
**Figura 52** Material vegetal. **A)** *C. papaya*., **B)** *N. benthamiana* a las cinco semanas de edad.



**Figura 53** A) Agroinfiltración de plantas., B) Tejido de hoja agroinfiltrado de *N. benthamiana*.



**Figura 54** Tejido hojas de *N. benthamiana* de cinco semanas de edad, agroinfiltración A) Infiltración con *A. tumefaciens* LBA4404 sin transformar, B) Infiltración con *A. tumefaciens* LBA4404 que albergaba pCAMBIA2200:GFP (3 dpi). Estereomicroscopio Stemi DV4, 1.25X.



**Figura 55** Tejido hojas de *C. papaya* de cinco semanas de edad, agroinfiltración **A)** Infiltración con *A. tumefaciens* LBA4404 sin transformar., **B)** Infiltración con *A. tumefaciens* LBA4404 que alberga pCambia2200::GFP (3 dpi). Estereomicroscopio Stemi DV4 1.25X.

Como resumen de los resultados presentados en este trabajo, se desarrollaron las clonas infectivas (Clona 1 y 2), la Colonia 3 de la transfección directa a *A. tumefaciens* y la Mutante 1 obtenidas de pDIVA::PMeV-Mx. Y se estableció el protocolo de agroinfiltración con el vector pCambia2200::GFP. Por cuestiones de tiempo asociadas a la pandemia de COVID-19 que abarcó el periodo de realización de la tesis, ya no fue posible realizar los ensayos de inoculación con las clonas infectivas y con la mutante en plantas para poder rechazar o aceptar las hipótesis, sin embargo, se lograron construir las herramientas moleculares necesarias para hacerlo. Será necesario inocular plantas de papaya y hacer un seguimiento por RTq-PCR de la carga viral en hojas inoculadas y sistémicas para determinar si el virus puede replicarse y moverse, en ausencia de un virus ayudador. La mutante generada en la posición 836 nt del lncRNA que corresponde a la posición 3,282 del genoma completo de PMeV-Mx, está dirigida a una estructura secundaria con alta probabilidad, y se determinará si un cambio en la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx podría causar un efecto respecto a la expresión de PMeV-Mx *in vivo*.

## CAPITULO IV.

### DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis proporcionan información acerca del desarrollo de la clona infectiva de PMeV-Mx (pCBL224) que permitió mediante genética inversa, un acercamiento a la caracterización de la secuencia del RNA largo no codificante y que en un futuro cercano contribuirá al esclarecimiento de la etiología de la meleira de la papaya en México.

La clonación del genoma completo de PMeV-Mx en el vector binario de expresión pDIVA por el método de ensamble de Gibson (GA) mostró ser útil para la construcción de clonas infectivas de PMeV-Mx, ya que pudimos corroborar una alta eficiencia en el ensamble del inserto y vector en geles de agarosa, tal como lo reportaron Blawid & Nagata en el 2015, además de que esta estrategia ha sido utilizada exitosamente por Bijora *et al.*, 2017; Laufer *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022, para el desarrollo de clonas infectivas para el estudio de virus de RNA de plantas.

Se verificó el éxito del ensamblado *in vitro*, pero la transformación en cepas químicamente competentes de *E. coli* XL blue y DH5 $\alpha$  no fue eficiente, al no obtener DNA plasmídico de las células transformadas y cultivadas a 37 °C. Esto ha sido reportado con anterioridad por Blawid & Nagata (2015) en la construcción de una clona infectiva del Virus del mosaico de ampollas del tomate (ToBMV, por sus siglas en inglés), donde utilizaron las cepas DH5 $\alpha$  y DH10B para su propagación. Ninguno de los plásmidos extraídos de células DH5 $\alpha$  transformadas y cultivadas a 28 °C o 37 °C tenía el tamaño de plásmido esperado. Pero, las colonias de células DH10B transformadas y cultivadas a 28 °C contenían plásmidos con el tamaño esperado, sin embargo, el porcentaje se redujo cuando las colonias se cultivaron a 37°C. Existe evidencia de que las cepas de *E. coli* adecuadas para clonar DNA inestable más la reducción de las temperaturas de incubación de *E. coli* (p. ej., de 37 °C a 25–30 °C) ralentiza las tasas de crecimiento bacteriano y mejora el mantenimiento y la propagación de construcciones problemáticas (Pasin *et al.*, 2019), lo que respalda los resultados obtenidos por Blawid & Nagata (2015). En nuestro caso la clonación en cepas de *E coli* convencionales y la incubación a 37 °C pudo contribuir a una baja eficiencia de clonación.

La inestabilidad de las cepas de *E. coli* en la clonación de virus de plantas, se ha relacionado con la toxicidad de los productos de expresión viral no deseados en hospederos bacterianos (Pasin *et al.*, 2019). Específicamente con la expresión de promotores crípticos

(Klenov & Hudak, 2021). Respecto la toxicidad de la secuencia viral de PMeV-Mx en cepas convencionales de *E. coli*, al ser el primer reporte de una clona infectiva de PMeV-Mx ésta no podía anticiparse. Puesto que se han reportado virus de RNA de plantas donde la secuencia viral ha sido estable para cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  como en el caso del Virus de la necrosis interna de la baya de la vid (GINV) (Fan *et al* 2020), el Virus de la clorosis de la remolacha (Wetzel, *et al* 2018) y Virus del surco del tallo de la manzana (ASGV) Li *et al.*, 2020.

De los diferentes enfoques para abordar los problemas de toxicidad de las secuencias virales en *E. coli* (Sun *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2019; Duff-Farrier *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Klenov & Hudak, 2021), en este estudio se recurrió a las estrategias más accesibles respecto al tiempo disponible para el desarrollo del proyecto. La dilución de la reacción del ensamble para introducir menor cantidad de copias del plásmido en las células (NEB, Manual de instrucción, Gibson Assembly® Master Mix), la transformación en la cepa de alta eficiencia de transformación *E. coli* JM109 (>10<sup>8</sup> cfu/ $\mu$ g) (Satyanarayana *et al.*, 2003), y la incubación a 28 °C (Pasin *et al.*, 2019), permitieron la obtención de dos colonias positivas (Clonas 1 y 2), que fueron verificadas por PCR, ensayos de digestión con enzimas de restricción, y secuenciación.

A pesar de la obtención de las clonas infectivas de manera exitosa, se encontraron variaciones en cuanto su crecimiento en medio líquido LB, la clona 1 creció de más lentamente respecto a la clona 2. Una respuesta a este fenómeno es la evidencia sobre la toxicidad para el crecimiento de *E. coli*, la cual puede variar en cada evento de transformación, en los cuales pueden surgir mutaciones puntuales y deleciones, que afectan en mayor o menor medida el crecimiento de las cepas y su potencial infeccioso (Klenov & Hudak, 2021). Tal como lo reportan Tran y Col (2019) en la construcción un clon infeccioso del Virus del moteado del pimiento (PepMoV) donde la manipulación de este clon inestable en la cepa bacteriana DH10B condujo a la formación espontánea de un clon recombinado con alta estabilidad en las bacterias, pero con una infectividad reducida debido a una inserción no deseada de una secuencia de *E. coli* en la región codificante de la proteasa Nla del virus.

Lo anterior, pudo haber dificultado la extracción de DNA de plásmido de buena calidad y en concentración suficiente para la secuenciación, ya que se recuperaba DNA genómico, lo que sugiere que las paredes celulares no estaban íntegras.

Los resultados de secuenciación de los extremos del genoma viral unido al vector indican que ambas clonas infectivas (1 y 2) se ensamblaron completas y respaldan los ensayos de PCR y de digestión con enzimas de restricción, respecto al éxito del ensamblaje Gibson del

genoma de PMev-Mx en el vector pDIVA. Las variaciones de nucleótidos encontradas al inicio y al final de la reacción pueden explicarse por el límite de la técnica de secuenciación Sanger, que es de 800 a 1000 nt. Por lo anterior, es importante la obtención de más de una clona infectiva del virus, y resulta indispensable la secuenciación completa de las dos clonas infectivas obtenidas, para determinar si la diferencia en el crecimiento está relacionada con variaciones importantes en la secuencia, y de ser así, poder redefinir las estrategias contra la toxicidad de la secuencia viral de PMeV-Mx.

Otra estrategia utilizada para la obtención de la clona infectiva, antes de lograr obtener colonias de *E. coli*, fue la transformación directa del producto del ensamble, a la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, la cual resultó ser estable para la transformación de la clona infectiva pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224). Tal como lo reporta Tuo y Col en el 2017, donde lograron ensamblar con éxito la clona infectiva del Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) y el virus del mosaico de distorsión de la hoja de la papaya (PLDMV) utilizando este método, mientras que los intentos que utilizaban el sistema de clonación "clásico" de *E. coli* fallaron repetidamente (Tuo *et al.*, 2017). Una limitante de este trabajo es que a pesar de que se logró obtener una clona de *A. tumefaciens* resistente a Km que resultó positiva por PCR en colonia, no fue posible extraer DNA plasmídico. El bajo rendimiento de dicha extracción afectó la verificación confiable de la presencia de la clona infectiva y de la clona mutante del lncRNA por PCR. Además, el DNA obtenido directamente de la cepa de *A. tumefaciens* también vuelve problemáticos los ensayos de digestión con enzimas de restricción y su respectiva secuenciación. Una alternativa a esta limitante, es la obtención de DNA de *A. tumefaciens* y su transformación a *E. coli*. Sin embargo, debido a los problemas de toxicidad reportados por este estudio esto no fue posible. Debido a esta problemática y por razones de tiempo, ya no fue posible hacer los ensayos de infectividad con las plantas de *C. papaya* y de *N. benthamiana*.

Pese a la complejidad que significó el desarrollo la clona infectiva de PMeV-Mx, dada la toxicidad de su secuencia viral en *E. coli*. Una vez desarrollada, la clona infectiva de PMeV-Mx puede facilitar el estudio de las propiedades biológicas y la caracterización de la función de sus componentes virales (transcritos, proteínas y elementos no codificantes). En nuestro caso, la caracterización del RNA largo no codificante mediante mutagénesis sitio dirigida.

Los análisis *in silico* para la caracterización de la secuencia primaria y estructura secundaria del lncRNA del virus, y su comparación con virus filogenéticamente relacionados, permitieron la elección de criterios para el diseño de dos mutantes.

Diferentes estudios han informado que las estructuras secundarias de los lncRNA están altamente conservadas y podrían estar potencialmente relacionadas con sus funciones biológicas (Li *et al.*, 2016). La mutante 1 (pCBL239) se desarrolló por mutagénesis sitio dirigida por ensamble de Gibson por substitución de 13 nucleótidos en la posición 836 nt del lncRNA que corresponde a la posición 3,282 del genoma completo de PMeV-Mx. Esta región forma un múltiple *loop* de cuatro estructuras de tallo y asa. En este contexto, un cambio en la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx podría causar un efecto respecto a la expresión de PMeV-Mx *in vivo*.

El diseño de la mutante 2, se basó inicialmente en el análisis *in silico* de la secuencia nucleotídica de PMeV-Mx, el cual mostró una región conservada (GGGGGGGACATAAT) que se encuentra cerca del extremo 3'OH del lncRNA.

Una búsqueda bibliográfica nos permitió identificar que parte de esta región forma parte de una horquilla denominada H5, estructuralmente conservada y críticamente importante en miembros del género *Carmovirus* que contiene el motivo 5'GGGC (Simon, 2015). H5 forma una interacción RNA-RNA con bases en el extremo terminal 3' GCCC-OH, que forman parte de una secuencia consenso terminal que se conserva en *Umbravirus*, *Tombusvirus* y que también está presente en virus similares a *Umbravirus* de papaya o RNAs similares a *Umbravirus* (uRNAs) de Clase 1 como el Virus Q de babaco (BabVQ) (Cornejo-Franco *et al.*, 2021), y uRNAs de Clase 2 como el Virus asociado a la vena amarilla de los cítricos (CYVaV) (Kwon *et al.*, 2021). PMeV-Mx presenta una horquilla putativa H5 que contiene la secuencia consenso 5'GGGG similar al Virus de la fresa A (StrVA) (Koloniuk *et al.*, 2022), un virus que se encuentra agrupado dentro de los uRNAs de Clase 3 (J. Liu *et al.*, 2021).

La H5 putativa de PMeV-Mx presenta residuos adyacentes adicionales (UA) que se conservan en todos los *Umbravirus* y en virus de la Clase 1, 2 y 3 (J. Liu *et al.*, 2021). PMeV-Mx conserva una secuencia terminal 3' CCCC-OH similar a StrVA (Koloniuk *et al.*, 2022). Y se espera que, así como en StrVA, la horquilla H5 forme una interacción RNA-RNA con bases en su extremo terminal 3' OH (J. Liu *et al.*, 2021; Kwon *et al.*, 2021).

Se conoce que el rol de la interacción entre los residuos terminales 3' OH y un gran bucle asimétrico (RSE) ubicado corriente arriba del extremo 3' OH del Virus de la necrosis del pepino (CNV) es un elemento silenciador de la replicación, que también se encuentra involucrado en el ensamblaje de la replicasa (Panaviene *et al.*, 2005).

El emparejamiento de la horquilla H5 y la secuencia consenso terminal es denominado  $\Psi$ 1, el cual se sabe está presente en todos los miembros de la familia *Tombusviridae* (McCormack *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2021). Pogany *et al.*, (2003), proponen que en *Carmovirus*, H5 podría ser importante para un paso de maduración de la replicasa, y en el Virus del arrugamiento del nabo (TCV) y se propone, funcione como una chaperona de la RdRP.

La Mutante 2 se basa en la sustitución de 15 nucleótidos conservados en la horquilla H5 de PMeV-Mx. Sin embargo, el desarrollo de la Mutante 2 no se pudo concluir por problemas en la amplificación de los fragmentos por PCR, y se propone un cambio de estrategia de ensamblaje para esta mutante, ya que su desarrollo servirá para explorar la importancia de esta estructura identificada, en la replicación viral y su expresión en plantas.

El análisis *in silico* complementariamente arrojó información sobre la ausencia de una horquilla Pr y Pr putativas, características de *Umbravirus*, *Carmovirus*, y uRNAs de clase 1, 2 y 3, según lo reportado por Liu *et al.*, (2021). En su lugar presenta pseudotallos estructuralmente similares a TBSV (Virus del achaparramiento tupido del tomate) del género *Tombusvirus*, y a algunos tRNA como el RNA asociado al Virus de la hoja roja de la zanahoria (CRLVRNA) (J. Liu *et al.*, 2021b). Corriente arriba de la secuencia consenso terminal 3' OH, PMeV-Mx presenta una horquilla estructuralmente similar a la horquilla gPr de los *Tombusvirus*, la cual es un promotor de iniciación de cadena negativa de 3' OH terminal (Panaviene *et al.*, 2005). Los análisis *in silico* de las estructuras secundarias del lncRNA arrojan luz sobre la existencia de más estructuras secundarias y residuos conservados, que pueden ser blanco para el diseño de mutantes que, siguiendo este flujo de trabajo, podrían ayudar a enriquecer la caracterización del lncRNA de PMeV-Mx.

Finalmente, PMeV-Mx forma parte del creciente descubrimiento de nuevos virus similares a *Umbravirus* o RNAs asociados similares a *Umbravirus* (uRNAs) de la familia *Tombusviridae*, que se han agrupado en función de la identidad de sus RdRPs y del análisis de las estructuras secundarias de su secuencia (J. Liu *et al.*, 2021b). Al ser un grupo reciente, los estudios de los uRNAs se han centrado en la secuenciación y la caracterización de sus genomas (Cornejo-Franco *et al.*, 2021; Koloniuk *et al.*, 2022; Kwon *et al.*, 2021b; J. Liu *et al.*, 2021).

Un ejemplo de la caracterización de virus nuevos, es el caso del virus asociado a las venas amarillas de los cítricos (CYVaV) (Kwon *et al.*, 2021b) un uRNA de clase 2, que se ha caracterizado a nivel de la organización de su genoma, de su secuencia en el extremo 3' y 5' y



por su relación filogenética con otros virus. Pero además, se han desarrollado clonas infectivas para este virus que proporcionan evidencia de que es un nuevo virus capaz de inducir síntomas de la enfermedad de las venas amarillas de los cítricos (CYVD), independientemente de otros virus o viroides de los cítricos conocidos (Kwon et al., 2021b). Este es un antecedente de lo que podría estar pasando con los nuevos virus similares a *Umbravirus* encontrados en papaya.

Uno de los temas más importantes en el campo de la virología vegetal es el estudio de los agentes virales que causan enfermedades que afectan a cultivos económicamente importantes. PMeV-Mx es un virus nuevo similar a *Umbravirus*, asociado a la meleira de la papaya en México (Zamudio-Moreno et al., 2015), cuyo genoma y componentes genéticos se encuentra poco caracterizados y para el cual no se han demostrado los postulados de Koch.

La enfermedad de la meleira de la papaya, se ha confirmado en Brasil (Nakagawa et al. 1987), México (Perez-Brito, 2012b), y Australia (Phatania et al., 2019), para cada caso se han reportado virus similares a *Umbravirus* asociados a la enfermedad, tales como PMeV-Mx en México (Zamudio-Moreno et al., 2015), PMeV2 en Brasil (Sá Antunes et al., 2016), y PMeV2-Au en Australia (Campbell, 2019). Sin embargo, aún no se ha demostrado el papel de estos en la enfermedad. Hasta el momento no existen reportes del desarrollo de clonas infectivas que permitan demostrar los postulados de Koch con ninguno de estos virus.

En Brasil solo se detectó a PMeV en plantas asintomáticas, mientras que todas las plantas sintomáticas contienen ambos, PMeV y al PMeV2 (Sa-Antunes et al., 2016), lo que sugiere que únicamente el virus similar a *Umbravirus* (PMeV2) es el responsable de la sintomatología. Sin embargo, no se ha probado si PMeV2 es suficiente para causar síntomas de la enfermedad en ausencia de PMeV.

En México, PMeV-Mx es el único virus asociado a la meleira de la papaya (Zamudio-Moreno et al. 2015). Se ha encontrado al PMeV-Mx en plantas sintomáticas y asintomáticas que más tarde desarrollan la enfermedad (Zamudio-Moreno et al 2015; Perez-Brito et al., 2012), pero no se ha podido identificar al PMeV ni por RT-PCR ni por secuenciación masiva (López-Ochoa, comunicación personal). La construcción y agroinoculación de clonas infectivas se ha utilizado exitosamente para satisfacer los postulados de Koch para muchos virus de plantas (Fan et al., 2020; Navas-Hermosilla et al., 2021). La construcción de una clona infectiva de PMeV-Mx podría contribuir en un futuro cercano al esclarecimiento de la relación entre PMeV-Mx y la etiología de la enfermedad en México.

### CAPITULO V.

#### CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.

#### CONCLUSIONES.

- Se obtuvieron dos clonas infectivas de pDIVA::PMeV-Mx por el método de Ensamble de Gibson, transformadas en la cepa de *E. coli* JM109 y su posterior transfección a la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404.
- Se obtuvo una clona infectiva de pDIVA::PMeV-Mx mediante la transformación directa a la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404.
- Se identificaron estructuras secundarias conservadas en el extremo terminal 3'Oh de PMeV-Mx, putativamente involucradas en la replicación viral.
- Se logró la construcción de una mutante en la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx mediante ensamble de Gibson.
- Se estableció el protocolo de Agroinfiltración en el laboratorio con el vector pCAMBIA2200::GFP.

### PERSPECTIVAS

Según los resultados y conclusiones de este trabajo, se plantean las siguientes perspectivas para futuras investigaciones sobre la caracterización del RNA largo no codificante de PMeV-Mx mediante el desarrollo de una clona infectiva:

- Evaluar el efecto de la expresión de las clonas infectivas y la Mutante 1 obtenidas, en plantas hospederas y no hospederas mediante agroinfiltración.
- Confirmar mediante secuenciación Sanger, la integridad de las clona infectivas construidas.
- Determinar si el PMeV-Mx es suficiente para replicarse y moverse en plantas de papaya en ausencia de un virus ayudador, a diferencia de lo que se ha plantado que ocurre para el complejo PMeV/PMeV-2 en Brasil.
- Confirmar mediante el sondeo de la estructura secundaria del lncRNA (SHAPE) las predicciones obtenidas *in silico*.
- Concretar el desarrollo de la Mutante 2 del lncRNA para evaluar el efecto de la mutación sobre la horquilla H5 identificada y putativamente involucrada en la replicación viral.
- Realizar un escrutinio más profundo sobre la estructura secundaria del lncRNA de PMeV-Mx, mediante análisis de predicciones *in silico*.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Araújo M., Tavares É., Silva F., Marinho V., Júnior M. (2007). Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. *Journal of virological methods*.; 146 (1):305–10.
- Bijora, T., Blawid, R., Costa, D. K. T., Aragão, F. J. L., Souto, E. R., & Nagata, T. (2017). Construction of an agroinfectious clone of bean rugose mosaic virus using Gibson Assembly. *Virus Genes*, 53(3), 495-499. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1446-y>
- Birnboim, H. C. (1983). [17] A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. In *Methods in enzymology* (Vol. 100, pp. 243-255). Academic Press.
- Blawid, R., & Nagata, T. (2015). Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. *Journal of Virological Methods*, 222, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.003>
- Bordat, A., Houvenaghel, M.-C., & German-Retana, S. (2015). Gibson assembly: An easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virology Journal*, 12(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0315-3>
- Cornejo-Franco, J. F., Flores, F., Mollov, D., & quito-avila, diego fernando. (2021). *An Umbra-related Virus Found in Vasconcellea X Heilbornii (Caricaceae)* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-196384/v1>
- Dotu, I., Stich, M., & Aguirre, J. (2018). Estructura, plegamiento y evolución del RNA.
- Duff-Farrier, C. R. A., Mbanzibwa, D. R., Nanyiti, S., Bunawan, H., Pablo-Rodriguez, J. L., Tomlinson, K. R., James, A. M., Alicai, T., Seal, S. E., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2019). Strategies for the Construction of Cassava Brown Streak Disease Viral Infectious Clones. *Molecular Biotechnology*, 61(2), 93-101. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0139-7>
- Edmonds, J., Van Grinsven, E., Prow, N., Bosco-Lauth, A., Brault, A. C., Bowen, R. A., Hall, R. A., & Khromykh, A. (2013). A Novel Bacterium-Free Method for Generation of Flavivirus Infectious DNA by Circular Polymerase Extension Reaction Allows Accurate

- Recapitulation of Viral Heterogeneity. *Journal of Virology*, 87(4), 2367-2372. <https://doi.org/10.1128/JVI.03162-12>
- Fan, X., Zhang, Z., Ren, F., Hu, G., Li, C., Zhang, B., & Dong, Y. (2020). Development of a Full-Length Infectious cDNA Clone of the Grapevine Berry Inner Necrosis Virus. *Plants*, 9(10), 1340. <https://doi.org/10.3390/plants9101340>
- FAOSTAT, 2018. Food and agriculture data. [Online] (Actualizado 2017) Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Felker, P., Bunch, R., Russo, G., Preston, K., Tine, J. A., Xiaohan, M., Cushman, J. C., & Yim, W. C. (2019). Biology and chemistry of an Umbravirus like 2989 bp single stranded RNA as a possible causal agent for Opuntia stunting disease (engrosamiento de cladodios)—A Review.
- Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M., Robaglia, C., 1996. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *Journal of General Virology* 77 (3), 519–523. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-3-519>.
- Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. En R. Ming & P. H. Moore (Eds.), *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 3-15). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_1)
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Guo, J., He, Y., Wang, X., Jiang, B., Lin, X., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Chen, S., & Cheng, A. (2020). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone for duck Tembusu virus by insertion of an intron. *Journal of Virological Methods*, 283, 113922. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113922>
- Guzmán, E., R. Gómez, H.A.J. Pohlan, J.C. Álvarez, J.M. Pat y V. Geissen (2012). La producción de papaya en Tabasco y los retos del desarrollo sustentable. *El Cotidiano*, 147, 99-106

- Jo, Y., Back, C.-G., Choi, H., & Cho, W. K. (2020). Comparative Microbiome Study of Mummified Peach Fruits by Metagenomics and Metatranscriptomics. *Plants*, 9(8), 1052. <https://doi.org/10.3390/plants9081052>
- Jones, A. N., & Sattler, M. (2019). Challenges and perspectives for structural biology of lncRNAs—The example of the Xist lncRNA A-repeats. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(10), 845-859. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz086>
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (Eds.). (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Vol. 9). Elsevier.
- Klenov, A., & Hudak, K. A. (2021). Facile method of curing toxicity in large viral genomes by high-throughput identification and removal of cryptic promoters. *Journal of Virological Methods*, 287, 113993. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113993>
- Koloniuk, I., Příbylová, J., Čmejla, R., Valentová, L., & Fránová, J. (2022). Identification and Characterization of a Novel Umbra-like Virus, Strawberry Virus A, Infecting Strawberry Plants. *Plants*, 11(5), 643. <https://doi.org/10.3390/plants11050643>
- Kwon, S.-J., Bodaghi, S., Dang, T., Gadhav, K. R., Ho, T., Osman, F., Al Rwahnih, M., Tzanetakis, I. E., Simon, A. E., & Vidalakis, G. (2021a). Complete Nucleotide Sequence, Genome Organization, and Comparative Genomic Analyses of Citrus Yellow-Vein Associated Virus (CYVaV). *Frontiers in Microbiology*, 12, 683130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.683130>
- Laufer, M., Mohammad, H., Maiss, E., Richert-Pöggeler, K., Dall'Ara, M., Ratti, C., Gilmer, D., Liebe, S., & Varrelmann, M. (2018). Biological properties of Beet soil-borne mosaic virus and Beet necrotic yellow vein virus cDNA clones produced by isothermal in vitro recombination: Insights for reassortant appearance. *Virology*, 518, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.029>
- Lim, S., Lee, S.-H., & Moon, J. S. (2019). Complete genome sequence of a tentative new umbravirus isolated from *Patrinia scabiosaefolia*. *Archives of Virology*, 164(9), 2375-2378. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04312-y>
- Liu, J., Carino, E., Bera, S., Gao, F., May, J. P., & Simon, A. E. (2021a). Structural Analysis and Whole Genome Mapping of a New Type of Plant Virus Subviral RNA: Umbravirus-Like Associated RNAs. *Viruses*, 13(4), 646. <https://doi.org/10.3390/v13040646>

- Liu, W., & Ding, C. (2017). Roles of LncRNAs in Viral Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 205. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00205>
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924-933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>
- Maciel-Zambolim, E., Kunieda-Alonso, S., Matsuoka, K., De Carvalho, M. G., & Zerbini, F. M. (2003). Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, 52(3), 389-394.
- McCormack, J. C., Yuan, X., Yingling, Y. G., Kasprzak, W., Zamora, R. E., Shapiro, B. A., & Simon, A. E. (2008). Structural Domains within the 3' Untranslated Region of Turnip Crinkle Virus. *Journal of Virology*, 82(17), 8706-8720. <https://doi.org/10.1128/JVI.00416-08>
- Nagata, T., & Inoue-Nagata, A. K. (2015). Simplified Methods for the Construction of RNA and DNA Virus Infectious Clones. En I. Uyeda & C. Masuta (Eds.), *Plant Virology Protocols* (Vol. 1236, pp. 241-254). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_18)
- Nagyová, A., & Šubr, Z. (s. f.-b). *INFECTIOUS FULL-LENGTH CLONES OF PLANT VIRUSES AND THEIR USE FOR CONSTRUCTION OF VIRAL VECTORS*. 16.
- Nakagawa, J.T.Y.; Suzukama, Y. (1987). Exudação de Látex Pelo Mamoeiro. Estudo de Ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. Congresso Brasileiro de Fruticultura: Brasil, pp. 555–559.
- Navas-Hermosilla, E., Fiallo-Olivé, E., & Navas-Castillo, J. (2021). Infectious Clones of Tomato Chlorosis Virus: Toward Increasing Efficiency by Introducing the Hepatitis Delta Virus Ribozyme. *Frontiers in Microbiology*, 12, 693457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693457>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>

- Ouillet, L., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., 1989. In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 172 (1), 293–301. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90131-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90131-1).
- Panaviene, Z., Panavas, T., & Nagy, P. D. (2005). Role of an Internal and Two 3J-Terminal RNA Elements in Assembly of Tombusvirus Replicase. *J. VIROL.*, 79, 11.
- Pasin, F., Menzel, W., & Daròs, J. (2019). HRNAessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: An update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnology Journal*, 17(6), 1010-1026. <https://doi.org/10.1111/pbi.13084>
- Perez-Brito, D. (2012a). First report of papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(71). <https://doi.org/10.5897/AJB12.1189>
- Peremyslov, V., & V. Dolja, V. (2007). Cloning of large positive-strand RNA viruses. *Current Protocols in Microbiology*, 7(1), 16F-1.
- Pogany, J. (2003). A replication silencer element in a plus-strand RNA virus. *The EMBO Journal*, 22(20), 5602-5611. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg523>
- Quito-Avila, D. F., Alvarez, R. A., Ibarra, M. A., & Martin, R. R. (2015). Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology*, 143(1), 199-204. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0675-y>
- Rodrigues, C.H.; Ventura, J.A.; Maffia, L.A. 1989. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. *Fitopatol. Bras.*, 14, 118
- Sá Antunes, T. F., Amaral, R. J. V., Ventura, J. A., Godinho, M. T., Amaral, J. G., Souza, F. O., Zerbini, P. A., Zerbini, F. M., & Fernandes, P. M. B. (2016b). The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. *PLOS ONE*, 11(5), e0155240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155240>
- Sá Antunes, T. F., Maurastoni, M., Madroñero, L. J., Fuentes, G., Santamaría, J. M., Ventura, J. A., Abreu, E. F., Fernandes, A. A. R., & Fernandes, P. M. B. (2020). Battle of Three: The Curious Case of Papaya Sticky Disease. *Plant Disease*, 104(11), 2754-2763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2622-FE>



- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3932.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M. A., & Dawson, W. O. (2003). Frameshift mutations in infectious cDNA clones of Citrus tristeza virus: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology*, 313(2), 481-491
- Shrestha, N., & Bujarski, J. J. (2020). Long Noncoding RNAs in Plant Viroids and Viruses: A Review. *Pathogens*, 9(9), 765. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090765>
- Simon, A. E. (2015). 3'UTRs of carmoviruses. *Virus Research*, 206, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.023>
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, 1(4), 2019.
- Sun, K., Zhao, D., Liu, Y., Huang, C., Zhang, W., & Li, Z. (2017). Rapid Construction of Complex Plant RNA Virus Infectious cDNA Clones for Agroinfection Using a Yeast-*E. coli*-*Agrobacterium* Shuttle Vector. *Viruses*, 9(11), 332. <https://doi.org/10.3390/v9110332>
- Syller, J. (2003a). Molecular and biological features of umbraviruses, the unusual plant viruses lacking genetic information for a capsid protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2003.08.004>
- Tavares ET, Tatagiba JS, Ventura JA, Souza Jr MT (2004). Two new systems for early diagnosis of Papaya Sticky Disease. *Fitopatol. Bras.* 29: 563-566.
- Tran, P.-T., Fang, M., Widyasari, K., & Kim, K.-H. (2019). A plant intron enhances the performance of an infectious clone in planta. *Journal of Virological Methods*, 265, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.012>
- Tuo, D., Shen, W., Yan, P., Li, X. and Zhou, P. (2015) Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya leaf distortion mosaic virus using In-Fusion cloning. *Viruses*, 7, 6241– 6250.
- Tuo, D., Fu, L., Shen, W., Li, X., Zhou, P., & Yan, P. (2017). Generation of stable infectious clones of plant viruses by using *Rhizobium radiobacter* for both cloning and inoculation. *Virology*, 510, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.012>

- Von Arnim, A. G., Deng, X.-W., & Stacey, M. G. (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, 221(1), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00433-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00433-8)
- Wang, D., Cui, L., Zhang, L., Ma, Z., & Niu, Y. (2021). Complete Genome Sequencing and Infectious cDNA Clone Construction of Soybean Mosaic Virus Isolated from Shanxi. *The Plant Pathology Journal*, 37(2), 162-172. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2020.0209>
- Wang, P. (2019). The Opening of Pandora's Box: An Emerging Role of Long Noncoding RNA in Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 9, 3138. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03138>
- Wang, Z., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2017a). Viral lncRNA: A regulatory molecule for controlling virus life cycle. *Non-Coding RNA Research*, 2(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2017.03.002>
- Wetzel, V., Brault, V., & Varrelmann, M. (2018). Production of a Beet chlorosis virus full-length cDNA clone by means of Gibson assembly and analysis of biological properties. *Journal of General Virology*, 99(11), 1522-1527. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001146>
- Wieczorek, P., Budziszewska, M. and Obrępańska-Stęplowska, A. (2015) Construction of infectious clones of tomato torrado virus and their delivery by agroinfiltration. *Arch. Virol.* 160, 517– 521.
- Zamudio-Moreno, E., Ramirez-Prado, J. H., Moreno-Valenzuela, O. A., & Lopez-Ochoa, L. A. (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1145-1154. <https://doi.org/10.4238/2015.February.6.18>
- Zhao, T. (2019). Long noncoding RNA and its role in virus infection and pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 24(4), 777-789. <https://doi.org/10.2741/4750>

## ANEXO

Cebadores para ensamble de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)				
ID	No.	Secuencia	Tamaño	Tm
Pdiva	CB189	5'GGGTCGGCATGGCATCTCCA3'	20 nt	60 °C
	CB188	5'CCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC3'	25 nt	
PMeV-Mx	CB172	5' <b>tcatttcattggagagg</b> ATTAGAAATGATGAACATTTTC	49 nt	70 °C
	CB173	5' <b>atgcatgccgaccc</b> GGGGCACGCTTTTCGCGTTACT	37 nt	
Cebadores para la verificación de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)				
1.	CB21	5'GTTCCAACCACGTCTTCAAAGC3'	22 nt	68 °C
	CB187	5'GTGCGTCCTCCTTCGGATG3'	19 nt	
3.	CB172	5' <b>tcatttcattggagagg</b> ATTAGAAATGATGAACATTTTC	40 nt	70 °C
	CB173	5' <b>atgcatgccgaccc</b> GGGGCACGCTTTTCGCGTTACT	37 nt	
Cebadores para el ensamble de las mutantes de pDIVA::PMeV-Mx (pCBL224)				
4.	CB174	5' <b>ctctcgagcaatcctat</b> CCAACCAGACATGGAACCAAAGAACTACTTG3'	47 nt	71° C
	CB175	5' <b>ggataggattgcucga</b> GAGGGCTAGATTTCGGCTCGACTATGG3'	28 nt	72° C
5.	CB176	5' <b>gtgagcggagtagtga</b> CGAGGGCTCAAACACTACGTGTTTAGTGAG3'	43 nt	71° C
	CB 177	5' <b>gtcactacttccGCTC</b> ACTCTCGAGTTTAAATTTGCTTGCAAAAGTAACGCG3'	51 nt	72° C

**Nota.** Secuencias de solapamiento (Negritas).